



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

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**  
**proyecto de grado**  
**Bogotá D.C, 03 de Junio 2022**



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

**Angie Lorena Cortés Pineda**  
**Maura Gómez Torres**  
**Laura Julieth González Pacheco**

**Asesora interna:**

**Ruth Melida Sánchez Mora MSc. PhD**

**Asesora externa:**

**Natalia Castellanos Hernandez**  
**Bacteriologa y laboratorista Clínica**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**  
**Bogotá D.C, 03 Junio 2022**



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

**APROBADA \_\_\_\_\_**

**JURADOS Luisa Fernanda Castillo Leon**

**Mary Luz Yaya Lancheros**

**ASESORES Ruth Melida Sánchez Mora MSc. PhD**

**Natalia Castellanos Hernandez**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Bogotá D.C, 03 Junio 2022**

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios, por guiarme en este camino y darme las fuerzas necesarias para continuar

Gracias a mis padres que con su amor y esfuerzo me permitieron alcanzar un logro más en vida académica, sin su apoyo incondicional esto no sería posible. También quiero agradecer a cada una de las personas que me apoyaron en este camino y siempre me dieron una razón más para continuar y no rendirme en el proceso de convertirme en una gran profesional pero sobre todo en una gran persona.

**Angie Lorena Cortes Pineda**

En primer lugar quisiera agradecer a Dios por abrirme las puertas para aprender y experimentar cada una de las cosas que he aprendido. Quisiera agradecer a mis padres por apoyarme día a día y nunca dejarme sola, a mis hermanos y familiares que siempre han creído en mí y me han hecho crecer como persona y profesional; y por último a todas las personas que de alguna u otra forma han estado presentes en este proceso tanto académico como personal.

**Maura Gómez Torres**

Inicialmente, quiero agradecer a Dios por iluminar mi camino siempre, a mis padres por apoyarme en el transcurso de este proceso de aprendizaje; a mi madre por apoyarme en todo momento y no dejarme nunca sola, a mis amigos y allegados por cada palabra de aliento en el momento oportuno, a todas aquellas personas que hicieron parte de mi formación académica durante mi recorrido por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Finalmente agradezco a todos aquellos que de alguna forma hacen parte de mi día a día y me ayudan a mejorar como ser humano y como profesional.

**Laura Julieth Gonzalez Pacheco**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar queremos agradecer a la profesora Ruth Mélida Sánchez Mora, por permitirnos formar parte del semillero Biotecnología y Genética. y desarrollar nuestro trabajo de investigación en el, y por brindarnos los medios para obtener este logro. También queremos agradecer a Natalia Castellanos Hernández 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. Finalmente nos damos las gracias a nosotras mismas por no rendirnos a pesar de las adversidades que se nos presentaron.

## Tabla de contenido

Resumen.....	12
Introducción.....	14
1. Objetivos.....	16
2. Antecedentes.....	18
3. Marco referencial.....	23
3.1 Cultivo celular.....	23
3.2 <i>Chlamydia</i> .....	24
3.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	25
3.2.2 Ciclo de vida de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	26
3.2.3 Manifestaciones clínicas de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	28
3.3 Linfogranuloma venéreo.....	30
4. Diseño metodológico.....	32
4.1 Tipo y alcance de investigación.....	32
4.2 Universo, población y muestra.....	33
4.3 Hipótesis, variables e indicadores.....	34
4.4 Técnica y procedimientos.....	35
4.4.1 Preparación y mantenimiento del cultivo de células HEp-2.....	35
4.4.2 Coloración con Giemsa de las células HEp-2.....	36

4.4.3 Viabilidad de las células HEp-2, por el método de exclusión Azul de Tripano.....	37
4.4.4 Infección de las células HEp-2 con cuerpos elementales <i>Chlamydia trachomatis</i> , serovar L2.....	37
4.4.5 Propagación de EB's de <i>Chlamydia trachomatis</i> , a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.....	39
5. Resultados.....	40
5.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular HEp-2.....	40
5.2 Línea celular HEp-2 teñida con Giemsa .....	42
5.3 Viabilidad de las células HEp-2.....	43
5.4 Infección de células HEp-2 con <i>Chlamydia trachomatis serovar L2</i> .....	44
5.4.1 Coloración con Giemsa de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales de <i>Chlamydia trachomatis serovar L2</i> .....	46
5.5 Propagación de EB's de <i>C. trachomatis</i> a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.....	49
5.6 Mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con EB's de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	50
6. Discusión. ....	52
7. Conclusiones. ....	55
8. Referencias bibliográficas.....	56

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> . Ciclo de desarrollo bifásico de <i>Chlamydia trachomatis</i> . Tomado de Bastidas et al <sup>16</sup> .....	27
<b>Figura 2.</b> Infección lámina Millicell EZ Slide.....	38
<b>Figura 3.</b> Confluencia de la línea celular HEp-2 durante su mantenimiento.....	41
<b>Figura 4.</b> Morfología de la línea celular HEp-2 durante su mantenimiento.....	41
<b>Figura 5.</b> Viraje del medio DMEM como resultado al metabolismo de la línea celular HEp-2 y otros factores asociados.....	42
<b>Figura 6.</b> Morfología de las células HEp-2 teñidas con Giemsa.....	43
<b>Figura 7.</b> Viabilidad de la línea celular HEp-2.....	44
<b>Figura 8.</b> Células HEp-2 infectadas con <i>Chlamydia trachomatis</i> a las 0, 24 y 48 hpi .....	45
<b>Figura 9.</b> Cuerpos elementales de <i>Chlamydia trachomatis</i> en la línea celular HEp-2 a las 72 horas post infección.....	46
<b>Figura 10.</b> Coloración de la línea celular HEp-2 con Giemsa post infección.....	47
<b>Figura 11.</b> Gráfica del recuento de EB's después de 24, 48 y 72 hpi.....	49
<b>Figura 12.</b> Propagación de EB's de <i>C. trachomatis</i> a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.....	50
<b>Figura 13.</b> Mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con EB's de <i>Chlamydia trachomatis</i> tras ser descongelada.....	51



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Conteo de los EB's <i>C. trachomatis</i> serovar L2 post infección , visualizados en objetivo de 100x.....	48
<b>Tabla 2.</b> Conteo de los EB's <i>C. trachomatis</i> serovar L2 post infección , visualizados en objetivo de 40x.....	48
<b>Tabla 3.</b> Conteo de los EB's <i>C. trachomatis</i> serovar L2 tras propagación, visualizados en objetivo de 40x y 100x.....	50



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

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

**Resumen**

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria intracelular obligada, Gram negativa, capaz de causar la infección de transmisión sexual bacteriana más prevalente en el mundo. Esta infección generalmente suele cursar de manera asintomática, sin embargo cuando cursa de forma sintomática puede llegar a generar afecciones, tales como linfogranuloma venéreo, generalmente en hombres y embarazo ectópico en mujeres. El presente proyecto tiene como objetivo realizar el cultivo y mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, para lo cual, se mantuvieron cultivos celulares seriados de la línea celular HEp-2 en óptimas condiciones, alcanzando así una confluencia del 90% al 100% para realizar la infección de las células HEp-2 con cuerpos elementales. Se realizaron coloraciones, como la coloración azul de tripano para evaluar la viabilidad celular, y la coloración de Giemsa para evaluar la morfología celular y bacteriana -intra y extracelular-. Tras llevar a cabo los diferentes ensayos, se comprobó que es posible infectar periódicamente las células HEp-2 partiendo de una línea celular previamente infectada con cuerpos elementales, al completar su ciclo de vida, sin embargo, aún deben dilucidarse con más estudios, otros aspectos referentes al mantenimiento de la línea celular infectada y se invita a los nuevos investigadores a continuar futuras investigaciones de

infección acerca de líneas celulares con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.

Palabras claves: *Chlamydia trachomatis*, infección, cultivo celular, células HEp-2, cuerpos elementales, inclusiones, Giemsa, propagación.

Angie Lorena Cortés Pineda

Maura Gómez Torres

Laura Julieth González Pacheco

Ruth Melida Sánchez Mora MSc. PhD

Bogotá D.C, 03 Junio 2022

## Introducción

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada, que afecta únicamente a los seres humanos, causa tracoma y ceguera, infecciones óculo genitales y neumonía. *C. trachomatis* puede dividirse en 15 serotipos en función de las características antigénicas del antígeno proteico de tipo. Existe una relación directa entre el serotipo y la enfermedad que producen las diferentes cepas de esta especie. Los serotipos causantes del tracoma van de la A-C, los causantes de infecciones óculo-genitales van de la D-K y linfogranuloma venéreo -LGV- es causado por los serotipos L1, L2, L3.

Esta bacteria comprende un ciclo de desarrollo bifásico, el cual alterna entre dos formas morfológicas, por un lado, Cuerpo Elemental -EB-, que es la forma infectiva, extracelular e incapaz de replicarse, y por otro lado el Cuerpo Reticulado -RB-, que es la forma intracelular que se replica. Los EB's se transmiten de persona a persona durante las relaciones sexuales. Los EB's son captados por células epiteliales y macrófagos, y se convierten en RB y se empiezan a dividir. Alrededor de la mitad del ciclo, los RB comienzan a diferenciarse de nuevo en EB y finalmente se liberan por lisis celular en el entorno extracelular. Durante el ciclo infeccioso, la bacteria puede estar sometida a condiciones estresantes como la exposición a antibióticos, déficit de nutrientes o contacto con citoquinas lo que provoca que la bacteria entre en un estado de persistencia que es asociada generalmente a la aparición de cuerpos reticulados agrandados y aberrantes. Si las situaciones de estrés desaparecen, la bacteria vuelve al proceso de replicación normal y culmina su ciclo infeccioso.

La clamidiasis es una ITS que se transmite frecuentemente por relaciones sexuales vaginales, orales y anales. También es posible que una mujer embarazada le transmita clamidiasis a su hijo durante el parto. Dentro de los factores que aumentan el riesgo de contraer *Chlamydia trachomatis* incluyen: ser sexualmente activo antes de los 25 años, tener múltiples parejas sexuales, no usar preservativo regularmente y tener antecedentes de infecciones de transmisión sexual.

Este patógeno es considerado un problema de salud pública debido a su alta prevalencia en el país, ya que es una enfermedad silenciosa y mayoritariamente asintomática. Los hombres y

mujeres que la padecen, generalmente no la detectan y la enfermedad avanza hasta causar infertilidad o linfogranuloma venéreo, más frecuentemente en hombres y embarazo ectópico, infertilidad, enfermedad inflamatoria pélvica, cervicitis y dolor pélvico en mujeres. Cuando la enfermedad cursa sintomática, los hombres en general no presentan problemas de salud pero en ocasiones puede infectar el epidídimo, causando dolor, fiebre y secreciones; en las mujeres, se puede presentar flujo vaginal, dolor abdominal, sangrado o disuria. Añadido a esto, en los últimos años, ha sido descrito que *C. trachomatis*, está presentando resistencia a los antibióticos de elección para su tratamiento como son la azitromicina y la doxiciclina, lo cual genera una problemática aún mayor, surgiendo por ende, la siguiente pregunta problema:

¿Cuál es la importancia del mantenimiento de un modelo in vivo de infección de células HEp-2 con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 para facilitar el desarrollo de próximas investigaciones?

Considerando que la clamidiasis es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes en el mundo, que por el curso asintomático de su infección causa graves problemas de salud, tanto en hombres como mujeres; se hace necesario el estudio de *Chlamydia trachomatis* in vivo para entender su interacción con las células huésped y así poder realizar investigaciones básicas que orienten al conocimiento de esta infección, morfología, patogenia, respuesta inmune, genética, péptidos antimicrobianos, vías de señalización, inhibidores, blancos terapéuticos, que se deseen realizar en el Semillero de Investigación, Biotecnología y Genética de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

El estudio de *Chlamydia trachomatis* parte de la infección de líneas celulares, en este caso células HEp-2 -Human Epidermoid Cancer Cells-, con el estadio infeccioso de la bacteria denominado cuerpo elemental. Actualmente la compra de cuerpos elementales de *C. trachomatis* tiene un costo elevado, por lo cual es difícil iniciar investigación básica al respecto, si no se cuenta con el presupuesto suficiente. 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 estos costos; teniendo en cuenta que los cuerpos elementales son bastante lábiles, se hace necesario proponer un protocolo de mantenimiento de una línea celular infectada con los mismos.

