



SECCIÓN ARTÍCULOS ORIGINALES
Año 2013 Vol. 15(2) Págs. 209 - 217

Comparación del cultivo “*in vitro*” de *Toxoplasma gondii* cepa RH en las líneas celulares Hep-2 y Vero

Comparison of “*in vitro*” culture of *Toxoplasma gondii* RH strain in Hep-2 and Vero cell lines

Liliana Jazmín Cortés¹, Carlos Ariel González², Daniel Alexander Ballesteros³, Yeimy Lizeth Benavides⁴,
Alexandra Zipa Cely⁵, María Carlina Castillo⁶

- 1 Bacterióloga y laboratorista clínico, Esp. en Gerencia de laboratorios, MsC Infecciones y salud en el trópico. Profesional especializado, Grupo de Parasitología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Bogotá - Colombia. e-mail: jcortes@ins.gov.co
- 2 Bacteriólogo y laboratorista clínico. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y laboratorio clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá - Colombia. e-mail: carlos14gonzalez@hotmail.com
- 3 Bacteriólogo y laboratorista clínico. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y laboratorio clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá - Colombia. e-mail: d_ab_d20@hotmail.com
- 4 Bacterióloga y laboratorista clínico. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico, Universidad de Boyacá. Tunja - Colombia. e-mail: yeimyx_86@hotmail.com
- 5 Bacterióloga y laboratorista clínico. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico, Universidad de Boyacá. Tunja - Colombia. e-mail: azipa87@hotmail.com
- 6 Ing. Química - Esp. en Estadística. Profesional especializado, Grupo Producción y Desarrollo tecnológico, Dirección de Producción, Instituto Nacional de Salud. Bogotá - Colombia. e-mail: mcastillo@ins.gov.co

Fecha de recepción: Octubre 15 - 2103

Fecha de aceptación: Noviembre 5 - 2013

Cortés L, González C, Ballesteros D, Benavides Y, Zipa A, Castillo M. Comparación del cultivo “*in vitro*” de *Toxoplasma gondii* cepa RH en las líneas celulares Hep-2 y Vero. *Univ. Salud.* 2013;15(2): 209- 217

Resumen

Introducción: La toxoplasmosis es una zoonosis causada por *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado capaz de replicarse en todas las células nucleadas, permitiendo su aislamiento y mantenimiento en cultivo celular. **Objetivo:** Comparar el cultivo de *Toxoplasma gondii* (RH), en células Hep-2 y Vero empleadas para propagación parasitaria. **Métodos:** Se optimizaron las condiciones para cultivo de *Toxoplasma gondii* (RH), en células Vero y Hep-2; se sembraron 500.000 y 1.000.000cel./mm³ y se infectaron 1.000.000 y 2.000.000taq/mm³ respectivamente, se hizo seguimiento hasta las 120 horas para determinar invasión celular, porcentaje de rosetas, de viabilidad y rendimiento de taquizoitos. **Resultados:** A las 48 horas de incubación se evidenció el 90% de invasión parasitaria en las dos líneas celulares así como el mayor recuento de rosetas; a las 120 horas se obtuvieron los mayores recuentos de taquizoitos extracelulares y un mayor índice de rendimiento de 185,9 en las células Hep-2, en la concentración de 500.000cel./mm³ y 1.000.000taq/mm³. Se obtuvo una viabilidad parasitaria promedio superior al 80% para las dos líneas celulares. **Conclusiones:** Se obtuvo un mayor rendimiento parasitario viable en las células Hep-2 por lo que esta línea celular puede considerarse como el mejor modelo para la propagación y mantenimiento parasitario de *T. gondii* (RH).

Palabras clave: Toxoplasmosis, medio de cultivo, “*in vitro*”, línea celular, prueba de rendimiento, supervivencia celular. (Fuente: Decs Bireme).

