

Perspectivas en investigación: células HEp-2 infectadas con EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar 2 (VR-902B)

HEp-2 Cells Infected with EB's from *Chlamydia trachomatis* serovar 2 (VR-902B): Research Perspectives

Natalia Castellanos Hernández ¹, Yessica Marcela Castañeda Franco ², Paola Andrea Caro Burgos ³, Ruth Mérida Sánchez Mora ⁴

Resumen

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) es una bacteria Gram negativa inmóvil, caracterizada por ser un microorganismo intracelular obligado y por poseer un ciclo reproductivo en el que puede distinguirse una forma infecciosa extracelular metabólicamente inerte (cuerpo elemental - EB's), y una forma no infecciosa intracelular y activa (cuerpo reticulado - RB's). *C. trachomatis* se caracteriza por causar infección en humanos, está relacionada con enfermedades de transmisión sexual e infecciones oculares; por lo que puede conllevar a secuelas de interés, si no se da un tratamiento oportuno. El objetivo de este estudio fue optimizar el modelo de infección de *C. trachomatis* en células HEp-2 con cuerpos elementales (EB's) de *C. trachomatis* serovar L2. Inicialmente, se establecieron las condiciones para el crecimiento adecuado de las células HEp-2 en tiempo y con una confluencia del 90%, para continuar con la optimización de un protocolo de infección. La infección fue confirmada a partir de la coloración con Giemsa permitiendo evaluar características morfológicas tanto de las células HEp-2 sin infectar e infectadas, y así mismo, de los cuerpos elementales de *C. trachomatis*. Finalmente, se corroboró la infección con la técnica de inmunofluorescencia directa que detecta la proteína de membrana MOMP de *C. trachomatis*. Tras los ensayos realizados se evidenció la presencia de cuerpos elementales próximos y dentro del citoplasma celular, así como células vacuoladas y daño celular causado por la infección.

Palabras claves: *C. trachomatis*, cultivo celular, asintomático, infección, persistencia, Giemsa, inmunofluorescencia, HEp-2, LGV.

1. Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia - Batallón BIAMA - Quibdó, Chocó. Bacterióloga SSO.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5542-8739>

2. Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia - Batallón ASPC N° 9 - Neiva, Huila. Bacterióloga SSO.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2248-3934>

3. Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia - Batallón ASPC N° 12 -Montería, Córdoba. Bacterióloga SSO.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7745-4401>

4. Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Líder del semillero y grupo investigación Biotecnología y Genética, UCMC.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0572-8418>

Abstract

Chlamydia trachomatis (*C. Trachomatis*) is a Gram negative unmovable bacterium, characterized by being an obligate intracellular microorganism and having a reproductive cycle in which a metabolically inactive extracellular infectious form (elementary body - EB's) can be distinguished from an intracellular active and non-infectious form (reticulated body - RB's). *C. trachomatis* is characterized by causing infection in humans, is related to sexually transmitted diseases and eye infections, so it can lead to sequelae of interest if timely treatment is not given. The objective of this study was to optimize the infection model of *C. trachomatis* in HEp-2 cells with elementary bodies (EB's) of *C. trachomatis* serovar L2. Initially, the conditions for the adequate growth of HEp-2 cells were established in time and with a confluence of 90%, to continue with the optimization of an infection protocol. The infection was confirmed from the staining with Giemsa allowing to evaluate morphological characteristics of both uninfected and infected HEp-2 cells and also of the elementary bodies of *C. trachomatis*. Finally, the infection was corroborated with the direct immunofluorescence technique, that detects the *C. trachomatis* MOMP membrane protein. After the tests were performed, the presence of elementary bodies nearby and within the cellular cytoplasm was evidenced, as well as vacuolated cells and cellular damage caused by the infection.

Keywords: *C. trachomatis*, cell culture, asymptomatic, infection, persistence, Giemsa, immunofluorescence, HEp-2, LGV.

Introducción

En la última década se han desarrollado una variedad de estudios que giran en torno al uso de modelos de investigación, un ejemplo de ello es el uso de las líneas celulares. Los modelos celulares se establecen como una herramienta del conocimiento en relación con el nivel celular del desarrollo del organismo humano, ya que orienta la comprensión de tres características básicas: patrón particular en cuanto a la síntesis de proteínas, cambios morfológicos adaptativos e información genética contenida en las células, para así poder postular un modelo

efectivo encaminado al desarrollo y producción de conocimiento en investigación. La técnica del cultivo celular ha permitido conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas y patologías en general, constituyendo una herramienta básica de aplicación fundamental en el campo médico o veterinario, en investigación y en la industria farmacéutica, ya que en las diferentes áreas se pretende analizar, describir, explicar, simular y entender un proceso fisiopatológico (1).