## **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



## 1 Antecedentes

A través de los años se han desarrollado diversas investigaciones en torno a *C. trachomatis*, encontrando estudios basados en el uso de cultivos celulares para evaluar la interacción de ésta con diferentes líneas celulares, siendo necesario establecer modelos de infección y mantenimiento de la línea celular HEp-2 para la obtención de cuerpos elementales de *C. trachomatis* serovar L2. La recopilación de esta bibliografía fortalece la investigación y permite visualizar los estudios que se han realizado con relación al tema propuesto.

La obtención de cuerpos elementales de *C. trachomatis* es un proceso que se ha realizado a partir de la purificación de los mismos, tras desarrollar la infección en células in vitro como lo descrito por Howard et al<sup>1</sup> en su artículo titulado Purification on Renografin Density Gradients of *Chlamydia trachomatis* Grown in the Yolk Sac of Eggs publicado en 1974, donde realizó la purificación de *Chlamydia trachomatis*, en sacos vitelinos de huevos embrionados, mediante la centrifugación en gradientes isopícnicos continuos de Renografin, para la producción en escala de vacunas. Se utilizaron cepas de clamidia, aisladas de pacientes con tracoma, para la obtención de esta. El saco vitelino de los huevos proporciona gran cantidad de nutrientes y se considera un medio adecuado si se logra eliminar de manera eficaz los contaminantes del huevo. Dentro de los métodos publicados para la purificación de clamidia del saco vitelino se incluyen la centrifugación diferencial, centrifugación en KCl 1M, cromatografía de intercambio iónico y centrifugación en gradiente de sacarosa. Por otra parte, Faris et al<sup>2</sup>, al igual que Howard, se basan en la centrifugación isopícnica para la obtención de cuerpos elementales de *C. trachomatis*, en su artículo, titulado Propagation and Purification of *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 Transformants and Mutants publicado en 2020, describen los aproximadamente 15 serovares de *Chlamydia trachomatis* que hacen parte de dos biovariedades que son el tracoma y linfogranuloma venéreo -LGV. Actualmente existen técnicas para manipular genéticamente *C. trachomatis*, esta purificación se realiza con un reactivo llamado Renografin, que actualmente no está disponible de manera comercial, por tanto, se emplea diatrizoato de meglumina, conocido como Gastrografin, el cual demostró gran rendimiento para la purificación de clamidia en dicho estudio, en donde también, se estandarizó un protocolo para la infección, propagación, purificación y titulación



de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, además de proponer recombinantes o mutantes de la bacteria.

En cuanto a la interacción de *Chlamydia trachomatis* con el epitelio genital humano en cultivo, el trabajo realizado por Moorman et al<sup>3</sup>, estudió la infección genital causada por este microorganismo, realizando cultivos de células epiteliales ectocervicales y endometriales humanas; las cuales fueron susceptibles a la infección por clamidia. Los inóculos dieron tasas de infección del 15 al 30% aproximadamente en células del endometrio, del 5 al 10% en células escamosas del ectocérvix y en las células MacCoy fue del 50 al 80%. Las líneas celulares fueron expuestas a un pretratamiento con DEAE-dextrano y los inóculos fueron sometidos a centrifugación para mejorar la infección en células HeLa y McCoy, sin alterar el número de células genitales positivas para la inclusión,; sin embargo, la adición de cicloheximida a los cultivos provocó un aumento significativo en las células ectocervicales positivas a la inclusión. Además de esto, se realizó inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína para observar las interacciones clamidiales entre las células genitales y las células McCoy portadoras de infección. Al igual que en el artículo publicado en 2015 por Carrera et al<sup>4</sup>, se estudiaron otras líneas celulares donde se estandarizaron diferentes condiciones de cultivo, evaluando las líneas celulares HeLa y HEp-2. Este artículo parte del objetivo de estandarizar el cultivo de células HeLa en diferentes condiciones de tiempo y concentraciones de L-glutamina, con el fin de que sean utilizadas las líneas celulares en protocolos de infección con *Chlamydia trachomatis* serovar L2. Como conclusión se determinó que la línea celular HeLa, en comparación con la línea celular HEp-2, presenta un crecimiento más óptimo y con mayor porcentaje de confluencia evaluado al mismo tiempo de cultivo, estandarizando su mantenimiento con medio DMEM, 0,1% de L- glutamina, 10% de SFB. De igual manera, la coloración de Giemsa debe ser realizada en un tiempo de 40 min para que se observe una clara difusión del núcleo y el citoplasma.

De igual importancia, Jutinico et al<sup>5</sup> realiza un doblaje poblacional de la línea celular HEp-2 en su artículo titulado “Perspectivas para el estudio de la infección con *Chlamydia trachomatis*”. En esta investigación se destacan las características generales de la *Chlamydia trachomatis*, la importancia de los cultivos celulares en cuanto a investigación básica, la

utilización de la línea celular HEp-2 en estudios de infección para esta bacteria, también se recalca la importante acción de los péptidos antimicrobianos como adversarios para infecciones causadas para este patógeno. En este estudio se realizaron curvas de crecimiento en la línea celular HEp-2 con medios DMEM-F12 y MEM, se estandarizó además, la coloración con Giemsa, se calculó el doblaje poblacional con diferentes inóculos para evaluar el desarrollo de la línea celular en cultivo y se seleccionaron las condiciones óptimas para futuras investigaciones. Posteriormente, Castellanos et al<sup>6</sup> en 2020, optimizan un modelo de infección en células HEp-2 con cuerpos elementales -EB's- de *C. trachomatis serovar L2*, confirmando la infección mediante técnicas como la coloración con Giemsa para evaluar la morfología de las células HEp-2 sin infectar e infectadas, e Inmunofluorescencia directa que detecta la proteína de membrana MOMP de *C. trachomatis*.

Por otra parte, es necesario conocer algunas perspectivas y generalidades acerca de este microorganismo. Es por ello que Beatty et al<sup>7</sup> en su artículo propone diferentes perspectivas acerca de la persistencia que posee *C. trachomatis* en diferentes cultivos celulares, como de forma in vivo. *Chlamydia trachomatis* es responsable de diferentes enfermedades de transmisión sexual, además de ser el patógeno principal de causar tracoma en diferentes países en desarrollo; se estima que los procesos inmunológicos se asocian a las infecciones que causa esta bacteria.. Se espera que la identificación de los factores que alteran el crecimiento de clamidia permitan entender un poco más la enfermedad, diagnóstico, manifestaciones inmunopatológicas y su tratamiento. Al igual que Beatty, Ostos et al<sup>8</sup> en su publicación nos muestra avances y generalidades hasta el año 2004 del microorganismo y todo lo conocido hasta ese momento, donde se describe la morfología y características de los cuerpos elementales y cuerpos reticulados, así como de la membrana clamidial y proteínas de la envoltura clamidial, dentro de las que están la proteína MOMP, proteína de 60 Kda, proteína de 12-15 Kda, y se describe la presencia de dos nuevas proteínas de shock térmico -hsp- en la envoltura: la hsp60 y la hsp70, que está presente en mujeres con enfermedad pélvica asociada a *C. trachomatis*. Además del ciclo de vida, antígenos, genoma, interacción huésped-parásito, factores de virulencia, epidemiología, diagnóstico, genotipificación de especies de *Chlamydia* por análisis del gen Omp-1 y finalmente se hace alusión a las perspectivas para la próxima década, de los avances moleculares y proyección de futuras vacunas para esta bacteria.

En relación con la inmunidad celular de *C. trachomatis*, Zhong et al<sup>9</sup> presenta en su artículo del 2018, como clamidia siendo un patógeno intracelular obligado es capaz de evadir el reconocimiento del sistema inmunológico del huésped para sobrevivir después de la infección y de esta forma causar diferentes enfermedades. Se realizó un estudio donde se buscaron algunos de los factores capaces de realizar una actividad similar a la del proteosoma de la clamidia, utilizando cromatografía de columna, donde se purificó la proteína clamidial que se correlaciona con la actividad similar al proteosoma -CPA- y se denominó proteína clamidial como factor CPA -PAF-. La actividad similar al proteosoma clamidial no hace referencia a la actividad ni las funciones del proteosoma del huésped.

De la misma forma, Howie et al<sup>10</sup> en su artículo realiza una revisión de la inmunidad de *C. trachomatis* y los diferentes factores asociados a una posible vacuna contra este patógeno. Se describe que para poder desarrollar una vacuna contra la bacteria se debe conocer a profundidad el ciclo de vida, la respuesta inmune del huésped y la relación que tiene con la enfermedad. Se dice que la infección por *Chlamydia*, no previene una posible reinfección y los antibióticos no permiten que se cree una adecuada producción de anticuerpos a nivel de toda la población, por ende, aún no se tiene claro cuál sería la respuesta inmune necesaria para evitar la infección. Aún no se sabe a ciencia cierta si la patología de la enfermedad es causada directamente por la infección o por la respuesta inmune que se genera. La evidencia muestra que las mujeres que producen una respuesta proinflamatoria dominada por IFN- $\gamma$  -Respuesta Th1- tiene menor reinfección e infertilidad de aquellas que producen IL-10 e IL-4 -Respuesta Th2-.

A su vez, es importante conocer más sobre el diagnóstico de las infecciones causadas por este microorganismo, su epidemiología e importancia clínica, por ello en el artículo de Cervantes<sup>11</sup>; describen los métodos más utilizados para el diagnóstico de *C. trachomatis*, donde se incluyen, la detección directa de las muestras con tinción de yodo y Giemsa a los cuerpos de inclusión, inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno específico, el LPS de membrana y/o sobre la proteína principal de la membrana externa del microorganismo y no menos importante, el cultivo, utilizando la línea celular McCoy tratada con cicloheximida, el uso de técnicas moleculares y de

genotipificación. A su vez, se debe tener presente, el estudio de nuevas alternativas terapéuticas, pues es necesario llevar a cabo el debido tratamiento cuando una persona cursa con una infección causada por *C. trachomatis*, considerando, como se da a conocer en el artículo de Lara et al<sup>12</sup> publicado en el 2018, que esta bacteria tiene una alta morbilidad reproductiva a nivel mundial, en países tanto desarrollados como en vía de desarrollo, con un aproximado de 92 millones de casos anuales. El inicio de esta infección es asintomática generalmente en un 70% en mujeres y 40% en hombres, por lo cual, puede desencadenar infección crónica, persistencia y llegar a producir cáncer de ovario, dificultando el diagnóstico en las fases tempranas de la infección y por tanto, el tratamiento oportuno, lo cual conlleva a un aumento significativo de casos. La Organización Mundial de la Salud -OMS-, sugiere el uso de antibióticos como tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas; que son muy eficaces pero que hace que se presenten infecciones, debido a que ha demostrado resistencia de los cuerpos elementales y estos antibióticos empleados para el tratamiento hacen que disminuyan los lactobacillus vaginales que son beneficiosos, por lo cual surgen complicaciones en los pacientes. Es por ello, que en esta investigación se plantean tratamientos alternativos de medicina tradicional como terapias que reduzcan la actividad anti-chlamydia, que sean de libre acceso y que no generen daños en los pacientes.

### 3. Marco referencial

#### 3.1. Cultivo celular

En la monografía, Cervantes et al<sup>11</sup>, recomienda el cultivo celular como la técnica gold standard para el diagnóstico de infecciones a causa de este patógeno. El cultivo de *Chlamydia* exige trabajar sobre líneas celulares; éstas son de bajo costo, pero de difícil mantenimiento. La línea celular que se emplea constantemente, es la línea celular McCoy tratadas con cicloheximida, la cual se propaga en una monocapa sobre un cubreobjetos que se inocula con las muestras, luego cuando hay gran cantidad de cuerpos elementales de *Chlamydia*, se infectan las células y crecen en forma de inclusiones citoplásmicas, que posterior a la infección, se pueden visualizar después de 48-72 horas de incubación y se tiñen, por ejemplo con anticuerpos marcados con fluoresceína que se ligan al lipopolisacárido -LPS- de la bacteria, o reconociendo la proteína de membrana externa específica, contribuyendo la observación de las inclusiones al 100% de especificidad.

En la guía de Procedimientos en Microbiología Clínica, Alonso et al<sup>13</sup>, manifiesta que el cultivo celular de *C. trachomatis* tuvo su auge hasta casi principios de 1980 como método diagnóstico, pero luego su uso fue aminorando, al ser reemplazado por otras técnicas más sencillas, rápidas, sensibles y con mayor alcance. Sin embargo, el cultivo celular se ha estandarizado como método de referencia para comparar otras pruebas diagnósticas y es empleado en laboratorios de referencia, ya que sigue ofreciendo múltiples ventajas; como validar nuevos métodos diagnósticos, evaluar la viabilidad del microorganismo, obtener cepas para su posterior caracterización, producción de antígenos, es usado en pruebas de sensibilidad a antibióticos, resistencia de péptidos antimicrobianos, ensayos clínicos de eficacia de tratamientos, entre otros. Pese a esto, los cultivos poseen inconvenientes en cuanto sus técnicas exigentes, el período de incubación que tarda varios días, y que el personal debe estar altamente calificado. Añadido a esto, este microorganismo es muy lábil, por lo que las condiciones de transporte deben ser óptimas y se debe garantizar que no se rompa la cadena de frío, crece muy lento, y de manera escasa, por lo que se utiliza casi que exclusivamente en laboratorios de investigación y centros de referencia. Se describe que, particularmente, el

serotipo LGV tiene una velocidad de crecimiento mayor que otras clamidias, por lo que no es necesario en la mayoría de los casos la incubación a 35°C durante 3 días.