Abstract

Introduction: Toxoplasmosis is a zoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, which is an obligate intracellular parasite capable of replicate itself in all nucleated cells, allowing their isolation and maintenance in cell culture. **Objective:** To compare cultivation *Toxoplasma gondii* (RH) in Hep-2 cells and Vero employed to spread parasitic. **Methods:** The conditions were optimized for cultivation of *Toxoplasma gondii* (RH) in Vero and Hep-2 cells lines, 500.000 and 1.000.000cel./mm³ were seeded and 1.000.000 and 2.000.000taq/mm³ were infected respectively, a track to determine cell invasion, percentage of rosettes and viability and efficiency of tachyzoites was made until the 120 hours. **Results:** After 48 hours of incubation, 90% of parasite invasion was evident in both cell lines as well as the largest count rosettes. At 120 hours higher counts of extracellular tachyzoites and a higher rate of performance of 185.9 in Hep-2 cells at concentration of 1.000.000taq/mm³ and 500.000cel./mm³ were obtained. Average parasite viability over 80 % was obtained for both cell lines. **Conclusions:** Higher parasitic performance was obtained viable in Hep-2 cells, so that this cell line can be considered as the preferred model for the propagation and maintenance of *T. gondii* (RH).

Key words: Toxoplasmosis, culture medium, "in vitro" cell line, performance test, cell survival. (Source: Decs Bireme).

Introducción

La toxoplasmosis es una zoonosis que frecuentemente cursa como una infección asintomática en los humanos, sin embargo se pueden presentar diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad en recién nacidos, en niños en sus primeros años de edad y en pacientes inmunosuprimidos.^{1,3} Es ocasionada por *T. gondii*, un parásito intracelular obligado que ha sido empleado extensamente como modelo experimental de los apicomplexas gracias a su fácil reproducción "in vitro", para lo cual se han utilizado diferentes líneas celulares, dentro de las que se encuentran THP1, HeLa, LLC MK2, Hep-2 y Vero. La línea celular Hep-2 se obtuvo en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano, y está caracterizada por poseer un núcleo extremadamente grande comparado con otras líneas celulares.⁴⁻⁶ La línea celular Vero fue aislada en 1962 por Yasumura, a partir de células epiteliales de riñón, extraídas del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).⁷

El diagnóstico de la toxoplasmosis se realiza tanto en forma directa para demostrar la presencia del parásito en líquidos corporales, tejidos y órganos como indirecta a través de la detección de anticuerpos. Los cultivos celulares

se clasifican dentro de los métodos directos de diagnóstico parasitario, siendo una metodología de propagación parasitaria útil para la producción de antígeno excretor-secretor empleado para pruebas serológicas. El cultivo celular es considerado como una técnica fundamental para el desarrollo de modelos experimentales, estudios genéticos, bioquímicos, farmacológicos y para la implementación de pruebas de laboratorio que permitan mejorar el diagnóstico de esta zoonosis.⁸ El cultivo de taquizoitos de *T. gondii* en líneas celulares y la inoculación intraperitoneal en ratones son técnicas que permiten la obtención de antígeno parasitario empleado en las diferentes metodologías de investigación, ensayo y diagnóstico.⁹⁻¹¹

Sin embargo, el cultivo celular se plantea como alternativa de "Reemplazo de animales conscientes por no conscientes o materiales no sensibles".¹² La ventaja del cultivo celular es que provee un gran número de taquizoitos viables, activos y con alta pureza, es decir, con un mínimo de contaminación de células del huésped para la producción de antígeno excretor-secretor.¹³

Por lo anterior, se propone la implementación y optimización del cultivo celular determinando la línea celular más apropiada para la infección con

T. gondii, que permita la obtención de parásitos para suplir la demanda de antígeno comparando los porcentajes de viabilidad y rendimiento obtenidos.

Materiales y métodos

Tipo de estudio: Estudio experimental.

Optimización del cultivo de las líneas celulares Hep-2 y Vero

Las dos líneas celulares Hep-2 y Vero, fueron propagadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) y MEM (Minimum Essential Medium), empleando cajas de cultivo de 25 ml, con suplemento de suero fetal bovino en concentraciones de 10%, 8% y 5%, mezcla de antibióticos-antimicóticos al 1% y L-Glutamina al 1% las cuales fueron incubadas a una temperatura de 37°C en ausencia de CO₂, lo anterior para optimizar las condiciones de cultivo de las células.¹³⁻¹⁶

Mantenimiento "in vivo" de *T. gondii*

Para el trabajo con modelos animales se contó con la experticia de 9 años del investigador principal para el manejo de los mismos, además se siguieron todos los protocolos establecidos en el Instituto Nacional de Salud para el manejo de Biomodelos de Laboratorio.