La línea celular HEp-2 (Human Epidermoid carcinoma cepa N° 2), también conocidas como Human Epithelioma, fue descrita por primera vez por Moore, Sabachewsky y Toolan en 1952 (2). Esta línea celular se ha empleado para evaluar la infección con *C. trachomatis*, lo que permite realizar estudios en el comportamiento de la infección frente a diferentes áreas del conocimiento. Es una línea metabólicamente activa lo que favorece el cultivo de la misma para su posterior infección. *C. trachomatis* es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada porque carece de habilidad para sintetizar ATP, se caracteriza por causar infecciones de transmisión sexual en humanos, especialmente en poblaciones que se encuentran en edades sexualmente activas (3). En Colombia, se ha reportado una prevalencia del 6% (4).

Las infecciones causadas por *C. trachomatis* están relacionadas con enfermedades como la artritis de inicio temprano e infecciones oculares como el tracoma. Por otro lado, la infección con este microorganismo es de gran importancia en salud pública, por el curso asintomático de la infección, produciendo graves secuelas en mujeres por falta de tratamiento, entre ellas: infertilidad, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), dolor pélvico crónico y la posibilidad de padecer un embarazo ectópico. La infección por *C. trachomatis* se trata con antibióticos; sin embargo, la resistencia al tratamiento ha aumentado, lo que ocasiona persistencia del microorganismo en algunos pacientes (5).

Los cultivos celulares para infectar células con *C. trachomatis*, en la investigación básica, permite estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo, la actividad intracelular, específicamente la transcripción de ADN, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis, el flujo intracelular de biomoléculas, como el procesamiento del ARN, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos; y, en cuanto a genómica y proteómica, el análisis genético, transformación celular, immortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas, entre otros (6). Por lo anterior, en este estudio se optimizó la infección de la línea celular HEp-2 con *C. trachomatis* serovar L2 (VR-902B) como modelo de investigación básica para realizar estudios con este microorganismo, lo que permitirá evaluar diversos factores morfológicos, genéticos, inmunológicos y de tratamiento.

Metodología

Establecimiento del cultivo de la línea celular HEp-2

Las células HEp-2 fueron obtenidas de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) con una confluencia del 80%. Se mantuvieron en medio Eagle's Modificado Dulbecco's (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 20% (Gibco) y agregando gentamicina, hasta alcanzar una confluencia del 90%. Luego se procedió a congelar las células utilizando tripsi-

na + EDTA al 0,25% y suero fetal bovino al 90%. Durante los protocolos se realizó un conteo de viabilidad celular por medio del método de exclusión de Azul de Tripán. La coloración de Giemsa realizada presentó algunas modificaciones, siendo necesario ajustar los volúmenes para apreciar de manera óptima las células. Cabe aclarar que se mantuvo la relación de colorante de 30 partes de solución amortiguadora y 1 parte de solución madre, y el mismo tiempo de contacto. Todos los protocolos que se utilizaron fueron estandarizados por Jutinico y colaboradores (7).

Infección de células HEp-2 con EB's de C. trachomatis serovar L2

El protocolo de infección optimizado fue tomado de Engstrom y col. (8). Inicialmente, las células HEp-2 fueron sembradas a diferentes concentraciones en láminas portaobjetos MilliCell EZ SLIDE, con el fin de determinar la concentración a la cual se obtiene una confluencia óptima del 90%, determinando que al 5% de CO₂ 5% de SFB a 37°C durante 24 horas se obtenía una confluencia del 90%.

Para determinar la concentración de cuerpos elementales necesarios para la infección, se retiró el medio DMEM del cultivo y se realizaron lavados con el *buffer* solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) durante 1 minuto cada uno; esto con el fin de retirar detritos y células muertas. Una vez lavadas las células los EB's diluidos en *bu-*

ffer estéril de Sucrose-Phosphate-Glutamate (SPG se distribuyeron en 6 de los 8 pozos de la lámina, se adiciono una concentración distinta de cuerpos elementales diluidos SPG), partiendo de 10µL, 20µL y 40µL, los 2 pozos restantes fueron empleados como controles negativos de infección. Se les agregó SPG estéril de manera tal que cada pozo se completó a un volumen de 100uL. Posteriormente, se llevó a incubar a 37°C en CO₂ al 5% durante 1 hora y 20 minutos, tiempo tras el cual se agregaron 300uL de medio DMEM suplementado con 20% de SFB a cada uno de los pozos, incluyendo los controles negativos, para un volumen final de 400uL. Esto se llevó nuevamente a incubar a 37°C en CO₂ al 5% y se evaluó a las 24 y 48 horas post-infección (h.p.i). Pasadas las horas post-infección, se eliminó el medio DMEM contenido en cada pozo, se lavaron las células 3 veces empleando HBSS y se fijaron con 2 gotas de metanol al 100% y se tiñeron con Giemsa.