En la tesis de López<sup>14</sup>, se proponen diferentes líneas celulares para realizar el cultivo, se pueden emplear células MacCoy -fibroblastos de ratón-, HeLa -carcinoma epidermoide humano-, HEp-2 - carcinoma de laringe humano- y BHK-21 -fibroblastos de Hámster-, entre otros. En el artículo de Carrera et al<sup>4</sup>, se plantean diferentes ventajas en cuanto a la implementación de la línea celular HeLa y la línea celular HEp-2. La línea celular HeLa, proviene de células de adenocarcinoma cervical humano, estas han sido consideradas desde su primer aislamiento como la “primera línea de células humanas inmortales”, y han sido ampliamente usadas en investigación en diferentes campos de la medicina por que crecen con gran rapidez de manera agresiva, y cuentan con la ventaja de que se oponen a la apoptosis. Por otro lado, la línea celular HEp-2 proviene de carcinomas epidermoides laríngeos humanos, su primer aislamiento se realizó en ratas jóvenes y cuenta con la ventaja de que posee un metabolismo activo, facilitando su cultivo y su posterior infección.

Para el manejo de *C. trachomatis* el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo<sup>15</sup>, sugiere que es indispensable el uso de laboratorios de nivel 2 y 3; ya que al manejar este patógeno se cuentan con diferentes riesgos que van desde la exposición a mucosas con materiales infectados, inoculación accidental, hasta inhalación de aerosoles con microorganismos. Entre las muestras más patógenas se tienen las secreciones genitales y conjuntivales y los cultivos infectados. En el nivel de seguridad 2 se deben manipular las muestras clínicas, los cultivos y animales que puedan estar infectados, con los serotipos oculares y genitales de la A a la K. En el nivel tres la manipulación de cultivos y muestras clínicas con los serovares del linfogranuloma venéreo L1 Y L3, además si se tienen grandes cantidades del patógeno estas muestras deberán ser manejadas en este último nivel, para evitar la diseminación de aerosoles.

### **3.2 Chlamydia**

En la guía de Procedimientos en Microbiología Clínica, Alonso et al<sup>13</sup>, refieren las especies patógenas para el hombre de la familia *Chlamydiaceae*; *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C.*

*psittaci*, que pertenecen a una división bacteriana muy divergente del resto del árbol evolutivo de las eubacterias. Poseen genomas bacterianos muy pequeños entre 1,04-1,23 Mb -25% del genoma de *Escherichia coli*, son patógenos intracelulares obligados, razón por la cual han perdido ciertas rutas metabólicas como la biosíntesis de aminoácidos o la fermentación anaeróbica. Además, su específico ciclo biológico, elimina la posibilidad de intercambio y adquisición de material genético exógeno.

También se describe la clasificación taxonómica de la familia *Chlamydiaceae* y su discusión a lo largo de los años, esta se basa en el análisis de dos subunidades proteicas del ADNr; la 16s y 23s. Everett y cols, en 1999 indujeron varios géneros de *Chlamydia*; *C. trachomatis*, *C. suis* y *C. muridarum* y *Chlamydophila*; *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. caviae* y *C. felis*, no obstante esta propuesta no fue bien aceptada debido a confusiones en el ámbito de la investigación básica y de Salud Pública. Debido a esto el subcomité de la taxonomía de las clamidias- International Committee on Systematics of Prokaryotes-, recomendó fusionar los dos géneros en uno solo, *Chlamydia*, incluyendo las nueve especies en este, siendo la clasificación actual. La familia *Chlamydiaceae* contiene el único género que es *Chlamydia*, sin embargo en la actualidad con las nuevas técnicas de secuenciación aplicados a indagar sobre la taxonomía bacteriana se han identificado seis familias más al mismo orden; *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, y *Waddliacea*, lo que plantea nuevos cambios taxonómicos.

### **3.2.1 *Chlamydia trachomatis***

En el artículo de Yasser M y colaboradores<sup>16</sup>, hacen mención, de que las clamidias son patógenos causantes de variedad de enfermedades tanto en humanos como en animales, y a su vez, cuentan con diferentes serovares, los serovares genitales causan enfermedades de transmisión sexual, y los serovares oculares causan tracoma cegador.

En la guía de Procedimientos en Microbiología Clínica, Alonso et al<sup>13</sup>, se hace referencia a *Chlamydia trachomatis*, la cual es una bacteria intracelular obligada en los humanos, Gram negativa, inmóvil, posee un ciclo de vida bifásico que se compone de un cuerpo elemental

descrito como la particular infecciosa metabólicamente inactiva -EB- y un cuerpo reticulado replicativo -RB-, considerado una forma no infecciosa pero metabólicamente activa. Esta bacteria se transmite mediante el contacto sexual y se considera un patógeno de importancia clínica, puesto que es causante de diversas patologías como la clamidiasis, linfogranuloma venéreo, tracoma, ceguera infecciosa, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, embarazo ectópico, infertilidad, entre otras<sup>17</sup>, además participa en coinfección con el VIH y otras bacterias como *Neisseria spp.* Anualmente se producen gran cantidad de casos de infecciones de transmisión sexual -ITS- causadas por este patógeno, entre estas, está el linfogranuloma venéreo, el cual se produce por las serovariantes L1, L2 y L3 de esta bacteria, y su incidencia a nivel mundial se encuentra en aumento.

En los últimos años se han investigado acerca de los fracasos terapéuticos en el tratamiento de *Chlamydia trachomatis* con azitromicina, administrada vía oral con única dosis. Dentro de los factores que influyen a esto se encuentra la reinfección, incumplimiento en la administración del antibiótico, intolerancia al mismo y la no detección del ácido nucleico de la bacteria por realizarse el test de cura anticipadamente. A pesar de esto, aún no se tienen razones definidas de los fracasos terapéuticos, es por lo que se necesitan aún más investigaciones al respecto<sup>18</sup>.

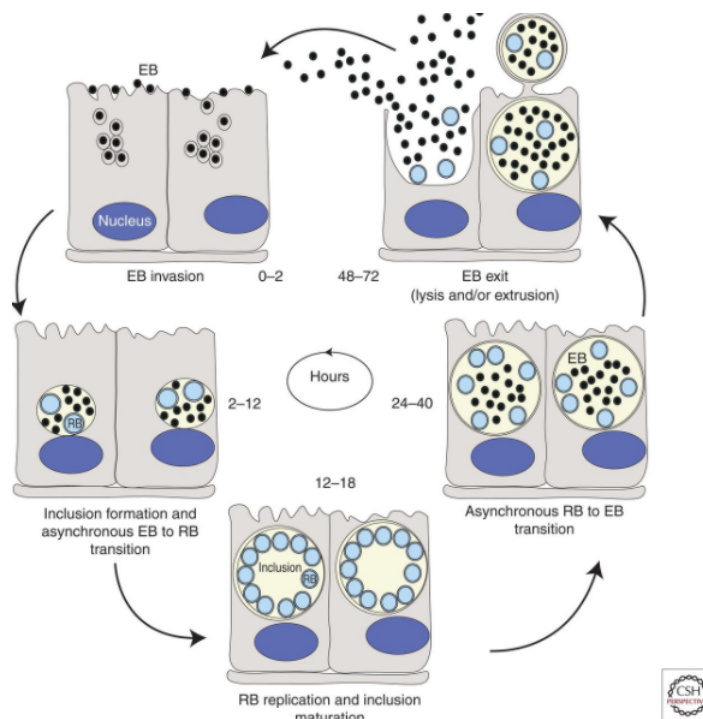
### **3.2.2 Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*.**

En el artículo de Yasser et al<sup>16</sup>, describen que esta bacteria cambia de un estadio a otro, en donde, por un lado, se tiene el cuerpo elemental -EB- y por otro, se cuenta con el cuerpo reticulado -RB-. Los EB's son formas extracelulares, sin actividad metabólica, que se encargan de diseminar la infección ya que pueden tanto adherirse como evadir las células susceptibles. Los EB's se internalizan posterior a la infección en forma de inclusiones, luego se diferencian a RB's que son formas metabólicamente activas, sometándose a ciclos de fisión, que los devuelven de nuevo a EB's cuando la célula huésped se rompe por lisis, infectando así a las próximas células. Cuando se dificultan las condiciones de crecimiento ya sea por respuestas inmunológicas, antibióticos o privación de nutrientes, este ciclo de desarrollo se interrumpe, ocasionando la formación de múltiples RB 's aberrantes, asociado a la expresión continua de genes involucrados con la replicación del ADN.



El cuerpo elemental es la forma infecciosa, pequeña redondeada, mide aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$ , el nucleoide se ubica excéntricamente en el cuerpo celular bacteriano, está compactado en los EB's por la condensación del material nuclear por proteínas bacterianas que hacen las veces de histonas; HctA y HctB. Posee rigidez estructural por la naturaleza altamente reticulada del complejo de la membrana externa. Además, se cree que una capa de proteína dispuesta en forma hexagonal en la superficie interna del complejo de la membrana externa contribuye a la estabilidad celular en los EB 's. Por otro lado, el cuerpo reticulado, se forma del EB internalizado después de que este se diferencia, supera en 1  $\mu\text{m}$  de tamaño al EB, su citoplasma parece granular con ácidos nucleicos fibrilares difusos, no es infeccioso y está delimitado por una membrana interna y externa, su superficie está cubierta con proyecciones desde la superficie bacteriana a través de la membrana de inclusión<sup>19</sup>.

En el artículo de Bastidas et al<sup>20</sup>, se describe el ciclo de desarrollo bifásico de *Chlamydia trachomatis*. En la figura 1 se puede visualizar el ciclo de desarrollo de las dos fases de *Chlamydia trachomatis* y sus tiempos de diferenciación<sup>19</sup>.



**Figura 1 . Ciclo de desarrollo bifásico de *Chlamydia trachomatis*. Tomado de Bastidas et al<sup>18</sup>**

Explicando que en las 2 horas posteriores a la entrada de los EB's en las células, los cuerpos elementales se fusionan para elaborar la inclusión, luego entre 2 y 6 horas que ha ocurrido la internalización los cuerpos elementales comienzan el proceso de diferenciación a cuerpos reticulados, pasadas las 12 horas, se observa que los cuerpos reticulados se dividen por fisión binaria, entre las 18 y 24 horas, se alcanza el punto máximo de diferenciación, hasta que se produzca lisis o liberación entre las 48 y 72 horas, lo cual va a depender de la especie de clamidia.

En la guía de Procedimientos en Microbiología Clínica, Alonso et al<sup>13</sup>, explican las tres fases del ciclo biológico la primera es la penetración del cuerpo elemental, que ocurre cuando los EB's se adaptan al medio extracelular con ayuda de la cisteína, la proteína MOMP, en conjunto con Omp2 y Omp3 forman puentes disulfuro, dándole la rigidez y escasa permeabilidad característica de los EB's; esto requiere la penetración al interior de la célula eucariota para continuar su ciclo biológico. Es necesaria la adhesión de las células a la bacteria antes de la fagocitosis. *C. trachomatis* tiene más afinidad por macrófagos, y los patotipos de tracoma de *C. trachomatis* tienen más afinidad hacia células epiteliales de mucosas. La segunda etapa es la multiplicación del RB mediante fisión binaria, ocurre en el interior del fagosoma, después la diferenciación del EB a RB cuando ocurre la síntesis proteica y la transformación de la MOMP, abriéndose poros que permiten el paso de ATP y nutrientes; pasadas las 12 horas postinfección, todas las bacterias intracelulares están en forma de RB, produciéndose un crecimiento exponencial dentro del fagosoma, luego el ciclo concluye y se diferencian de nuevo a EB, formando una inclusión madura. Finalmente, durante la última etapa, ocurre la liberación de los EB's, estos son detectados en el medio extracelular tras la lisis de la célula hospedadora, esta lisis se produce como consecuencia de la liberación tardía de enzimas lisosomales así como por la acción de una proteasa de origen clamidial.