Por otra parte, como punto final del experimento se estableció el momento en que el ratón presentó las características de una toxoplasmosis como son: inactividad, piloerección, letargia, de tal forma que a partir del exudado peritoneal de este ratón se pudo obtener suficiente cantidad de taquizoítos viables que puedan ser cultivados "in vitro" y que no sea necesario inocular más ratones para aumentar la producción parasitaria. Para determinar este punto final de la forma más oportuna sin que se someta al ratón a un tiempo de sufrimiento más allá del estrictamente necesario para el experimento, se realizó la revisión del ratón tres veces al día.

La cepa RH de *T. gondii* fue mantenida a través de pases sucesivos en 8 ratones machos (2 por semana durante 4 semanas) de 18 días de edad de la cepa ICR-CD1 por inoculación intraperitoneal de exudado peritoneal con 0.4 ml de taquizoítos a una concentración de 1 x10⁶ parásitos/ml, procedente de ratones infectados previamente.¹⁵ Se estableció un grupo de 4 ratones sin inocular como control de signos de normalidad.

A los tres días de inoculados, los ratones presentaron signos de infección toxoplásmica como letargia, pilo erección, hepato-esplenomegalia, además de irritación ocular y en ocasiones diarrea.

Se realizó eutanasia en cámara de CO₂ para la extracción del exudado peritoneal, obteniéndose de cada ratón un promedio de 1.5 ml de exudado y observándose en el microscopio de luz abundantes taquizoítos (12.000.000-15.000.000 taq./mm³).

Cultivo celular, viabilidad celular y parasitaria, invasión celular, recuento parasitario y porcentaje de rosetas

Se realizó el cultivo celular de las líneas Vero y Hep-2 siguiendo las condiciones descritas anteriormente; cuando se observó la formación de la monocapa con una confluencia mayor al 85%, para las dos líneas celulares, se realizó el proceso de tripsinización con el fin de desprender las células de la caja de cultivo y establecer la viabilidad celular realizando recuento con el colorante vital Azul de Tripán en cámara de Neubauer y ajustando a la concentración de células deseada para el experimento.¹⁷

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 12 cm² en dos concentraciones: 500.000 células por mm³ y 1.000.000 células por mm³ (16 cajas de células Hep-2 y 16 cajas de células Vero, respectivamente) en cada caja. Las cajas fueron incubadas con 1 ml de medio

(DMEM y MEM respectivamente) suplementado con suero fetal bovino (5%-10% según lo optimizado para cada línea celular) e incubadas a 37°C en ausencia de CO₂ durante 24 horas.

Después del periodo de incubación de 24 horas, las células fueron infectadas con taquizoitos de *T. gondii* (Cepa ATCC 50174) en dos concentraciones de la siguiente manera: 12 de las cajas sembradas con 500.000 células (Hep-2 y Vero) por mm³ fueron infectadas con una concentración parasitaria de 1.000.000 taquizoitos por mm³ (C1) y las otras 12 cajas sembradas con 1.000.000 células (Hep-2 y Vero) por mm³ se infectaron con 2.000.000 de taquizoitos por mm³ (C2), en una relación 1:2; las 8 cajas restantes (4 de células Hep-2 y 4 de células Vero) fueron empleadas como controles de crecimiento. Posteriormente se incubaron con 1 ml de medio de cultivo (DMEM y MEM) suplementado con suero fetal bovino a 37°C durante 5 días (120 horas).¹⁸

Diariamente se tomaron dos cajas al azar (de cada una de las líneas celulares y de cada una de las concentraciones conocidas) desde el tiempo 0 hasta las 120 horas con el fin de observar "in vitro" en microscopio invertido la invasión parasitaria en el cultivo celular y comparar con el crecimiento de las cajas control. Por otra parte se realizó el recuento extracelular de taquizoitos a partir del sobrenadante de cada una de las cajas de cultivo y la determinación del porcentaje de viabilidad de los taquizoitos obtenidos realizando recuento con el colorante vital Azul de Tripán en cámara de Neubauer.