Detección de la infección de HEp 2 con EBs de C. trachomatis por inmunofluorescencia directa

Para corroborar la infección de células HEp-2 con *C. trachomatis* serovar L2 se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa, por medio de un anticuerpo primario policlonal de conejo: "Rb pAB to *C. trachomatis* (FITC) ab21211 dirigido contra la proteína de membrana MOMP de *C. trachomatis*". Las células HEp2, una vez infectadas, fueron lavadas con PBS. Posteriormente,

las células se fijaron a las 24 y 48h.p.i con metanol frío (mantenido a -20°C) al 100%. Luego se adicionaron 50uM de cloruro de amonio durante 5 minutos, con el fin de eliminar las trazas de metanol que no fueron removidas. Enseguida se agregó saponina al 0,1% por 10 minutos, para permeabilizar la membrana celular. Luego se procedió a realizar el bloqueo con una solución de PBS al 1% de SFB durante 20 minutos y se preparó una dilución del anticuerpo 1:100 para adicionar en cada pozo. Se mantuvo la lámina durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C , se retiró el anticuerpo diluido realizando lavados con PBS y se observó en el microscopio de fluorescencia Leica DM2500. Finalmente, se adicionó colorante Hoechst, para tinción de núcleo y nuevamente se realizaron lavados para visualizar cada pozo al microscopio. Las imágenes se capturaron utilizando Leica DFC425 C, con los filtros I3 y A, con rangos de excitación de 565 ± 25 y 360 ± 20 y luz de color Verde y Azul respectivamente.

Evaluación estadística de los datos obtenidos

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó a través del software InfoGram®. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Resultados

Para realizar la infección de las células HEp2 con EB's de *C. trachomatis*, se partió de cultivos celulares óptimos que permitieran el desarrollo del microorganismo. La línea celular HEp-2 fue cultivada con medio DMEM + SFB (*Gibco*) en una atmósfera de 37°C con 5% de CO_2 , la infección se demostró con coloración de Giemsa e inmunofluorescencia directa.

Estructura y morfología de las células HEp-2 sin infectar

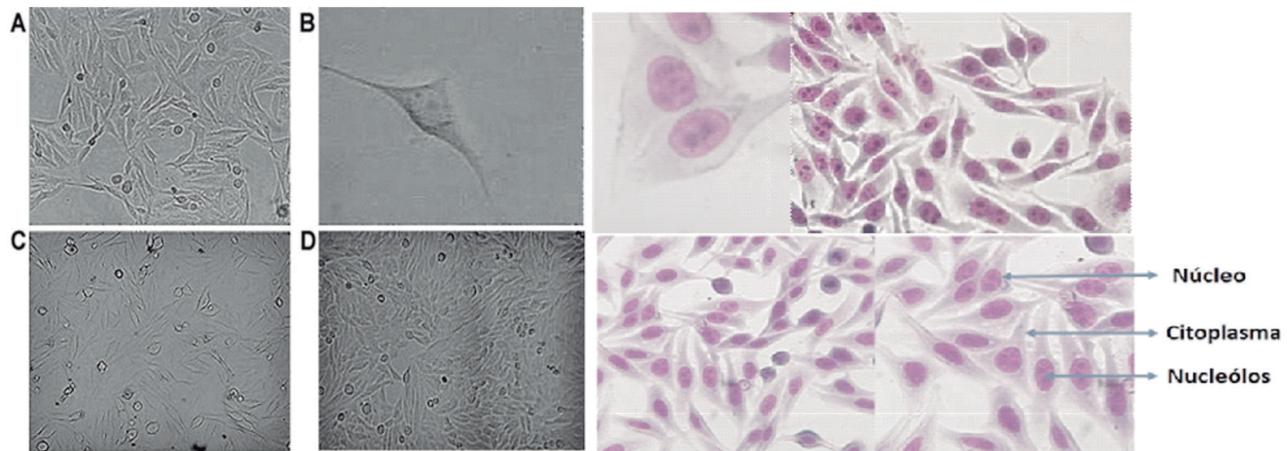
Las células HEp-2 sin infectar fueron visualizadas en un microscopio invertido (*Leica*) en objetivos de 40x y 100x respectivamente, apreciándose células alargadas de forma triangular (ver Figura 1A). Se observó claramente el citoplasma bien definido, núcleo de gran tamaño con 2 nucleolos prominentes (ver Figura 1B). En los cultivos iniciales se evaluó la confluencia en diferentes tiempos, a las 48 horas se obtuvo una confluencia del 70%, donde se distinguieron islotes de células y campos sin adherencia celular (ver Figura 1C). Posteriormente, a las 72 horas, se logró una confluencia óptima del 90% con pocos campos sin adherencia y sin presencia de detritos ni células muertas, criterios importantes para realizar una buena infección (ver Figura 1D).

Las células fueron teñidas con coloración de Giemsa y visualizadas en un microscopio

pio óptico (*Olympus*), observándose células triangulares típicas de HEp-2 en cultivo, con citoplasmas uniformemente teñidos de

morado sin presencia de precipitados, núcleos fucsias bien delimitados y entre 2-3 núcleos oscuros.

Figura 1. Estructura y morfología de las Células HEp-2 sin infectar.