### **3.2.3 Manifestaciones clínicas de *Chlamydia trachomatis***

*Chlamydia trachomatis* es considerada la bacteria más común en causar infecciones de transmisión sexual y dentro de los cuadros clínicos que presenta, se encuentran uretritis, cervicitis<sup>17</sup>, enfermedad pélvica inflamatoria, epididimitis y proctitis. Con frecuencia la infección cursa de forma asintomática en la mayoría de mujeres; sin embargo en las mujeres produce cervicitis y pueden presentar algunas manifestaciones clínicas como el flujo vaginal, dolor pélvico o abdominal, sangrado o disuria. La disuria en un 35% de los casos conduce a uretritis y en el resto de casos se puede presentar como piuria o disuria con un cultivo negativo. Además de esto, se pueden presentar otros cuadros clínicos en las mujeres como endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria o abscesos en las glándulas de Bartholin<sup>11</sup>.

La infección en los hombres puede cursar con manifestaciones clínicas como la uretritis no gonocócica, que presenta ausencia de descarga a una descarga purulenta. También se pueden encontrar pacientes asintomáticos que equivalen a más del 50% de los casos; en hombres heterosexuales, se presentan infecciones uretrales o en algunos casos, se pueden presentar algunas complicaciones como epididimitis o infección en los ductos espermáticos de los testículos<sup>13</sup>. De manera más general, las infecciones que causa *Chlamydia trachomatis* se pueden dividir en tres grandes grupos: el tracoma, las infecciones óculo-genitales, incluida la infección perinatal y el linfogranuloma venéreo<sup>11</sup>.

El tracoma se presenta como una conjuntivitis folicular crónica, endémica en más de cincuenta países, ubicados en las regiones rurales de África. El tracoma es causado por los serovares A, B, Ba y C de *Chlamydia trachomatis* y se compone de dos etapas: la fase aguda que se presenta con mayor frecuencia en niños, con un periodo de incubación que perdura entre los 5 a 12 días, caracterizada por conjuntivitis folicular del párpado superior, además se acompaña de una descarga mucoide o mínimamente acuosa. La fase aguda tiende a desaparecer espontáneamente pero se presenta coinfecciones con otros microorganismos como *Haemophilus influenzae* y *Molluscum contagiosum*, que pueden incrementar la inflamación causando hinchazón y edema en el párpado, es importante prestar atención a esta fase, ya que es el primer signo de la enfermedad y si no se trata de forma adecuada y oportuna, puede evolucionar a fase crónica. En la fase crónica que se ve con mayor frecuencia en adultos jóvenes, se presentan cicatrices capaces de deformar el párpado y las

pestañas entran en contacto con el globo ocular dando lugar a triquiasis. Como consecuencia de la fase crónica se genera la pérdida de visión y ceguera en los pacientes<sup>11</sup>.

Dentro de las infecciones óculo genitales, los serovares D-K de *Chlamydia trachomatis* y en algunas ocasiones el serovar B y Ba. Se puede diferenciar las infecciones en el hombre como; uretritis y sus complicaciones como epididimitis y artritis reactiva incluyendo el síndrome Reiter, proctitis y conjuntivitis, y en las mujeres es común encontrar infecciones como; cervicitis y sus complicaciones como endometritis, salpingitis y peritonitis o perihepatitis, proctitis, uretritis y conjuntivitis, en el caso de las mujeres en estado de embarazo se pueden encontrar partos prematuros e infecciones en el recién nacido, como conjuntivitis y neumonía<sup>11</sup>.

La infección perinatal, afecta en primera instancia las membranas mucosas de los ojos, causando conjuntivitis de inclusión que se desarrolla de 5 a 12 días después del nacimiento. Esta se produce después de estar en contacto con la bacteria en el cuello del útero de la madre infectada. Se puede observar una inflamación en la conjuntiva junto con un exudado claro o mucopurulento, se resuelve pasados los 3 a los 12 meses; sin embargo, la infección subclínica puede perdurar por algunos años<sup>11</sup>.

### **3.3 Linfogranuloma venéreo**

El linfogranuloma venéreo LGV es una enfermedad de transmisión sexual emergente en hombres que tienen sexo con hombres, que es causada por los serovares de *Chlamydia trachomatis* L1, L2 y L3, y los genovariantes de L2, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, y 2g. Se puede originar una infección a nivel sistémico, que se puede analizar tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo; esta infección conlleva a la invasión de los nodos linfoides, lo que produce linfadenitis y es posible diferenciar tres fases: La primera que se caracteriza por lesiones ulcerativas y se presenta de 3 a 30 días después de tener una práctica que involucre un riesgo, la segunda fase, se caracteriza por las linfadenopatías inguinal eritematosa y dolorosa que usualmente es unilateral y se presenta y la tercera fase, incluye complicaciones más severas como engrosamiento hipertrófico crónico con ulceración de los genitales externos que puede llegar a elefantiasis e infertilidad. Es importante tener en cuenta el

diagnóstico diferencial de otras infecciones también de transmisión sexual como la sífilis, el herpes simplex, algunas enfermedades inflamatorias intestinales y linfomas <sup>21</sup>.

Con respecto a la bibliografía consultada anteriormente, se puede evidenciar que guardan total relación con el objetivo de la investigación ayudando a su profundización, de igual manera brindan aportes esenciales para entender el contexto de todo el trabajo basándose en los antecedentes teóricos y de campo encontrados a lo largo de las diferentes búsquedas.

## **4. Diseño metodológico**

### **4.1 Tipo y alcance de investigación.**

De acuerdo a la pregunta problema y los objetivos planteados, el tipo de investigación que se realizó en este estudio es de tipo mixto-cualitativo-cuantitativo-, pues el proyecto es de tipo experimental, ya que se busca lograr el mantenimientos de la línea celular HEP-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis serovar L2*.

La investigación es exploratoria, descriptiva y experimental. Es exploratoria, ya que se realiza una búsqueda bibliográfica de las principales características de *Chlamydia trachomatis*, así como de la infección en cultivo de células HEP-2 y una recopilación de protocolos para la recuperación y mantenimiento de cuerpos elementales de *C. trachomatis*, así mismo, se seleccionó el mejor protocolo de mantenimiento celular que se ajusta a las necesidades y posibilidades del semillero de Biotecnología y Genética. Esta investigación es de tipo descriptiva, dado a que se describen las características morfológicas de *C. trachomatis*, ciclo de vida, persistencia, importancia clínica y epidemiológica; y por último, es de tipo experimental, al llevarse a cabo, el cultivo de células HEP-2, la coloración de azul de tripano para determinar la viabilidad celular, la infección de *C. trachomatis* en células HEP-2, la coloración de Giemsa, para observar la morfología celular y de los cuerpos elementales y por último la propagación de los EB's y mantenimiento de la línea celular HEP- 2 infectada con los cuerpos elementales de *C. trachomatis*.

## **4.2 Universo, población y muestra.**

### **Universo**

Líneas celulares y microorganismo asociado a enfermedad de transmisión sexual.-serovar L2-.

### **Población**

La población estudiada en este proyecto son las células HEp-2 neoplásicas inmortalizadas y la población bacteriana intracelular de *Chlamydia trachomatis*, las cuales se conservan en un medio con los criterios tanto nutricionales y ambientales necesarios para su mantenimiento.

### **Muestra**

Células HEp-2 obtenidas de crioviales de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia -FIDIC- y cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 obtenidos del laboratorio del semillero de Biotecnología y Genética de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

### **4.3 Hipótesis.**

Es posible el mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis serovar L2* a partir de un modelo in vivo, que contribuye notoriamente a iniciar procesos de investigación básica sobre este microorganismo; ya que al contar con esta línea celular previamente infectada con los EB's se pueden iniciar los ensayos de interés, desde el proceso de infección y no se tiene la necesidad de comenzar desde el mantenimiento de la línea celular a utilizar, lo cual reduce notoriamente los costos de los ensayos, tiempos de estandarización del cultivo, mantenimiento de la línea celular HEp-2 y la infección de células HEp-2 con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis serovar L2*.

#### **Variables**

##### **Variable dependiente.**

Mantenimiento del cultivo de células HEp-2 -sin infectar, y posteriormente infectadas-, y viabilidad de las células HEp-2.

##### **Variable independiente.**

Número de células HEp-2 para iniciar los cultivos y concentración de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis serovar L* para realizar infección de las células HEp-2.

##### **Indicadores.**

La viabilidad, correcto mantenimiento y desarrollo de la línea celular se puede lograr mediante el método de exclusión de azul de tripano; determinando el número de células vivas y células muertas, la confluencia de las mismas y la coloración de Giemsa, respectivamente.



### **3.4 Técnicas y procedimientos**

Para el desarrollo de la investigación, dentro de los métodos utilizados, se encuentran mantenimiento del cultivo celular, que permite mantener las células en condiciones controladas de laboratorio, conservando sus características fisiológicas y bioquímicas, permitiendo su fácil manejo para trabajos de investigación. También se encuentra, la técnica de azul de tripano, esta es una técnica de exclusión sencilla y rápida que proporciona información acerca de la viabilidad celular, diferenciando las células vivas de las muertas, por medio de un colorante aniónico que es el azul de tripano. Otro de los métodos empleados es la coloración de Giemsa que nos muestra de forma más detallada la morfología celular, utilizando diferentes soluciones y colorantes. Además de esto, se utilizó un protocolo estandarizado para infectar la línea celular HEp-2, con un vial de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis serovar L2*, y demostrar la viabilidad de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales después de su congelación. Finalmente, preservar la línea celular Hep-2 infectada con *C trachomatis serovar L2*.

#### **4.4.1 Preparación y mantenimiento del cultivo de células HEp-2.**

Se realizó el mantenimiento de la línea celular HEp-2, la cual fue obtenida de la Fundación Instituto De Inmunología de Colombia -FIDIC-, por el semillero de Biotecnología y Genética de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y se cultivaron según el protocolo de Castellanos y colaboradores<sup>6</sup>. Fueron preservadas en 5 ml del medio Eagle Modificado Dulbecco -DMEM- suplementado con suero fetal bovino al 20%, se mantuvo una caja de 25 mL en la incubadora al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y posteriormente, se realizan diferentes pases con el fin de continuar manteniendo la línea celular HEp-2, para ello, se retira el medio DMEM de la caja de cultivo y se añade a un tubo de centrifuga falcon estéril, posterior a esto, se realiza un lavado de las células HEp-2 con 1ml de PBS para retirar detritos celulares y células muertas de la matriz de la caja. A continuación, se agrega 1 ml de tripsina a la caja -temperada previamente al baño maría a 37°C- y se deja incubando por 5 minutos. Transcurridos los 5 min, se da un golpe en seco a las células para que estas puedan despegarse de la matriz y se agrega la preparación al tubo falcón con 5ml de medio DMEM

para inactivar la tripsina. Finalmente, se centrifuga el tubo falcon a 1200 rpm por 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet celular.

Para el mantenimiento de la línea celular HEp-2, se realizan constantes pases a nuevas cajas con las condiciones necesarias para su mantenimiento. Para esto, se agregan 5 ml de medio DMEM con SFB al 10%, 10 $\mu$ L de glutamina y la adición de gentamicina a la nueva caja y se agregan 100 $\mu$ L del pellet celular obtenido anteriormente por centrifugación y que no fue congelado y se incuba a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener una óptima confluencia.

Para la congelación de las células en crioviales, se toman 100  $\mu$ l de células del pellet que fue resuspendido en medio DMEM, más 900  $\mu$ l de suero fetal bovino y 100  $\mu$ l de DMSO, en relación 90% SFB y 10% DMSO. El suero fetal bovino al 90% mantiene los nutrientes necesarios para la supervivencia de la línea celular mientras permanece a bajas temperaturas y el DMSO, permite extraer el agua de la célula para evitar la formación de cristales que puedan alterar la viabilidad celular. Finalmente, los crioviales se llevan a congelación y transcurrido un día se pasan a -80°C.

Para la descongelación de los crioviales de células HEp-2 que se encontraban congelados a -80°C se pasan a temperatura de -20°C con el fin de no causar un choque térmico drástico. De igual forma, se prepara medio de cultivo DMEM suplementado al 20% con SFB para garantizar el crecimiento de las células a descongelar utilizando 40 ml de medio DMEM y 10 ml de SFB para un total de 50 ml de medio de cultivo. Posterior a esto, en un tubo falcon se agregan 5 ml del medio de cultivo preparado y se le agrega el contenido del criovial de células HEp-2 congeladas. Se centrifuga a 1.200 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y del pellet obtenido se procede a realizar conteo de viabilidad para evaluar si el proceso de descongelación fue satisfactorio. Por último, conociendo el estimado de células, se agregan a una caja de cultivo nueva con 5 ml de medio DMEM y se incuban a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta conseguir una óptima confluencia.