Del sedimento del cultivo celular infectado se realizó proceso de tripsinización para desprender las células, una vez se inhibió la acción de la tripsina con suero fetal bovino al 5%, se procedió a centrifugar a 950 rpm durante diez minutos y obtener el sedimento, el cual se utilizó para la realización de láminas

que posteriormente fueron coloreadas con la tinción de Romanowsky modificado, con el fin de determinar el porcentaje de rosetas; se definió como roseta, una célula que contenía en su interior más de 8 taquizoitos.¹⁹

Porcentaje de rendimiento

Al quinto día de incubación y luego de tener todas las células lisadas se realizó la determinación del índice de rendimiento. Este se obtuvo dividiendo el número final de taquizoitos extracelulares viables sobre el número de taquizoitos iniciales (índice de rendimiento = número final de taquizoitos / número inicial de taquizoitos). El número de taquizoitos se obtuvo mediante recuento en cámara de Neubauer, obteniendo el promedio de parásitos viables en cuatro cuadrantes por µl de la dilución.²⁰

Resultados

Optimización del cultivo de las líneas celulares Hep-2 y Vero

Línea celular Hep-2: el crecimiento más abundante y con una confluencia superior al 85% se obtuvo cuando fue propagada en medio DMEM, con suplemento al 5 % de suero fetal bovino, mezcla de antibióticos-antimicóticos al 1% y L-Glutamina al 1% e incubada a una temperatura de 37°C en ausencia de CO₂.

Línea celular Vero (Clon E6 ATCC: CRL-1584) de crecimiento en adherencia (confluencia mayor al 85%): las condiciones óptimas de crecimiento fueron obtenidas al ser propagada en medio MEM con suplemento al 10 % de suero fetal bovino, mezcla de antibióticos-antimicóticos al 1% y L-Glutamina al 1%, también se incubaron a una temperatura de 37°C en ausencia de CO₂.

Viabilidad celular y parasitaria

Al realizar la prueba de viabilidad con azul de Tripán, para las dos líneas celulares se obtuvo una viabilidad celular superior al 90%.

Respecto a la viabilidad de los taquizoitos esta fue superior al 80% en todos los ensayos, registrándose el mayor porcentaje de taquizoitos viables a las 96 horas de incubación en las dos concentraciones de células Hep-2 (88%) y a las 120 horas de incubación en las dos concentraciones de la línea celular Vero (90%).

Invasión celular y propagación parasitaria

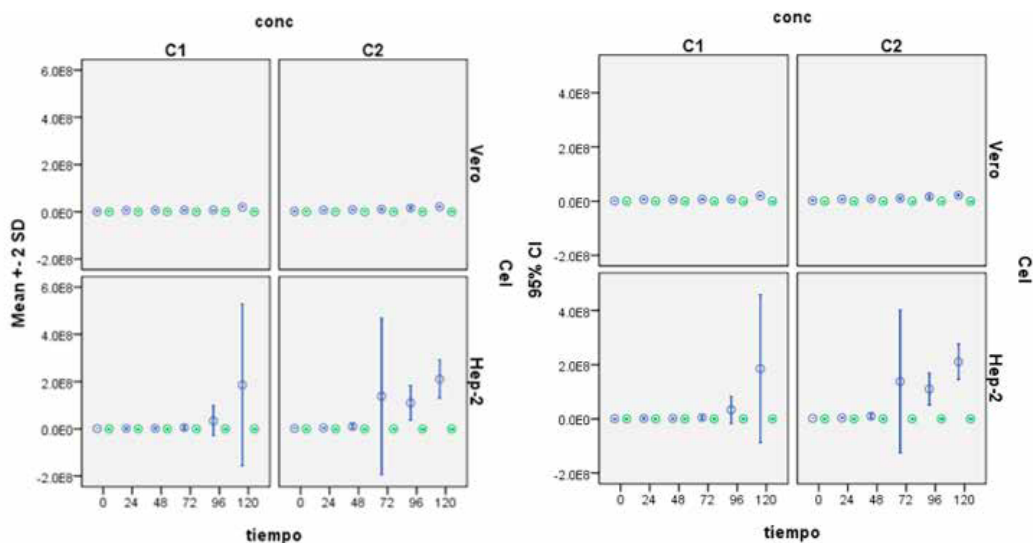
Al observar en el microscopio invertido, se evidencia, para las dos concentraciones C1 y C2 y las dos líneas celulares, más del 90% de células infectadas con taquizoitos a las 48 horas de incubación, tiempo en el que también se evidenció el mayor porcentaje de rosetas.