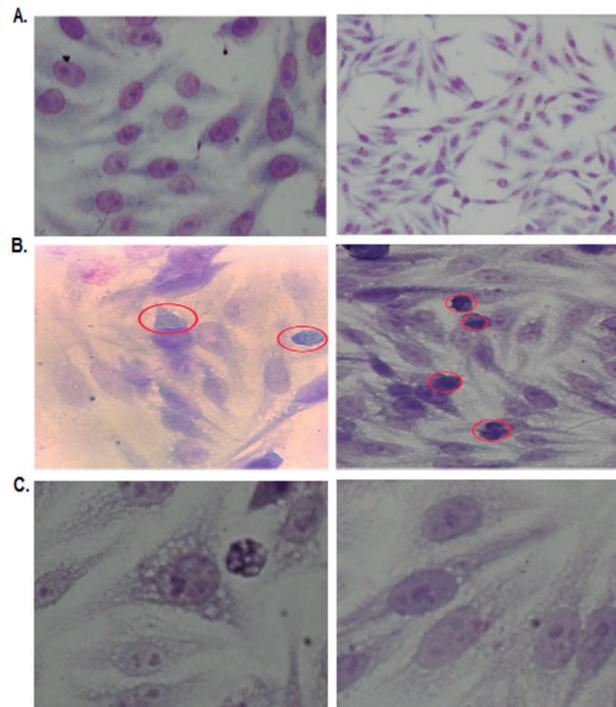
A. Se visualizan células HEp-2 observando su estructura (izquierda objetivo 40x). **B.** Se aprecia el citoplasma, núcleo y nucleolos en el microscopio invertido. **C.** Se observa una confluencia del 70% de la línea celular HEp-2, a las 48. **D.** Se observa una confluencia del 90% a las 72 horas. En la derecha se observan las células HEp-2 teñidas con colorante Giemsa y visualizadas al microscopio óptico para diferenciar su estructura, en distintos objetivos.

Células HEp-2 infectadas con EB's serovar L2 de C. trachomatis y visualizada con Giemsa

Las células de cultivo de tejidos en monocapa (HEp-2) se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 EB's/célula huésped. Una vez infectadas las células se tiñeron con Giemsa y fueron visualizadas en microscopio óptico. En los pozos control (células HEp-2 sin EB's), se observan células completas, con morfología definida, sin daños en las estructuras, sin precipitados ni formas anexas (ver Figura 2A). En los pozos con células infectadas con *C. tracho-*

matis se visualizaron los EB's como formas ovoides con una fuerte coloración morada, intracelulares y próximos a las células (ver Figura 2B). Además, las células presentaron vacuolización y ruptura de las membranas, que sugieren daño celular, (ver Figura 2C).

Figura 2. Las células HEp-2 infectadas y teñidas con coloración de Giemsa.



A. Se observó la morfología celular de los pozos control, células con citoplasma completo, núcleos y nucleolos definidos, células adheridas en monocapa y sin cuerpos extraños. **B.** Células infectadas con cuerpos elementales de *C. trachomatis* a las 24 h.p.i. Se visualiza una forma de inclusión intracelular señalizadas con circunferencias rojas. **C.** Células vacuoladas post-infección.

Detección de la infección de HEp-2 con EB's de C. trachomatis por Inmunofluorescencia directa

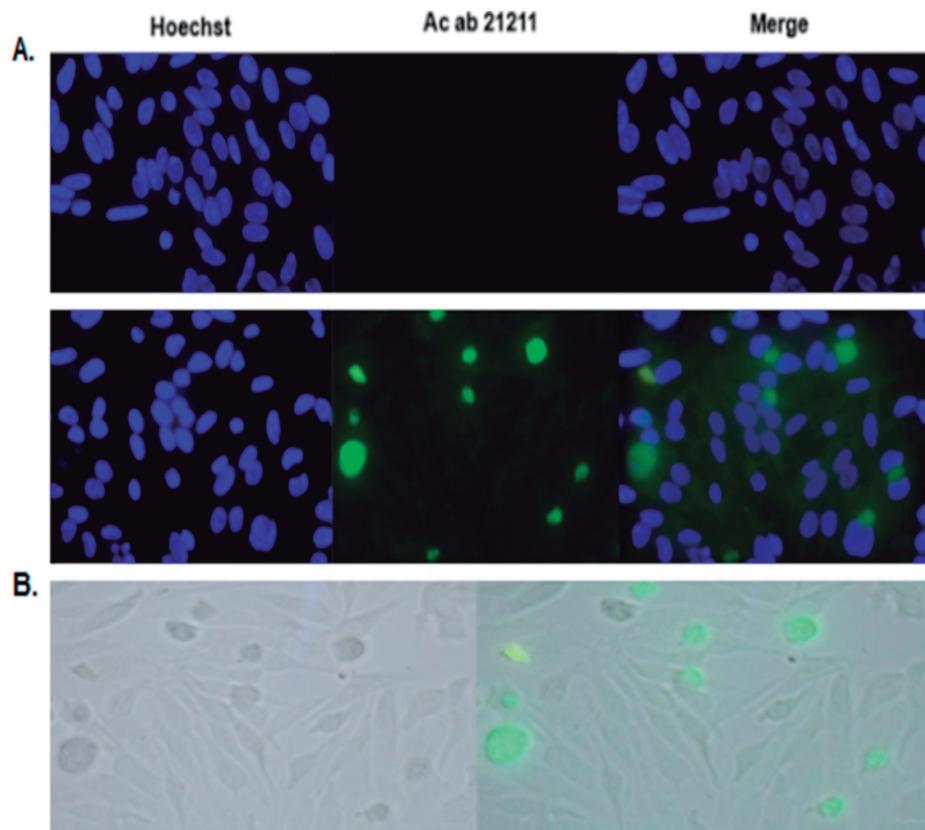
Al ser *C. trachomatis* un parásito intracelular obligado que desarrolla su ciclo de vida dentro del citoplasma, se comprobó la infección por inmunofluorescencia directa utilizando el anticuerpo policlonal *ab 21211* dirigido contra *C. trachomatis*. La evaluación se hizo utilizando el microscopio de fluorescencia *Leica DM2500* y se capturaron las imágenes con el software *Leica DFC425C*. Los pozos con células HEp-2 no infectadas (control) mostraron células con