#### **4.4.2 Coloración con Giemsa de las células HEp-2.**

Se realiza la coloración de Giemsa según el protocolo de Carrera y colaboradores<sup>4</sup>. En primer lugar, se prepara el colorante de Giemsa con la solución amortiguadora, que se compone de la solución A, la solución B y la solución madre. Posterior a esto, se mezclan 2.6 mL de solución A con 0.84 mL de solución B, y 1 mL de solución madre. La mezcla se afora a 30 mL con agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 y finalmente se filtra la mezcla. La coloración se realizó cultivando las células sobre una laminilla de vidrio estéril en placas de 6 pozos. Una vez las células han alcanzado la confluencia ideal, se lavan con PBS estéril tres veces, retirando los posibles detritos y células no adheridas, se fijan con 1 mL de metanol concentrado durante 15 minutos de manera tal que cada pozo quede cubierto, luego de esto se adiciona 1 mL de la solución de trabajo previamente preparada, el cual tendrá una exposición durante un tiempo de 1 hora. Pasado este lapso de tiempo, se procede a retirar el colorante y realizar dos lavados, nuevamente, con PBS estéril, para eliminar completamente los residuos de colorante y por último, proceder a colocar las laminillas sobre una lámina portaobjeto para ser observadas en el microscopio óptico en los diferentes objetivo, 10X, 40X y 100X.

#### **4.4.3 Viabilidad de las células HEp-2, por el método de exclusión Azul de Tripano.**

La viabilidad celular se determina mediante la exclusión con azul de tripano, siguiendo el protocolo de Carrera y colaboradores<sup>4</sup>. A partir del pellet obtenido del cultivo celular, se resuspende en un tubo falcon en 1mL de medio DMEM sin suero fetal bovino, de esta mezcla se toman 20  $\mu$ L y se añaden 20  $\mu$ L de colorante azul de tripán para obtener un factor de dilución de  $\frac{1}{2}$ . A continuación se mezcla correctamente y se añaden 20  $\mu$ L en cada zona de recuento de la cámara de Neubauer, posteriormente se observa en microscopio óptico, y se aplica la siguiente fórmula:

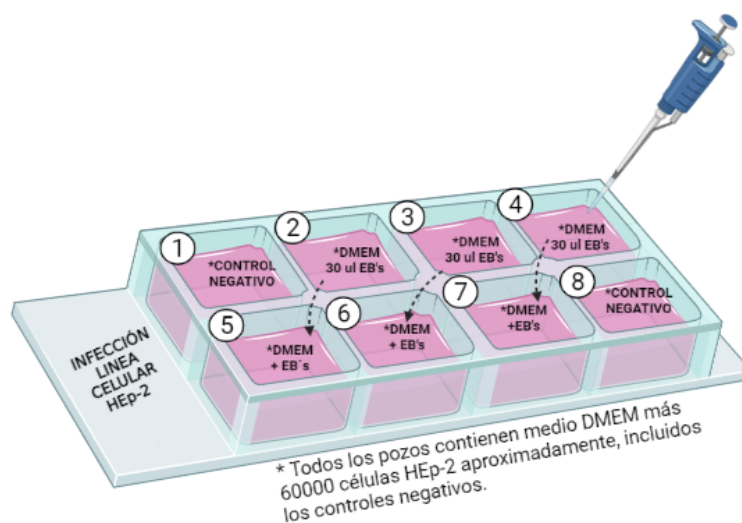
*Viabilidad = Factor de dilución x la profundidad de la cámara x promedio del conteo de los 4 cuadrantes x volumen de suspensión*

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

La infección se realizó siguiendo el protocolo descrito por Castellanos y colaboradores<sup>6</sup>. Las células HEp-2 se siembran en láminas portaobjetos MilliCell EZ Slide con 10% de suero fetal

bovino, al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a 37°C. Posterior a esto, se retira el medio DMEM del cultivo celular con el propósito de determinar la concentración de cuerpos elementales; se realizan tres lavados con el buffer, solución salina equilibrada de HANKS, durante un minuto cada uno, para retirar células muertas y detritos. Las células lavadas con los cuerpos elementales se diluyen en un buffer esteril de Sucrose-Phosphate-Glutamate -SPG.

Finalmente se llevan a incubar los pozos por 1 hora y 20 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior a esto se agregan 300 µL del medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 20%, para obtener así un volumen final de 400 µL en cada pozo. Nuevamente se llevó a incubación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se procedió a cultivar un aproximado de 60.000 células de la línea HEp-2 en cada uno de los 8 pozos dispuestos en la placa de cultivo MilliCell EZ Slide (Figura 2). Al alcanzar la confluencia celular pertinente del 90% a las 24 horas de incubación, se realizó el ensayo de infección celular, donde, los pozos 1 y 8 se utilizaron como controles negativos, por lo que únicamente contenían células en monocapa y la adición de medio DMEM suplementado. Para los pozos faltantes se añadieron 30 uL de cuerpos elementales sobre la monocapa celular y finalmente se mantuvo el cultivo de células HEp-2 durante un intervalo de 72 horas, con el fin de usarlos para propagar simultáneamente los EB's obtenidos tras completar un primer ciclo de infección de *C.trachomatis*, en los pozos 2, 3 y 4. Se evaluaron los pozos a las 24, 48 y 72 horas post infección. Transcurrido el tiempo post infección se retira el medio DMEM de cada pozo, se realiza un lavado de las células con la solución salina equilibrada de HANKS por triplicado y se fijan con dos gotas de metanol al 100% , y se tiñen nuevamente, empleando la coloración de Giemsa.



## **Figura 2. Infección lámina Millicell EZ Slide.**

Se observa la distribución de las Millicell EZ Slide de 8 pozos, donde los pozos 1 y 8 corresponden a los controles negativos mientras que los pozos restantes se dispusieron para realizar el ensayo de infección, por lo cual se les añadió 30 uL de cuerpos elementales de *C. trachomatis*. Todos los pozos contienen células HEp-2 confluentes, mantenidas con medio DMEM suplementado.

### **4.4.5 Propagación de EB's de *Chlamydia trachomatis*, a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.**

Se cultivaron células HEp-2, las cuales al alcanzar una confluencia del 90% fueron empleadas para realizar el proceso de infección, en una placa Millicell EZ Slide. Una vez completado un ciclo de infección con la placa; es decir al transcurrir 72 horas donde los cuerpos elementales se liberan al exterior de la células, se procede a realizar 3 lavados con HBSS por 1 minuto cada lavado, en cada uno de los pozos. Se transfiere el medio DMEM de la placa principal de infección, correspondiente a 400 uL por cada pozo y se deposita en una nueva placa Millicell EZ Slide. Se lleva a incubar por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, para así finalmente comprobar la infección con la coloración de Giemsa.

De igual forma, tanto para la infección de las células HEp-2 con los EB's de *Chlamydia trachomatis* como para la propagación de la línea celular afectada, se determinó la multiplicidad de infección (MOI), que se define en este caso como la capacidad que tiene el EB's para infectar una célula HEp-2, para este se tuvo en cuenta la siguiente fórmula:

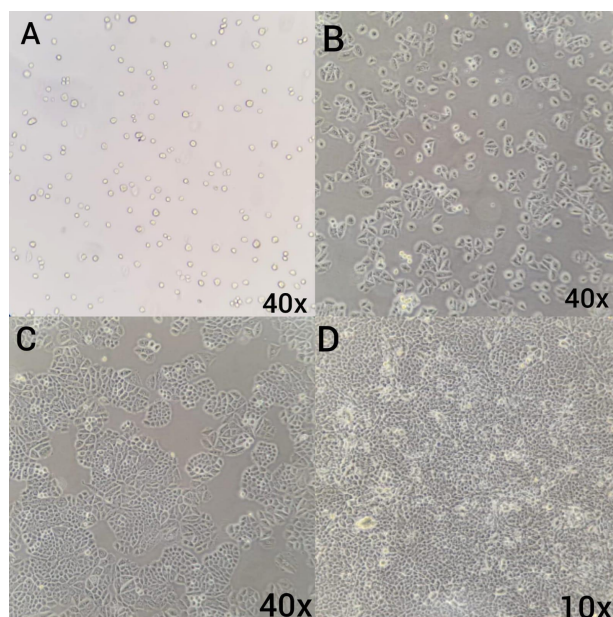
*MOI= Promedio de los EB's observados (tanto intra como extracelulares) dividido el promedio de las células HEp-2 vista en 10 campos observados.*

## 5. Resultados

Con el fin de cumplir con los objetivos planteados en este proyecto de investigación, inicialmente se realizaron cultivos seriados de células HEp-2 para mantener la línea celular, posteriormente estas células fueron visualizadas con la coloración de azul de tripano para evaluar la viabilidad celular, además se realizó la coloración de Giemsa pre y post infección con los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 para detallar la morfología celular y confirmar la infección. Finalmente, se mantuvo la línea celular infectada para propagar los EB's y así mismo, se criopreservó para demostrar la viabilidad y capacidad infectiva de los cuerpos elementales de *Chlamydia*, al pasar por un proceso de descongelación.

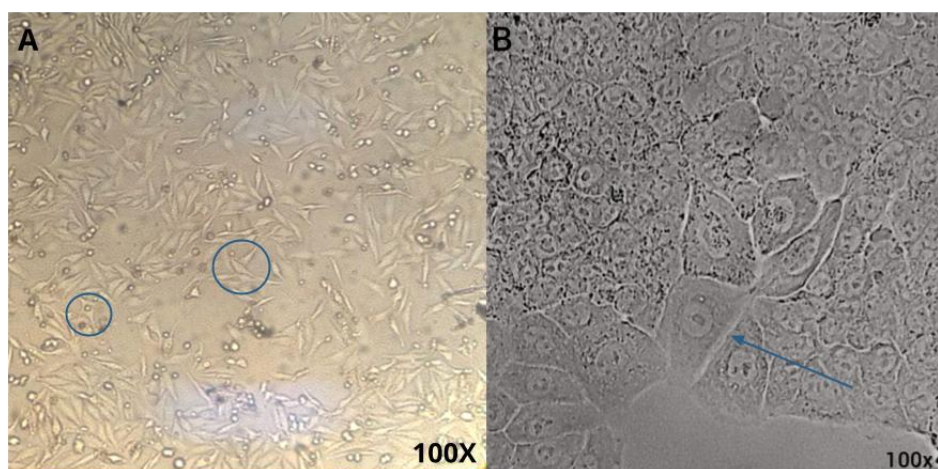
### 5.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular HEp-2.

Para realizar la infección de la línea celular HEp-2 con *Chlamydia trachomatis*, es necesario el mantenimiento de la línea celular posterior a su descongelación, con el fin de poder obtener una confluencia como mínimo del 90% antes de la infección. Las células HEp-2 fueron cultivadas en el medio DMEM, con SFB al 10% y se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El SFB le aportó los factores de crecimiento, hormonas, lípidos, y minerales, entre otros macronutrientes necesarios para el crecimiento, adhesión, y multiplicación celular (figura 3A). Posterior a esto, se observó un crecimiento con una confluencia del 40% a las 24 horas de incubación (figura 3B) y del 70% a las 48 horas (figura 3C), respectivamente. Para este mantenimiento del cultivo se realizó el cambio de medio DMEM en un intervalo de tiempo de 2 días , con el fin de proporcionar y renovar los aminoácidos y vitaminas necesarias para el óptimo crecimiento de la línea celular. Es importante recordar que es imprescindible realizar el cambio de medio para evitar que se pierda la adherencia de las células a la matriz de la caja de cultivo, se desprendan y por tanto disminuyan su viabilidad.



**Figura 3. Confluencia de la línea celular HEp-2 durante su mantenimiento.**

(A) Se evidencian células en suspensión, observadas en objetivo de 40X. (B) Confluencia aproximadamente del 40% a las 24 horas de incubación, observadas en objetivo de 40X. (C) Confluencia del 70% tras 48 horas de incubación, observadas en objetivo de 40X. (D) Confluencia cercana al 100% a las 72 horas de incubación, observada en objetivo de 10X..