En cuanto al recuento extracelular de taquizoitos, para las dos concentraciones y las dos líneas celulares se obtuvieron los mayores recuentos a las 120 horas de incubación; para la línea celular Vero el recuento fue de 19.966.667 taq./mm³ (C1) y 21.783.333 taq./mm³ (C2) respectivamente y para la línea celular Hep-2 fue de 185.950.000 taq./mm³ (C1) y 210.975.000 taq./mm³ (C2) respectivamente (Figura 1). El

cultivo de *T. gondii* en líneas celulares tiene como propósito principal obtener una mayor cantidad de antígeno parasitario, con alta pureza y mínima contaminación de células huésped por lo que la comparación del cultivo en estas dos líneas celulares permite establecer cuál brinda un rendimiento parasitario superior a las 120 horas de incubación, tiempo en el que ocurre la lisis de más del 90% de las células.

Apartir de las 96 horas de incubación se observan recuentos mayores en las dos concentraciones de trabajo con la línea celular Hep-2, se resalta que debido a que es una prueba biológica cuyo resultado son valores numéricos altos, los coeficientes de variación de los recuentos extracelulares presentan alta variación y como los recuentos son mayores en el cultivo parasitario con células Hep-2, los coeficientes de variación estimados, son mayores que los valores encontrados con el cultivo en células Vero. Después de las 96 horas, comparación que muestra diferencias estadísticamente significativas a las 96 horas (p=0.013) y las 120 horas (0.003). Figura 1.

Figura 1. Respuesta de *Toxoplasma gondii*: taquizoitos extracelulares (E) y rosetas (R) en las líneas celulares Vero y Hep-2 en las concentraciones C1 y C2 en los diferentes tiempos de incubación, Bogotá, 2013



Porcentaje de invasión parasitaria (rosetas)

Al revisar las láminas coloreadas con Romanowsky modificado, se observa que el mayor porcentaje de rosetas para las dos concentraciones y las dos líneas celulares fue a las 48 horas de incubación; posterior a este tiempo se observó que el porcentaje de rosetas disminuía, debido a la muerte celular por lisis y liberación de los taquizoitos, el porcentaje de rosetas para la línea celular Vero fue del 58% (C1) y 53% (C2) respectivamente y para la línea celular Hep-2 del 11% (C1) y 15% (C2) respectivamente.

Porcentaje de rendimiento

Las condiciones experimentales más favorables que permitieron obtener un mayor índice de rendimiento para las dos líneas celulares en la concentración C1 de 500.000 cel./mm³ y 1.000.000 taquizoitos/mm³, para la línea celular Vero se obtuvo un índice de rendimiento de taquizoitos de 19,96 y para la línea celular Hep-2 se obtuvo un índice de 185,9.

Discusión

T. gondii, por ser un parásito intracelular obligado es capaz de replicarse en todas las células nucleadas, lo que permite su mantenimiento “*in vivo*” mediante el uso de modelos animales e “*in vitro*” en cultivos celulares. Con el fin de humanizar el uso de animales con fines experimentales y de aplicar principio de las tres R, es importante priorizar el uso de la técnica de cultivos celulares para *T. gondii*, metodología que permite, como se menciona en los resultados del presente trabajo, obtener número óptimo de taquizoitos viables para el trabajo experimental.¹⁷ El mantenimiento “*in vitro*” de *T. gondii* el cultivo en diferentes líneas celulares, es un método alternativo para la propagación del parásito, ya que se convierte en una fuente constante de taquizoitos con el máximo porcentaje de rendimiento y viabilidad,

disminuyendo la contaminación con células del huésped en la producción del antígeno y manteniendo las propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas de los parásitos y tiene ventajas para estudios que requieren de un procedimiento libre del efecto de mecanismos inmunes.^{10-12, 14}

Las condiciones de cultivo fueron optimizadas para las dos líneas celulares teniendo en cuenta que las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera libre de CO₂, aunque la mayoría de literatura científica consultada refiere la incubación en atmósfera con 5% de CO₂, el crecimiento celular y parasitario obtenido fue muy satisfactorio, Harmer et. al.^{9,10} describen un estudio en el que se emplea una técnica de cultivo “*outburning*” libre de CO₂ y suero utilizando el medio de cultivo PC-1 con tres partes de medio de cultivo libre de CO₂, obteniendo una gran producción de taquizoitos con un mínimo grado de contaminación.