núcleos teñidos uniformemente de azul por el colorante fluorescente Hoechst (filtro A). No se observó la presencia de EB's marcados con el anticuerpo policlonal (filtros I3 verde), confirmando con el *merge* la ausencia del microorganismo (ver Figura 3A). Por otro lado, las células infectadas, mostraron núcleos de tonalidad azul (Hoechst), se observaron estructuras verde fluorescentes de forma ovoide indicando la presencia de *C. trachomatis* (*ab 21211*). Finalmente, en el *merge* se evidenciaron formas próximas a los núcleos celulares correspondientes a EB's de *C. trachomatis* serovar L2, confirmando la infección (ver Figura 3B).

La infección intracelular de *C. trachomatis* en células HEp-2 se confirmó por la captura de la imagen sin filtros, con luz blanca, donde se pudieron observar células confluentes con EB's ovoides sobre y próximas

a las mismas. Posteriormente, se realizó un *merge* de las células sin filtro y con el filtro I3 donde se observó la fluorescencia dada por el fluorocromo del anticuerpo dirigido a *C. trachomatis* (ver Figura 3C).

Figura 3. Detección de EB's de *C. trachomatis* con Inmunofluorescencia directa sobre células HEp-2 utilizando el anticuerpo policlonal *ab21211*.



A. Control negativo: se observa ausencia de fluorescencia por parte del Anticuerpo *ab21211*, se observan únicamente núcleos teñidos de azul con Hoechst. En las células infectadas se observan estructuras verde fluorescentes sobre citoplasmas celulares y cercanos al núcleo, correspondientes a EB's de *C. trachomatis* reconocidos con el anticuerpo *ab21211*. **B.** Imagen capturada sin filtros (con luz blanca), donde se observan células confluentes con formas de gran tamaño sobre y próximas a las mismas. El *merge* con el anticuerpo se observan estas estructuras clamidiales fluorescentes en el interior de las células.

Discusión

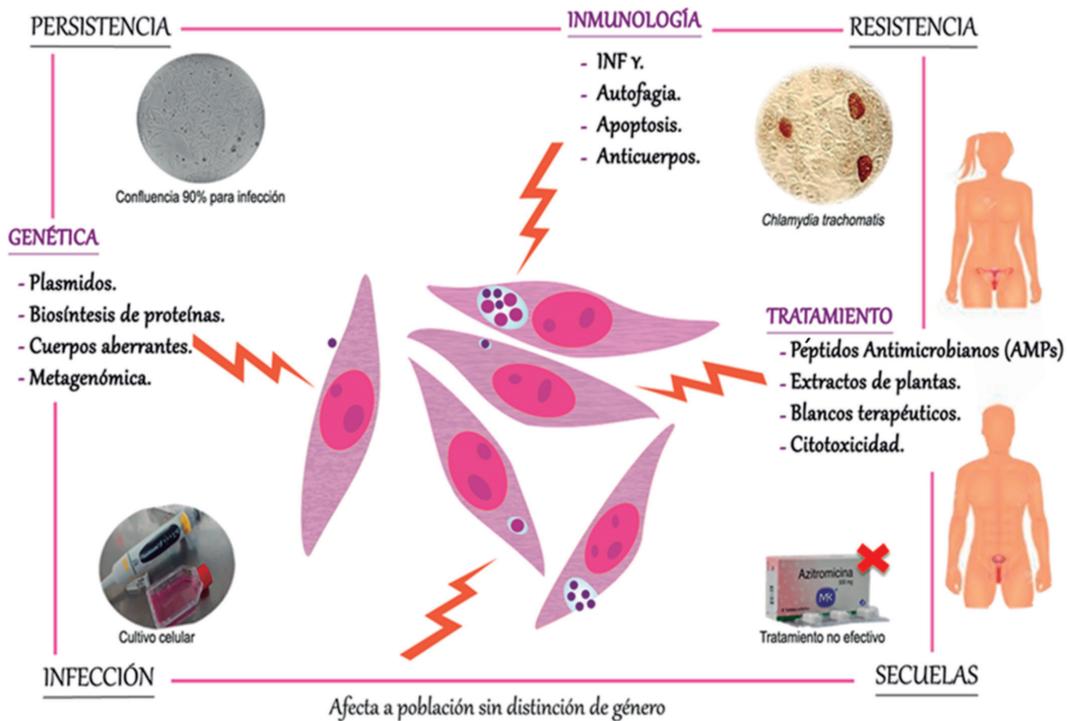
Los modelos de líneas celulares utilizados en investigación permiten simular procesos fisiológicos que dan información y ayudan