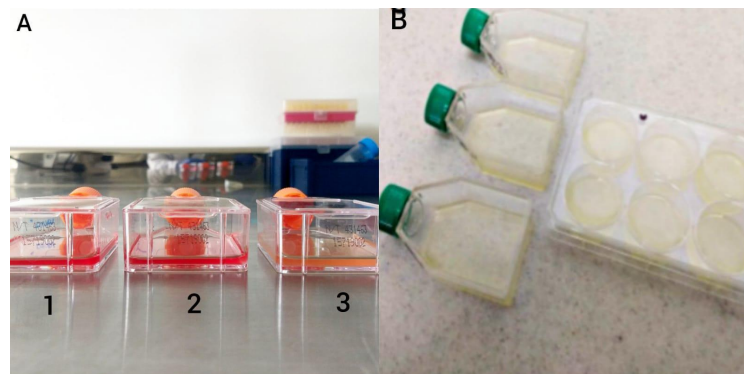
**Figura 4. Morfología de la línea celular HEp-2 durante su mantenimiento.**

(A-B) Se evidencia la morfología de las células HEp-2; el citoplasma, núcleo, nucleolos en objetivo de 100x por medio de un microscopio invertido.

Durante el periodo transcurrido hasta alcanzar la confluencia deseada, se observó un viraje de color en el medio a los 2 días en las dos primeras cajas de línea celular HEp-2. Se incubaron durante los dos días siguientes hasta que las células alcanzaron una confluencia del 100% (figura 3D), mientras que la caja de cultivo número tres se desechó por presencia de

contaminación. A partir de allí se procedió a realizar la congelación de las células con el propósito de establecer un stock celular para posteriores ensayos, incluyendo, los ensayos de infección con *C.trachomatis*.

Teniendo en cuenta, que un viraje de color en el medio está dado por el indicador de pH rojo de fenol presente en el mismo, que vira de rojo a naranja como resultado del metabolismo celular dado por el crecimiento de la línea, se pudo evidenciar visualmente el consumo de nutrientes por parte de las células HEp-2 (figura 5A). Cabe destacar que, el viraje del medio, también puede ocurrir por diferentes factores, incluida la presencia de bacterias que pueden contaminar el medio de cultivo, lo cual hace que este se perciba de color amarillo con un aspecto turbio (figura 5B).



**Figura 5. Viraje del medio DMEM como resultado al metabolismo de la línea celular HEp-2 y otros factores asociados.**

(A) Se visualiza un viraje en la caja de cultivo número 3 más significativo en comparación con las dos cajas de cultivo restantes debido a su pH. La caja de cultivo número 3 presentó un mayor consumo de nutrientes influenciado por su tiempo de incubación de 3 días, en comparación con las dos cajas restantes que tenían sólo 2 días. (B) Se observan células HEp-2 con contaminación bacteriana a las 24 horas de incubación, posteriores al mantenimiento del cultivo celular; se evidencia el viraje de color del medio de rojo a amarillo lo que indica el crecimiento de microorganismos contaminantes.

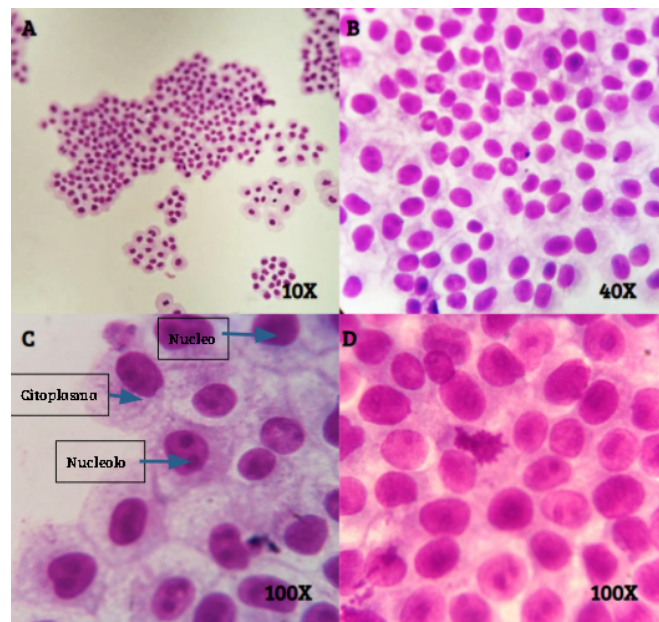
## 5.2 Línea celular HEp-2 teñida con Giemsa.

Posterior al mantenimiento de la línea celular HEp-2, se procedió a realizar la coloración de Giemsa, con la intención de observar detalladamente la morfología celular, para lograr identificar sus estructuras y características más relevantes antes de la infección con los EB 's, recordando que, la coloración de Giemsa, resulta de la mezcla de la solución madre más la



solución amortiguadora, la cual se compone de la solución A y la solución B, aforando finalmente con agua destilada.

Después de optimizar la coloración, se observó la línea celular HEp-2 al microscopio óptico en diferentes objetivos. Se pueden apreciar las células con una confluencia cercana al 40%, donde se pueden identificar el núcleo y el citoplasma claramente diferenciados (figura 6A) a continuación, se observan de manera más detallada las células y se diferencian los nucléolos (figura 6B). Por un lado, el núcleo teñido de fucsia con la presencia de uno a dos nucléolos de un tono más oscuro al núcleo celular, y por el otro lado, el citoplasma de color morado sin presencia de estructuras anexas o precipitados del colorante (figura 6C) . A su vez, fue posible visualizar un aproximado de una a dos células en proceso de apoptosis (figura 6D).



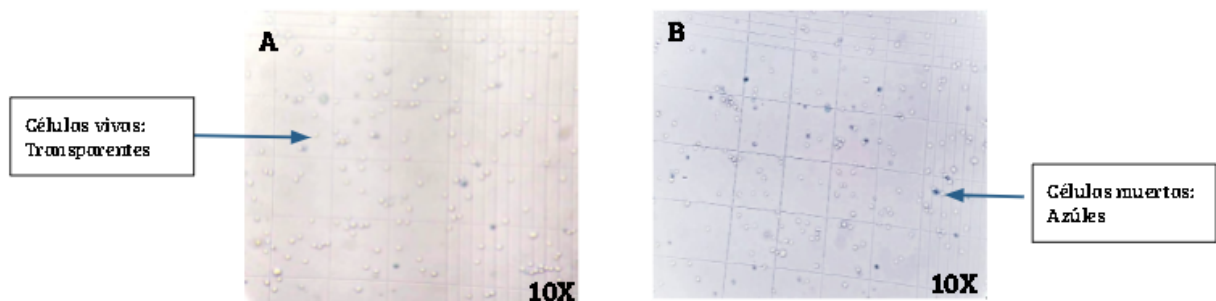
**Figura 6. Morfología de las células HEp-2 teñidas con Giemsa.**

(A) Se visualiza una morfología celular completa, sin modificaciones ni formas anexas en la estructura como inclusiones, artefactos o detritos, las células se observaron en objetivo de 10X .(B) Morfología celular habitual de las células HEp-2 en objetivo de 40X. (C) Citoplasma definido, teñido de color morado y sin presencia de precipitados, núcleos bien delimitados teñidos de color fucsia, que permite observar la presencia de dos a tres nucleolos de un tono mas oscuro en objetivo de 100X. (D) Célula en proceso de apoptosis en objetivo de 100X.

### **5.3 Viabilidad de las células HEp-2.**

El contar con una línea celular viable, favoreció el poder realizar un stock óptimo de la línea celular HEP-2 y así llevar a cabo un protocolo de infección satisfactorio. La técnica de azul tripano, permitió evaluar la cantidad de células vivas -respecto de las células muertas- que se dispusieron para cada ensayo y así mismo contribuyó a la congelación de crioviales viables; lo anterior, partiendo de que las células vivas son aquellas que se observan transparentes y refringentes al microscopio y las células muertas aquellas que se tiñen de color azul; esto debido a que la membrana citoplasmática de las células muertas es fácilmente atravesada por el colorante.

Para el ensayo de infección fue necesario saber cuántas células vivas se debían añadir en cada pozo de las láminas Millicell EZ Slide y así, asegurar una mayor adherencia en las láminas. Siempre se sembraron con una viabilidad superior al 90% lo que permitió obtener una confluencia del 90% con un porcentaje de células muertas inferior al 10%. Antes de cada ensayo, se pudo observar un porcentaje de células vivas del 90% al 95% (figura 7A) , por el contrario, se encontró un porcentaje del 5% al 10 % de células muertas (figura 7B).



**Figura 7. Viabilidad de la línea celular HEP-2.**

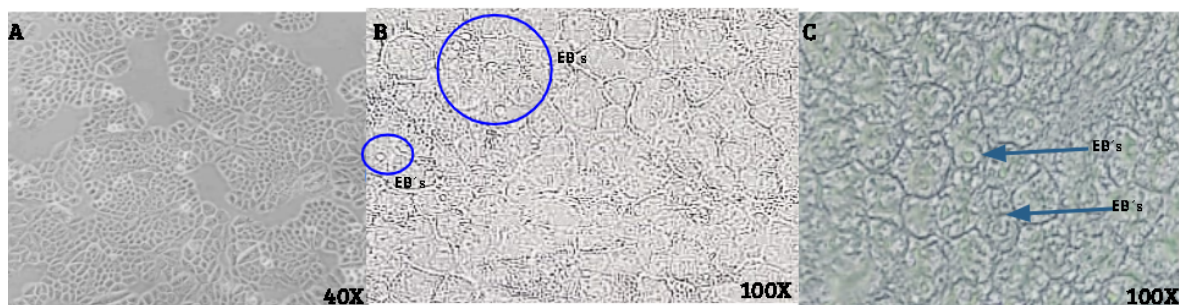
(A) Se evidencia aproximadamente un 90% de células vivas, lo que indica que se puede lograr posteriormente una mayor confluencia en las Millicell EZ Slide, en objetivo de 10x. (B) Se observan mayor cantidad de células muertas respecto a la imagen A, que representa un 10% de las células totales, en objetivo de 10x.

#### **5.4 Infección de células HEP-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar L2.**

Para el proceso de infección, se emplearon láminas Millicell EZ Slide, las cuales permiten extraer la lámina portaobjetos de la cámara donde se realizó el procedimiento, permitiendo ejecutar ensayos posteriores, tales como coloraciones. Se realizó la siembra de células HEP-2 en cada uno de los 8 pozos de la lámina, y respectivamente se añadieron EB's de

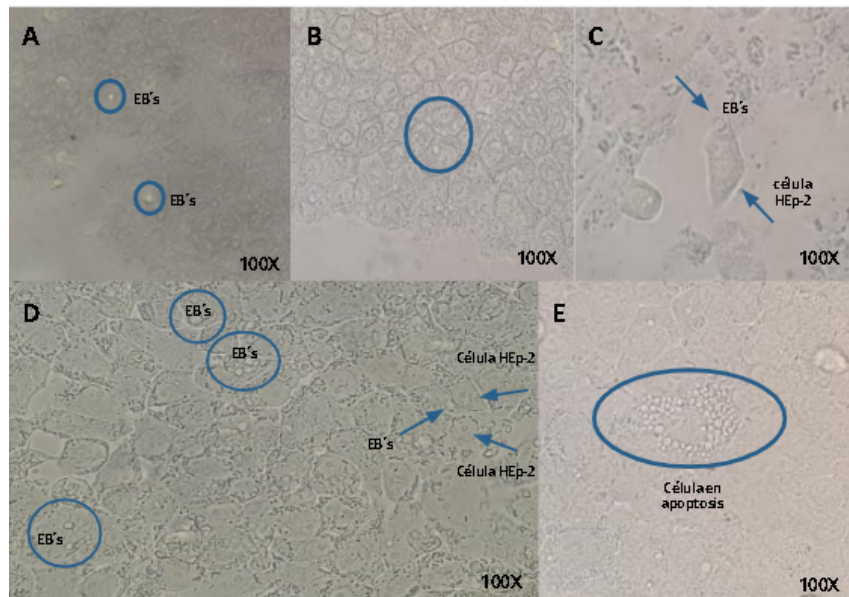
*C.trachomatis* en algunos de ellos para evaluar el protocolo de infección. Este cultivo se monitoreó a las 0 hpi, 24 hpi, 48 hpi y 72 hpi al microscopio invertido, haciendo seguimiento de la confluencia y morfología celular, así como la presencia de estructuras diferentes a la línea HEp-2, específicamente refiriéndose a los EB's.

Posteriormente, se observa que a las 0 horas post infección (figura 8A) se encuentran las células HEp-2 con una confluencia del 90% lo cual indica que las células están en óptimas condiciones para la infección. Transcurridas 24 horas post infección (figura 8B) se pueden observar las células HEp-2 junto con la presencia de estructuras redondas invadiendo el citoplasma celular, identificadas como los cuerpos elementales (EB's) de *C.trachomatis*, lo que corresponde a la primera etapa del ciclo de vida del microorganismo, donde estos invaden las células huésped para posteriormente formar inclusiones y realizar su transición a cuerpos reticulados (RB's). Al cabo de 48 horas de infección (figura 8C), se pueden observar inclusiones maduras RB's, que empezaron su transición de nuevo a EB's, para finalmente, entre las 48 y 72 horas post infección (figura 9) liberar los EB's al medio extracelular y así, continuar infectando más células e iniciar nuevamente su ciclo de vida. En este ensayo se monitorearon todos los pozos de la placa Millicell EZ slide hasta completar 3 ciclos de infección, observando su reproducibilidad.