Algunos estudios describen que confluencias celulares menores al 80% en atmósfera de CO₂ permiten obtener cantidades moderadas de antígeno, en este trabajo se obtuvieron confluencias celulares mayores al 85%, en ausencia de CO₂, lo que permitió obtener un recuento óptimo de taquizoitos viables de *T. gondii* cepa RH.

En estudios anteriores, se describe la evaluación de las diferentes líneas celulares con el fin de definir cuál es más óptima para el trabajo en el laboratorio, concluyendo que cada una de las líneas cumple con unos criterios generales de crecimiento, en el caso de la línea celular Vero, Saadatnia y cols., describen que esta línea permite una mayor tasa de multiplicación parasitaria; por otra parte, Evans y cols. en su estudio, indican que la línea celular HeLa permite obtener una mayor viabilidad de parásitos en los ensayos.^{14, 21} Por último Diab y col. describen las células Hep-2 como la línea celular óptima

para el mantenimiento prolongado de los parásitos con y sin SFB e incubados a diferentes temperaturas.²²

Bilgin y col. desarrollaron un estudio con el fin de investigar la actividad antiparasitaria “*in vitro*” de la Ivermectina y Sulfadiazina, mediante el cultivo de *T. gondii* en células Hep-2, metodología que permitió con éxito el mantenimiento parasitario adecuado y la obtención de antígeno utilizado para pruebas de ELISA.²³

La línea celular Hep-2 ha sido empleada para estudios de farmacocinética de antiparasitarios, Dauci y col. realizaron un estudio para determinar el efecto “*in vivo*” e “*in vitro*” de Claritromicina en *Toxoplasma gondii*, llevando a cabo el cultivo de *T. gondii* en la línea celular Hep-2 y es de resaltar que los resultados obtenidos en este estudio pueden contribuir a establecer las dosis efectivas de este medicamento como alternativa para el tratamiento de toxoplasmosis.²⁴

En el presente trabajo, aunque se obtuvo una cantidad de taquizoitos de *T. gondii* viables al ser cultivados en las dos líneas celulares Vero y Hep-2, el alto índice de rendimiento obtenido permite recomendar la línea Hep-2 como óptima para la obtención de un gran número de parásitos viables para fines diagnósticos e investigativos, en la concentración C1, en la que se observan Coeficientes de Variación menores, esta es una ventaja ya que con menos cantidad de células se obtiene una mayor cantidad de parásitos viables.

Para las dos líneas celulares y las dos concentraciones se observó que la formación de rosetas y el incremento en el número de taquizoitos extracelulares están relacionados inversamente en función del tiempo, como también se concluye en el artículo de Merli et al.,¹⁸ en el que se observa el mínimo recuento de rosetas entre las 72 y 96 horas de incubación con un máximo recuento de taquizoitos extracelulares entre 96 y 144 horas de incubación.

Al hacer el análisis estadístico teniendo en cuenta los diferentes tiempos de incubación se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto para los recuentos extracelulares como para el porcentaje de rosetas, mediante el test posterior de comparaciones múltiples de Scheffé se concluyó que el máximo recuento de extracelulares para las dos concentraciones y líneas celulares se obtuvo a las 120 horas y para el porcentaje de rosetas el máximo recuento para las dos concentraciones y líneas celulares se obtuvo a las 48 horas.

Conclusiones

De los resultados obtenidos se concluye que las condiciones experimentales más favorables corresponden a la concentración de 500.000 cel/mm³, inoculadas con 1.000.000 taq/mm³ para las dos líneas celulares en la que se obtuvo un rendimiento mayor de taquizoitos, lo que permitirá la utilización de un gran número de taquizoitos viables para fines diagnósticos e investigativos.

Al comparar el cultivo de *T. gondii* en las líneas celulares empleadas en este trabajo (Vero y Hep-2) se obtiene un mayor rendimiento parasitario con la línea celular Hep-2, lo que permite recomendarla como la mejor para la propagación y mantenimiento parasitario, además de que se puede cultivar en atmósfera libre de CO₂, lo que facilita su manejo en laboratorios que no cuenten con esta infraestructura.

Respecto al inóculo de taquizoitos de *T. gondii* con el análisis de los datos obtenidos se puede concluir que se obtiene un mayor rendimiento parasitario conservando la relación 2:1 entre parásitos y células.