a resolver diferentes interrogantes en áreas del conocimiento antes de requerir un modelo *in vivo*; así mismo, el establecer modelos de infección permiten aclarar diferentes interrogantes en investigación. En este es-

tudio se realizó la infección de la línea celular HEp-2 con EB's de *C. trachomatis*, con el fin de contar con un modelo de estudio para futuros proyectos que permitan generar conocimiento sobre los procesos que

realiza esta bacteria intracelular y poder ser empleada en nuevos estudios en áreas como inmunología, genética, procesos de persistencia/resistencia y tratamiento (ver Figura 4).

Figura 4. Perspectivas en investigación sobre *Chlamydia trachomatis*.



C. trachomatis serovar L2, aplicaciones orientadas a diferentes áreas del conocimiento y la investigación tales como genética, inmunología y terapia, considerando aquellos factores característicos del microorganismo en cuestión.

En este estudio, la línea celular HEp-2 fue cultivada en medio DMEM modificando el porcentaje de SFB al 20% y agregando gentamicina a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire para obtener una confluencia del 90% a las 24 horas. En el estudio realizado por Pajaniradje y cols. (9) se reportó que las células HEp-2 se pueden mantener en medio DMEM suplementado con 10% SFB, a 37°C en una incubadora

humificada con una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de O₂, condiciones similares a las establecidas en este estudio. Por otro lado, el estudio realizado por Shubach y cols. (10) mostró que las células HEp-2 pueden ser cultivadas en medio MEM Gibco® y DMEM: F12 en una concentración de SFB entre 5% y 10%, con presencia de glutamina al 1%. Estos estudios muestran cómo los requerimientos nutricionales son de impor-

tancia para establecer el cultivo de la línea celular y generar un crecimiento apropiado que sea requerido en cada estudio propuesto como se observó en los ensayos realizados en este estudio.

El uso de gentamicina como antibiótico, es indicado en cultivos para infección con *C. trachomatis*. Antibióticos como la penicilina y la estreptomycin comúnmente utilizados inhiben el desarrollo de este microorganismo en cultivos. A su vez, es preciso destacar que la gentamicina se utiliza rutinariamente para inhibir el crecimiento bacteriano extracelular; en este caso, *C. trachomatis* al replicarse dentro de una vacuola única donde no se fusiona con organelos endocíticos o lisosómicos, no se encuentra expuesta a daño celular por dicho antibiótico. Por lo tanto, el medio de cultivo suplementado con gentamicina puede usarse sin ningún inconveniente, considerando que la gentamicina no puede cruzar las membranas de mamíferos y no entra en contacto con el cuerpo reticulado, y aunque pueda internalizarse en las células de los mamíferos por pinocitosis, las vesículas pinocíticas tampoco se fusionan con las vacuolas que contienen a *C. trachomatis* (11-13). Así mismo, es fundamental resaltar el trabajo de Coico (14), quien hace mención del uso de gentamicina.

Por otro lado, el uso de soluciones tales como SPG y HBSS no afectan la monocapa celular. La unión células-EB's y la invasión a estas son clave para el desarrollo de *C. trachomatis* y su patogenia. Al presentarse una interrupción puede llegar a ser inhibida la

infección, resaltando la importancia de un cultivo de células confluente y una infectividad EB's-célula adecuada (14).

De igual manera, en estudios donde se realizan procesos de infección, se muestra el uso del SPG para la dilución de cuerpos elementales y como medio de transporte para *C. trachomatis*, y el HBSS para lavados de las monocapas (8, 15, 16) donde se emplean una o ambas soluciones durante el proceso de infección y para el mantenimiento de los EB's, igual a lo realizado en el protocolo de infección en este estudio. No obstante, en otras investigaciones se omite el uso de estas soluciones y los protocolos de infección son modificados en algunos procesos como centrifugación asistida para favorecer la infección (11, 17). Al añadir los cuerpos elementales, estos se incubaron a 37°C sin centrifugación para evitar algún efecto sobre el proceso infección-adhesión celular. Sin embargo, Al-Zeer y cols. (18), de acuerdo a la especie de Chlamydia describen el uso o no de centrifugación como requerimiento para la infección. En este caso, no influyó el realizar un proceso de centrifugación y optar por un proceso de incubación de EB's con células HEp-2 a temperatura de 37°C, según se pudo comprobar al realizar la tinción de Giemsa a las monocapas de células HEp-2 infectadas con el microorganismo.