**Figura 8. Células HEp-2 infectadas con *Chlamydia trachomatis* a las 0, 24 y 48 hpi**

(A). Se pueden visualizar las células HEp-2 antes de ser infectadas 0 hrs, con morfología normal, en objetivo de 40x. (B) Luego se realiza la adición de EB's y por consiguiente, comienza el proceso de infección de las células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis*, por lo que transcurridas 24 hpi, se evidencian algunas células invadidas por estructuras de tamaño pequeño, redondas y refringentes en objetivo de 100x. (C) Se observan células HEp-2 con inclusiones de *Chlamydia trachomatis* en su citoplasma después de 48 hpi a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>; la flecha azul señala una célula HEp-2 cuyo citoplasma se encuentra lleno de inclusiones y estructuras refringentes (EB's), en objetivo de 100x.



**Figura 9. Cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* en la línea celular HEp-2 a las 72 horas post infección.**

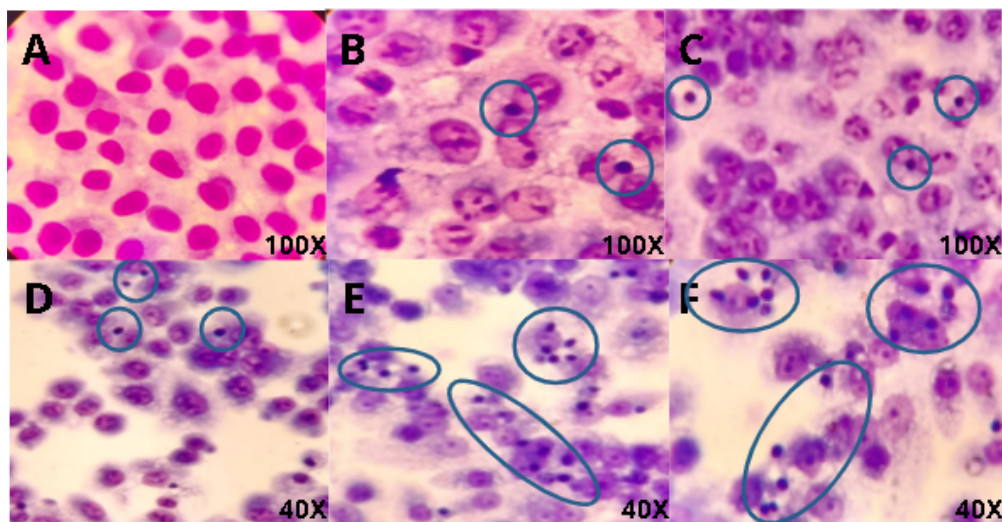
(A-B) Se visualizan las inclusiones de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* a las 72 horas post infección. Los cuerpos elementales se pueden distinguir por su forma circular y refringente en el exterior de las células. (C) Las flechas señalan una célula HEp-2 que presenta en su extremo superior un EB, tanto dentro como fuera de la misma. (D) Algunos de los EB's se pueden visualizar al interior de la célula y la gran mayoría de ellos se pueden observar de forma extracelular en el medio, como se indica en la imagen -círculo color azul-, además de esto se puede reconocer una célula HEp-2 con su respectivo núcleo. (E) Célula en proceso de apoptosis. Estas fotos se tomaron en objetivo de 100x.

#### **5.4.1 Coloración con Giemsa de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.**

Una vez infectadas las células, después de un periodo de 72 horas, los diferentes pozos se fijaron añadiendo 100uL de metanol por 15 minutos para poder colorear con Giemsa y visualizar los EB's a las 0 hpi, 24 hpi, 48 hpi y 72 hpi, y corroborar la infección de la línea celular HEp-2 con EB's de *C. trachomatis* serovar L2, los cuales se lograron visualizar intra y extracelularmente respecto a la fase del ciclo de vida en que se encontraban. Es importante tener en cuenta que entre las primeras 12 a 24 hpi los cuerpos elementales se van a encontrar al interior de las células, mientras que posterior a las 48 y 72 horas, los cuerpos elementales



se encuentran fuera de estas (Figura 10). Teniendo en cuenta lo anterior sobre el ciclo de infección de *Chlamydia trachomatis*, a las 24 hpi se observan gran cantidad de EB's intracelulares (Figura 10B) puesto que estos ya se han adherido a la membrana de la célula huésped e ingresado por fagocitosis el citoplasma de la célula, a las 48 hpi (Figura 10 C-D) se observan EB's tanto intra como extracelulares dado a que la bacteria empieza a expulsar EB's para que infectan nuevas células, y, finalmente, a las 72 hpi (Figura E-F) se puede evidenciar que gran parte de los EB's estarán en el medio extracelular, sin descartar que también se encontrarán en cierta proporción al interior de las células, ya que empiezan a infectar nuevas células para dar comienzo a un nuevo ciclo de vida, y por ende, el número de EB's es considerablemente mayor en relación a las demás horas post infección, 24 hpi y 48 hpi, respectivamente. Cabe destacar que se contó con un control negativo, en el cual, las células HEp-2 sembradas no presentan cambios en su estructura ni morfología, justificado en que no fueron expuestas a EB's de *C.trachomatis* (Figura 10A).



**Figura 10. Coloración de la línea celular HEp-2 con Giemsa post infección.**

(A) Control negativo; células HEp-2 con morfología habitual. (B) Se observan cuerpos elementales al interior de las células HEp-2 a las 24 horas post infección. (C) Cuerpos elementales a las 48 horas post infección, intra y extracelulares. (D) Cuerpos elementales intracelulares a las 48 horas post infección. (E-F) Cuerpos elementales intra y extracelulares a las 72 horas post infección; se puede visualizar más de un EB, alrededor de la misma célula, demostrando que se dió un proceso de replicación en su interior.

También, se realizó el conteo de cuerpos elementales a las 24, 48 y 72 horas post infección con el fin de evaluar la capacidad infectiva de los mismos. El conteo se realizó en un

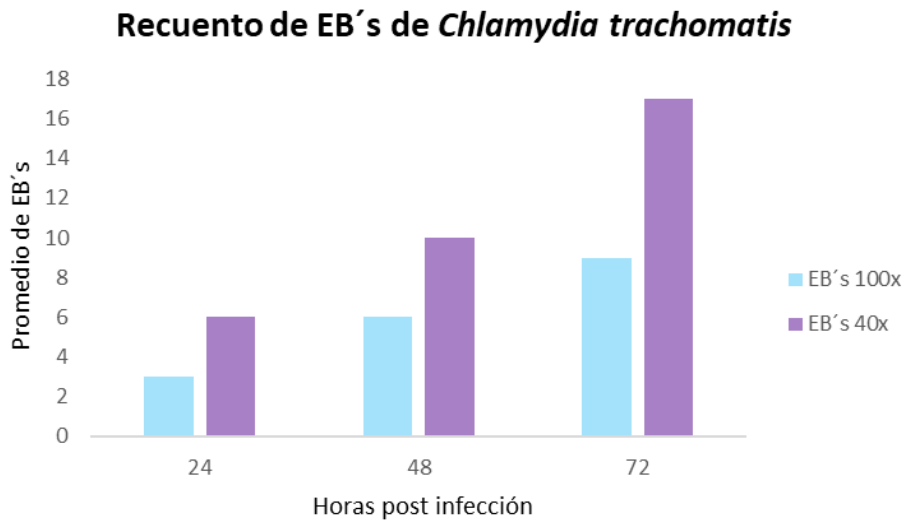
microscopio óptico, haciendo uso de los objetivos de 40x y 100x; este conteo se realizó por triplicado en un promedio de 100 células por campo de 40x y 28 células por campo de 100x, en 10 campos microscópicos observados. Gracias a este conteo se pudo determinar la multiplicidad de infección (MOI) de *Chlamydia trachomatis* frente a las células HEp-2, dónde se determinó que este es de 0.1 a las 24hpi de infección, 0.23 a las 48hpi y 0.36 a las 72hpi. Lo que corrobora que la capacidad infectiva de *Chlamydia trachomatis* es mayor a las 72 hpi, presentándose un aumento significativo, directamente proporcional a la fase de desarrollo del microorganismo (Figura 11), correlacionado con la finalización del ciclo de vida tras el cual se obtiene un mayor número de cuerpos elementales en comparación con el presente al inicio del proceso de infección celular. A continuación se presentan los resultados del conteo de los EB's *C. trachomatis* serovar L2 obtenidos (Tabla 1 - 2).

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

**Tabla 1. 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

**Tabla 2. Conteo de los EB's *C. trachomatis* serovar L2 post infección , visualizados en objetivo de 40x.**

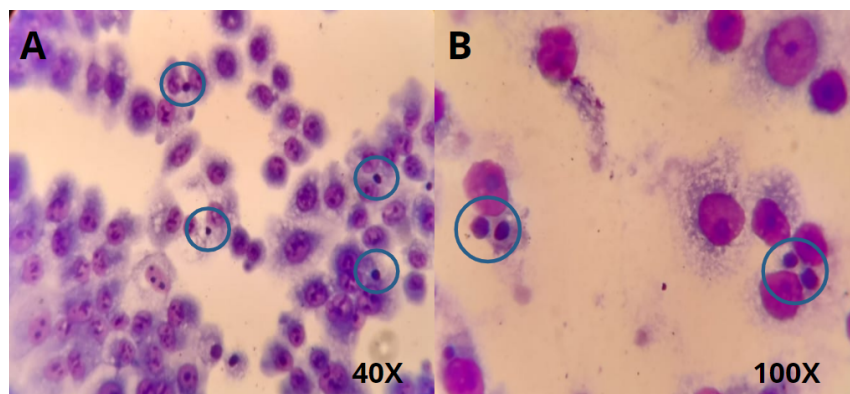


**Figura 11. Gráfica del recuento de EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 después de 24, 48 y 72 hpi**

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

### **5.5 Propagación de EB's de *C. trachomatis* a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.**

Se procedió a infectar una placa Millicell EZ Slide preparada previamente con células HEp-2 confluentes, utilizando el medio sobrenadante obtenido después de completar un primer ciclo de infección celular con EB's de *C. trachomatis*, para evidenciar su propagación, esto, a través de la coloración de Giemsa y efectuando conteo de los EB's presentes, en su mayoría intracelulares, visualizados a las 48 hpi. (Figura 12 A-B).



**Figura 12. Propagación de EB's de *C. trachomatis* a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.**

(A) Se observa la presencia de EB's al interior del citoplasma de las células HEp-2 a las 48 hpi en objetivo de 40X y (B) en objetivo de 100X.

Además, se realizó el conteo de EB's presentes en 10 campos microscópicos en objetivo de 40x y 100x (Tabla 3), lo cual permitió demostrar que es posible propagar los EB's de *Chlamydia trachomatis* a partir de células HEp-2 previamente infectadas, pues se puede observar que estos son capaces de infectar las nuevas células presentando un MOI de 0.2, sin ser necesaria su purificación, dado a que de igual manera, según la hora post infección, se encuentran suspendidos en el medio extracelular sin perder su capacidad infectiva.