Estos ensayos permitieron durante todo el tiempo de incubación obtener taquizoitos

viables lo que demostró que si es posible ajustar el método de cultivo “*in vitro*” de *T. gondii* en células Vero y Hep-2 en ausencia de CO₂.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a todas las personas que colaboraron con el desarrollo de este trabajo del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, de la Universidad de Boyacá y a la doctora Heidy Yohana Narváez Ortiz del grupo de investigación en Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Facultad de Ciencias, de la Universidad de los Andes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

- Peña Y, Bernal R, Pavía N. Toxoplasmosis diseminada en niños. informe de dos casos). *Enf Infec y Micro*. 2003;23:149-54.
- Lindsay D, Blackburn B, Dubey J. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. *Parasitol*. 1997;19:448-61.
- Wong S, Remington J. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*. 1993; 7:299-316.
- Cuellar J, Hernández A, Villegas E, Gómez J. Eficiencia de cultivo *in vitro* de *Toxoplasma gondii* en las líneas celulares THP1 y Vero. *Biomédica*. 2012;32:461-66 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.485>.
- Gomes T, de Andrade Júnior H, Zevallos S, Amato-Neto V. In vitro action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against *Toxoplasma gondii*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45:485-90.
- James G, Sintchenko V, Dickeson D, Gilbert Gl. Comparison of Cell Culture, Mouse Inoculation, and PCR for Detection of *Toxoplasma gondii*: Effects of Storage Conditions on Sensitivity. *J. Clin. Microbiol*. 1996;34:1572-75
- Cooper G, Hausman R, Wrigth N. La célula. 5 ed. Madrid: Marbán Libros; 2010.
- Freshney R. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 3 ed. Glassgow: Editorial John Wiley & Sons; 2005.
- Harmer C, Hassl A, Kreinecker S, Aspöck H. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: economic and efficient mass production. *J. Microbiol. Methods*. 1996;27:225-28.
- Harmer C, Aspöck H, Hassl A. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: easy handling long-term propagation. *J. Microbiol. Methods*. 1996; 27:221-23.
- Chatterton J, Evans R, Ashburn D, Joss A, Ho-Yen D. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. *J. Microbiol. Methods*. 2002;51:331-35.
- Osorio A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Rev. Col. Bioética*. 2006; 163-83.
- Degirmenci A, Doskaya M, Ayse C, Candan Ç, Metin K, Yüksel G, et al. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: Production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Exp. Parasitol*. 2011;128:1-8.
- Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop Biomed*. 2010;27:125-30.
- Gallego C, Castaño JC, Giraldo A, Ajzenberg D, Dardé ML, Gómez JE. Caracterización biológica y molecular del aislado CIBMUQ/HDC una cepa Colombiana de referencia para *Toxoplasma gondii*. *Biomédica*. 2004;24:282-90.
- Jones-Brando L, D'Angelo J, Posner G, Yolken R. In vitro inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 4206-08. doi: 10.1128/AAC.00793-06.

17. Sivrikaya G, Bağrıaçık EÜ. Production of *Toxoplasma gondii* in Vero cell culture. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2011;35:61-4. doi: 10.5152/tpd.2011.16.
18. Canessa M, Melioli G. Enzyme Immunoassay for Evaluation of *Toxoplasma gondii* growth in Tissue Culture. *J. Clin. Microbiol.* 1984;21:88-91.
19. Russell W, Burch R. *The principles of Humane Experimental Technique*, London; Methuen & Co Ltda; 1959.
20. Ding J, Wu K, Tan F, Chen XG. Establishment of an in vitro tachyzoite-bradyzoite interconversion system for *Toxoplasma gondii*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010;30:668-71.
21. Evans R, Chatterton J, Ashburn D, Joss A, Ho-Yen DO. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18:879-84.
22. Diab M, El-Bahy M. *Toxoplasma gondii*: Virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. *Exp. Parasitol.* 2008;118:75-79.
23. Bilgin M, Yıldırım T, Hökelek Balkan M. In Vitro Effects of Ivermectin and Sulphadiazine on *Toxoplasma gondii*. *Med. J.* 2013;30:19-22 doi: 10.5152/balkanmedj. 2012.098.
24. Dauci H, Ciler A, Uner A, Aksoy U, Ustun S. In vivo and in vitro effect of Clarithromycin on *Toxoplasma gondii*. *Turk Journal Inf.* 2002;17:325-28.