La infección celular con EB's de *C. trachomatis* es un proceso en donde es importante mantener una infectividad cuerpo elemental-célula. Las inclusiones de *C. trachomatis* pueden fusionarse si dos bacterias infectan

una sola célula huésped, por lo que la detección de *C. trachomatis* por Giemsa se ha utilizado para observar la presencia de inclusiones citoplasmáticas de líneas celulares infectadas con esta bacteria. En el trabajo de Giakoumelou y cols. (19), células estromales del endometrio fueron infectadas con *C. Trachomatis* y los signos de infección se revelaron a partir de inclusiones teñidas de color púrpura mediante la tinción de Giemsa, lo cual se asemeja a este ensayo, dado que los cuerpos elementales son observados de esta tonalidad, próximos a las células HEp-2.

Por otro lado, las células teñidas con Giemsa, tal como lo muestra el estudio realizado por Soysa y cols. (20), tras ser infectadas exhiben cambios característicos en la morfología celular que indican la muerte apoptótica y daño en células HEp-2, al observarse por microscopía óptica después de ser tratadas con el extracto de la planta semecarpus donde se añadió un volumen de Giemsa diluido (1: 9, pH7,2, 5µL) a las células durante 10 minutos (20). Lo que difiere para este caso, ya que tras probar las variables se determinó un tiempo de exposición de 60 minutos añadiendo un volumen de Giemsa (30:1, pH7,2, 300µL) (21). Comprobándose que la tinción de Giemsa es una herramienta útil para poder observar las estructuras celulares y evaluar la infección con *C. trachomatis*.

La técnica de inmunofluorescencia permitió confirmar la presencia de *C. trachomatis* en células HEp-2. Los resultados obteni-

dos se pueden comparar con la tinción de Giemsa en cuanto al tamaño de la partícula infecciosa. En estudios como el de Cochran y cols. (21), donde evaluaron la infección en células HEC1-A con el serovar L2 (VR-902B) de *C. trachomatis* y la demostraron con inmunofluorescencia, los cuerpos de inclusión se observan de gran tamaño (análogo al núcleo celular) siendo similar a lo encontrado en este estudio. De igual manera, el trabajo de Nogueira y cols. (22) en células HaCaT con *C. trachomatis* serovar L2, donde las inclusiones de Chlamydia parecían maduras (22).

El establecer un modelo de infección de *C. trachomatis* abre las puertas para realizar nuevos ensayos en diferentes áreas de la investigación para contribuir al conocimiento científico, aplicándolo en estudios (23-26), como la reducción de tamaño de los RB's al dividirse antes de su conversión a EB's (26) y regulación de la extrusión como mecanismo de liberación de *C. trachomatis* (27).

Perspectivas en investigación sobre C. trachomatis.

Establecer un modelo de infección de *C. trachomatis* permite realizar ensayos en diferentes áreas de la investigación con el fin de contribuir a dar solución a diferentes interrogantes. Este modelo de investigación básica permite realizar diferentes estudios sobre este microorganismo; así mismo, poder evaluar diversidad de factores morfológicos, genéticos, inmunológicos y de tratamiento.

Considerando que este microorganismo afecta a la población sin distinción de género, sexualmente activa, relacionándose con enfermedades de importancia y secuelas dada su persistencia en el organismo y la resistencia a los antibióticos con los que actualmente es tratada (ver Figura 4).