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

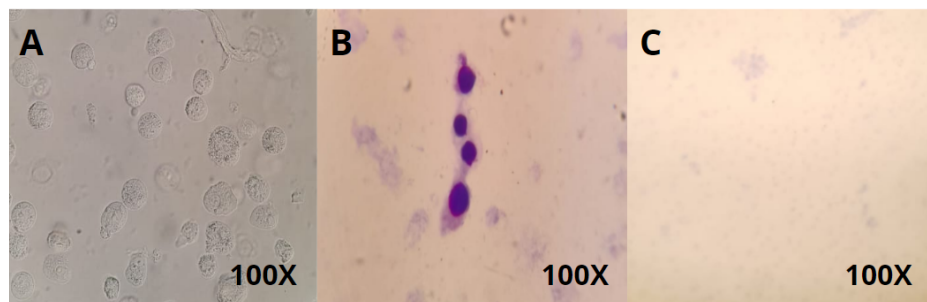
**Tabla 3. Conteo de los EB's *C. trachomatis* serovar L2 tras propagación, visualizados en objetivo de 40x y 100x**

**5.6 Mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con EB's de *Chlamydia trachomatis*.**

Las células HEp-2 infectadas con EB's de *Chlamydia trachomatis*, luego de completar entre uno a dos ciclos de infección y encontrarse en un nuevo ciclo a término de las 48 hpi antes de la liberación de EB's al medio extracelular, fueron congeladas de manera habitual, empleando DMSO al 10% y SFB al 90% para poder ser llevadas a -80°C para su correcta criopreservación manteniendo su viabilidad. Una vez congelada la línea celular HEp-2 infectada con EB's de *Chlamydia trachomatis*, se procedió a descongelar algunos crioviales a fin de evaluar su viabilidad y capacidad metabólica y de adherencia, teniendo en cuenta que al ser congeladas a las 48 hpi se encontraría en su interior la forma infectiva de *C.trachomatis*. De lo anterior, se pudo comprobar que pese a que las condiciones del proceso



de descongelamiento de las células HEp-2 fueron óptimas según lo estandarizado con anterioridad, estas, no tuvieron adherencia a la matriz de la placa de cultivo (Figura 12A), aún con la adición de medio DMEM F-12, suplementado con glutamina al 0.5%, antibiótico y SFB al 20% para iniciar su mantenimiento y proporcionar los nutrientes necesarios para la reactivación metabólica. Sin embargo, se realizó la coloración de Giemsa, con el objetivo de identificar si se encontraban presentes algunas células HEp-2 que hubiesen sido capaces de adherirse en la placa y por tanto, teñirse con el colorante; se demostró, que fue mínimo el número de células que estaban presentes (Figura 12B), sin ninguna inclusión o estructura correspondiente a la presencia de cuerpos elementales, y que incluso, la mayoría de campos se encontraban sin células y únicamente se evidenciaban algunas marcas de colorante (Figura 12C).



**Figura 13. Mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con EB's de *Chlamydia trachomatis* tras ser descongelada**

(A) Células HEp-2 infectadas a las 24 horas post descongelamiento (B) Se observa presencia mínima de células HEp-2. (C) No se observan células HEp-2; a las 24 horas de incubación de las células HEp-2 infectadas que fueron descongeladas, esto en objetivo de 100X.

## 6. Discusión

Con el fin de realizar la infección con EB's de *C. trachomatis* serovar L2 se empleó la línea celular HEp-2, así mismo a lo largo de los ensayos se observó el comportamiento de esta antes, y después de la infección en diferentes tiempos, lo que permitió continuar investigando acerca de las líneas celulares proporcionando así una oportunidad de ampliar futuras investigaciones de cultivo celular partiendo de líneas celulares previamente infectadas.

Para comenzar se realizó el establecimiento de la línea celular HEp-2, en el cual se empleó el medio DMEM/F12 con SFB al 10%, donde se obtuvo una confluencia del 70% al incubar a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> tras 48 horas. En el estudio realizado por Juntinico et al<sup>5</sup> y Carrera et al<sup>4</sup>, se realizó el mismo mantenimiento de esta línea celular con los medios MEM, DMEM-F12 GIBCO, con SFB al 5% y 10%, donde se evidenció una confluencia menor cuando se utilizó el medio MEM al 1% de gentamicina obteniendo una confluencia del 45% en comparación DMEM-F12 GIBCO que tuvo una confluencia del 80% tras 48 horas de incubación. Por tanto se infiere que el medio de cultivo DMEM-F12 aporta una mejor concentración de aminoácidos y vitaminas necesarias para el óptimo crecimiento de la línea celular, con un crecimiento rápido que muestra células con morfología definida, encontrándose una confluencia que fluctúa desde el 70% al 80% empleando condiciones similares tras 48 horas de incubación, lo que permite alcanzar la confluencia deseada para los ensayos de infección. Por otra parte Castellanos y colaboradores<sup>6</sup>, mantuvieron la línea celular en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 20% (Gibco) y agregando gentamicina, hasta alcanzar una confluencia del 90% tras 48 horas de incubación, por lo que se sugiere que el suero fetal bovino mantiene los nutrientes necesarios en el medio para que las células logren una mayor confluencia.

Para hallar la viabilidad celular mediante la exclusión con azul de tripano, se siguió el protocolo de Carrera et al<sup>4</sup>, y se encontró en la literatura que este método se emplea comúnmente para encontrar la viabilidad celular en diferentes ensayos que emplean líneas celulares. En cuanto a la coloración de Giemsa tanto en el artículo de Juntinico et al<sup>5</sup>, y en el de Castellanos et al<sup>6</sup>, se expusieron las células durante 1 hora con 30 partes de solución amortiguadora más 1 parte de solución madre, para este ensayo, se realiza la coloración

de Giemsa según el protocolo de Carrera et al<sup>4</sup> con algunas modificaciones, se corrobora la importancia del tiempo de exposición de 1 hora, con el colorante de Giemsa y la fijación con metanol. Asimismo se visualización las células HEp-2 teñidas al microscopio, evidenciándose el citoplasma definido, núcleo y nucléolos.

De igual forma, se realiza el proceso de infección con los EB's de *C. trachomatis* serovar L2 siguiendo el protocolo realizado por Castellanos et al<sup>6</sup>, con algunas modificaciones, obteniéndose un buen conteo de EB's comprobado a través de la coloración de Giemsa; es importante tener en cuenta que la morfología de las células HEp-2 puede variar un poco luego de la infección. Por otra parte, para continuar con el objetivo de este proyecto fue necesario realizar la infección de las células HEp-2, con cuerpos elementales de *C. trachomatis* serovar L2 para propagar su infección y posteriormente mantenerla. Como se menciona en el artículo de Patrick Engström<sup>33</sup> para propagación de las inclusiones de *C. trachomatis* es importante una buena síntesis de proteínas, sin embargo, no era claro si la replicación era un factor indispensable para la propagación de las inclusiones. En condiciones normales de cultivo celular, la expansión de la inclusión y la replicación bacteriana ocurren en paralelo; sin embargo Patrick y colaboradores<sup>22</sup> utilizaron la línea celular HeLa con medio RPMI 1640, con un MOI de infección del 0.5 para disminuir la fusión de los cuerpos elementales, pues se conoce que si dos bacterias infectan una misma célula, las inclusiones se pueden fusionar; mientras que en el presente estudio se utilizó la línea celular HEp-2 con medio DMEM, con un MOI de infección de 0.3, lo cual implica una menor infección que a la realizada en ese estudio. Además de esto en el artículo de Patrick y colaboradores<sup>22</sup>, utilizaron la glucosa KSK120 añadida al medio RPMI para inhibir el metabolismo de la glucosa, lo cual aseguró tener una expansión de las inclusiones clamidiales, incluso sin la necesidad de tener una replicación bacteriana, caso contrario cuando se utilizó el cloranfenicol, donde este no permitió la expansión de las inclusiones, debido a la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. La replicación bacteriana ocurre en simultánea a la expansión de las inclusiones si el cultivo se mantiene con las condiciones adecuadas, lo cual se hizo en este proyecto y se logró alcanzar una expansión favorable de las inclusiones para realizar la propagación de la infección.

Para el mantenimiento de la línea celular HEp-2 es necesaria la congelación de las células en condiciones específicas con DMSO y SFB al 90% que garanticen la viabilidad de las células aún a temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Ya cuando la línea celular se descongela y se vuelve a cultivar con DMEM y SFB al 20%, las células empiezan a adherirse de nuevo a la matriz de la caja y a reproducirse satisfactoriamente. En este estudio, se esperaba realizar el mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con los EB's de *Chlamydia trachomatis* de la misma manera en la que se mantiene la línea celular HEp-2, pero, como explica Castellanos y colaboradores<sup>6</sup> tras la infección de las células con *Chlamydia*, se evidencia cambios característicos en la morfología de las células que indican la muerte apoptótica y el daño en las células HEp-2, lo cual se ve reflejado en la coloración de Giemsa pues el citoplasma de las células ya no está delimitado y los núcleos y nucleolos quedan expuestos. Esta muerte celular hace que después de congelar las células HEp-2 con EB's de *Chlamydia trachomatis* añadiendo DMSO y SFB al 90%, estas condiciones ya no favorezcan el mantenimiento de la línea celular infectada, puesto que, aunque la bacteria tiene la capacidad de entrar en estado de persistencia ante condiciones adversas, las células perdieron su estabilidad, viabilidad y morfología lo que impide continuar con su mantenimiento. Al momento de descongelar las células HEp-2 infectadas con los EB's y sembrarlas con DMEM + SFB al 20% y glutamina, no fue suficiente para que las células pudieran adherirse a la matriz de la caja y continuar con su metabolismo. Lo que demuestra, que no es posible mantener la línea celular HEp-2 infectada con EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, reduciendo costos y tiempo al momento de realizar investigaciones básicas acerca de *Chlamydia trachomatis*. La viabilidad y capacidad infecciosa de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* queda pendiente por demostrar en futuras investigaciones.

## 7. Conclusiones

- Se deduce que la investigación es adecuada para el cultivo y el mantenimiento de la línea celular HEp-2, para el crecimiento de los cuerpos elementales de *C. trachomatis* serovar L2 pues demostró una buena confluencia, un metabolismo activo y una morfología detallada.

- 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 citoplasma, núcleo y nucleolos y además, reflejó la presencia de EB's como estructuras redondeadas, pequeñas y bien delimitadas de color morado.

- 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, perdiendo su capacidad infectiva, por lo cual la hipótesis que se analizó en este proyecto resulta inviable.

-Finalmente, no se pudo demostrar que los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 posean capacidad infectiva después de descongelarlos pero es un inicio para investigaciones futuras.

## 8. Referencias bibliográficas

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](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/>
11. Cervantes E. Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*. Medigraphif. [Internet] 2009 [citado 19 de abril del 2021]; 52 . Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-1/RFM052000105.pdf>
12. Lara Gutiérrez D, Sánchez Mora R. Tratamientos alternativos de medicina tradicional para *Chlamydia trachomatis* , agente causal de una infección asintomática. NOVA. [Internet]. 2018. [citado 17 de abril del 2021]; 16. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702018000200065](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702018000200065)
13. Alonso R, Galán JC, Gutiérrez J, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Sanbonmatsu S. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia spp.* y especies relacionadas. [Internet] 2012 [citado 05 abril 2021]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf>
14. López E. Estudio de las características del ciclo de desarrollo de *Chlamydia trachomatis* relacionadas con la presencia del plásmido 7.5 Kb. [ Doctor en Ciencias Químico-biológicas]. México D.F: Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2009
15. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. *Chlamydia trachomatis*. B DATABiO [Internet] 2016 [citado 18 abril 2021] Disponible en:

<https://www.insst.es/documents/94886/353495/Clamydia+trachomatis+2017.pdf/471a1569-928f-4c86-938b-9afd06ee360f?version=1.0>

16. Yasser M, Abdel R, Robert J. The *chlamydial* developmental cycle . FEMS Microbiology Reviews. [Internet] 2005 [cited 19 april 2021]; 29 ,Pages 949–959 Available in: <https://academic.oup.com/femsre/article/29/5/949/549012>

17. Lanjouw E, Ouburg S, Vries H, Stary A, Radcliffe K, Unem M. Guía europea 2015 para el manejo de la infección por *Chlamydia trachomatis*. [Internet] 2015 [citado 08 abril 2021]; Disponible en: [http://clinicainfectologica2hnc.webs.fcm.unc.edu.ar/files/2018/03/Guia-Europea\\_Clamidia-trachomatis.pdf](http://clinicainfectologica2hnc.webs.fcm.unc.edu.ar/files/2018/03/Guia-Europea_Clamidia-trachomatis.pdf)

18. Malhotra M, Sood S, Mukherjee A , Muralidhar S, y Bala M. *Chlamydia trachomatis* genital: una actualización [Internet] 2013 [cited 18 april 2021] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818592/>

19. Panzetta ME , Valdivia RH, Saka HA. *Chlamydia* Persistence: A Survival Strategy to Evade Antimicrobial Effects in-vitro and in-vivo. Front. Microbiol. .[Internet].2018. [cited 17 april 2021]. Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03101/full>

20. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. *Chlamydial Intracellular* Survival Strategies. CSH. PERSPECTIVES.[Internet] 2013 [cited 18 april 2021] Available in: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/3/5/a010256.long>

21. Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. Nature Reviews Immunology [Internet] 2005 [cited 05 april 2021]; 5 Available in: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2395/articles/nri1551>

22. Enström E, Bergströma M, Alfaro AC, Syam K, Bahnan W, Almqvist F, Bergströmabc S. Expansion of the *Chlamydia trachomatis* inclusion does not require bacterial replication [Internet] 2015 [cited 18 april 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422115000181#fig0005>