Referencias

- Ramírez N Gloria, Vera A. Víctor J, Villamil J, Luis C. Cultivos Celulares, Elemento Fundamental para la Investigación. Revista Acovez. 2018;24(1).
- Toolan HW. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. No. 1; H.Ep. No. 1; H.Ep. No. 2; H.Ep. No. 3; and H.Emb.Rh. No. 1. Cancer research. 1954;14(9):660-6.
- Instituto nacional de seguridad y salud en el trabajo. Chlamydia trachomatis- Fichas de agentes biológicos- DB-B-C.tr-16 España2016 [cited 2017]. Available from: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Clamydia+trachomatis+2017.pdf/471a1569-928f-4c86-938b-9afd06ee-360f?version=1.0>.
- Cardona-Arias JA, Gallego-Atehortúa LH, Ríos-Osorio LA. Infección por Chlamydia trachomatis en pacientes de una institución de salud de Bogotá y Medellín, 2012-2015. Revista chilena de infectología. 2016;33:513-8.
- MARTÍNEZ T. MA. Diagnóstico microbiológico de Chlamydia trachomatis: Estado actual de un problema. Revista chilena de infectología. 2001;18:275-84.
- ATCC. Chlamydia trachomatis (ATCC® VR-902B™) 2019 [cited 2017 8 abril 2017]. Available from: https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Viruses/Chlamydia_and_Rickettsia/VR-902B.aspx.
- Jutinico Shubach AP, Mantilla Galindo A, Sánchez Mora RM. Regulación de la familia de proteínas BCLL-2 en células infectadas con Chlamydia Trachomatis. Nova. 2015;13:83-92.
- Engstrom P, Bergstrom M, Alfaro AC, Syam Krishnan K, Bahnan W, Almqvist F, et al. Expansion of the Chlamydia trachomatis inclusion does not require bacterial replication. International journal of medical microbiology : IJMM. 2015;305(3):378-82.
- Pajaniradje S, Mohankumar K, Pamidimukkala R, Subramanian S, Rajagopalan R. Antiproliferative and apoptotic effects of Sesbania grandiflora leaves in human cancer cells. BioMed research international. 2014;2014:474953.
- Jutinico Shubach A, Malagón Garzón E, Sánchez Mora R. Cultivo de la línea celular HEP-2: doblaje poblacional y coloración con Giemsa Perspectivas para el estudio de la infección con Chlamydia trachomatis. Nova. 2013;11:23-33.
- Nans A, Saibil HR, Hayward RD. Pathogen-host reorganization during Chlamydia invasion revealed by cryo-electron tomography. Cellular microbiology. 2014;16(10):1457-72.
- da Cunha M, Pais SV, Bugalhao JN, Mota LJ. The Chlamydia trachomatis type III secretion substrates CT142, CT143, and CT144 are secreted into the lumen of the inclusion. PloS one. 2017;12(6):e0178856.
- Derrick T, Last AR, Burr SE, Roberts CH, Nabicassa M, Cassama E, et al. Inverse relationship between microRNA-155 and -184 expression with increasing conjunctival inflammation during ocular Chlamydia trachomatis infection. BMC infectious diseases. 2016;16:60.
- Richard Coico. Current Protocols in Microbiology. 2006 2019. In: Wiley Microbiology & Virology [Internet]. Available from: <https://www.wiley.com/en-co/Current+Protocols+in+Microbiology-p-9780471729242>.

15. Vicetti Miguel RD, Henschel KJ, Duenas Lopez FC, Quispe Calla NE, Cherpes TL. Fluorescent labeling reliably identifies *Chlamydia trachomatis* in living human endometrial cells and rapidly and accurately quantifies chlamydial inclusion forming units. *Journal of microbiological methods*. 2015;119:79-82.
16. Ibana JA, Sherchand SP, Fontanilla FL, Nagamatsu T, Schust DJ, Quayle AJ, et al. *Chlamydia trachomatis*-infected cells and uninfected-bystander cells exhibit diametrically opposed responses to interferon gamma. *Scientific reports*. 2018;8(1):8476.
17. Becker E, Hegemann JH. All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *MicrobiologyOpen*. 2014;3(4):544-56.
18. Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Lauster D, Abu Lubad M, Meyer TF. Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins. *Autophagy*. 2013;9(1):50-62.
19. Giakoumelou S, Wheelhouse N, Brown J, Wade J, Simitsidellis I, Gibson D, et al. *Chlamydia trachomatis* infection of human endometrial stromal cells induces defective decidualisation and chemokine release. *Scientific reports*. 2017;7(1):2001.
20. Soysa P, Jayarathne P, Ranathunga I. Water extract of *Semecarpus parvifolia* Thw. leaves inhibits cell proliferation and induces apoptosis on HEp-2 cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):78.
21. Cochrane M, Armitage CW, O'Meara CP, Beagley KW. Towards a *Chlamydia trachomatis* vaccine: how close are we? *Future microbiology*. 2010;5(12):1833-56.
22. Nogueira AT, Braun KM, Carabeo RA. Characterization of the Growth of *Chlamydia trachomatis* in In Vitro-Generated Stratified Epithelium. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:438.
23. Carrera Páez LC, Pirajan Quintero ID, Urrea Suarez MC, Sanchez Mora RM, Gómez Jiménez M, Monroy Cano LA. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *Nova*. 2015;13:17-29.
24. Gutiérrez DL, Sánchez Mora RM. Tratamientos alternativos de medicina tradicional para *Chlamydia trachomatis*, agente causal de una infección asintomática. *Nova*. 2018;16:65-74.
25. Jutinico Shubach, A., González Devia, J., & Sánchez Mora, R. (2017). Asociación de HSP60 de *Chlamydia trachomatis* y desarrollo de cáncer de ovario. *NOVA*, 15(28), 57 - 68. <https://doi.org/10.22490/24629448.2079>
26. Rodríguez Rojas, F. A., Barreto Ordoñez, P. S., & Sánchez Mora, R. M. (2016). Detección de *Chlamydia trachomatis* en hombres que tienen sexo con hombres en Bogotá: un estudio piloto. *NOVA*, 14(26), 17-27. <https://doi.org/10.22490/24629448.1747>
27. Sherrid AM, Hybiske K. *Chlamydia trachomatis* Cellular Exit Alters Interactions with Host Dendritic Cells. *Infection and immunity*. 2017;85(5).
28. Nguyen PH, Lutter EI, Hackstadt T. *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein MrcA interacts with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3) to regulate extrusion formation. *PLoS pathogens*. 2018;14(3):e1006911.