



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Mantenimiento de *Toxoplasma gondii* en cultivos celulares

*Toxoplasma gondii*: Cell culture maintenance

Autor/es

Mikel Vitoria Sanz

Director/es

María Jesús Gracia Salinas  
Susana Bayarri Fernández

Facultad de Veterinaria

Diciembre de 2016

---

# INDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Justificación y objetivos.....	5
4. Metodología.....	5
5. Resultados y discusión.....	6
5.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	
5.1.1. Generalidades.....	6
5.1.2. Ciclo biológico.....	6
5.1.3. Transmisión.....	9
5.1.4. Toxoplasmosis.....	10
5.2. Mantenimiento de cultivos in vitro	
5.2.1. Generalidades.....	11
5.2.2. Líneas celulares.....	13
5.2.3. Medio de cultivo.....	14
5.2.4. Contaminación y viabilidad celular.....	15
5.2.5. Ventajas y desventajas de los cultivos celulares.....	16
5.3 Mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	
5.3.1. Introducción.....	16
5.3.2. Cultivo celular de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
5.3.3. Protocolo de cultivo <i>Toxoplasma gondii</i> en la línea celular Vero.....	20
6. Conclusiones.....	23
7. Valoración personal.....	24
8. Bibliografía.....	24
9. Anexo: Metodología.....	31

## **1. Resumen**

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular capaz de multiplicarse en cualquier célula nucleada y con una amplia distribución mundial. Su impacto es tal que se estima que un 30% de la población humana es seropositiva. Puede diseminarse fácil y rápidamente por el organismo alcanzando lugares privilegiados, como es el cerebro o los ojos, en los cuales podría generar lesiones como corioretinitis o meningoencefalitis, además de desórdenes como esquizofrenia, cambios de conducta o depresión, siendo un agente capaz de transmitirse de madre a hijo y poder generar abortos durante el embarazo además de otras alteraciones en cerebro y ojos.

Es posible la utilización de cultivos celulares para la obtención de *T. gondii* con fines tales como ensayos de drogas para combatir al parásito, puesta a punto de nuevas técnicas diagnósticas o bien la obtención de taquizoítos o bradizoítos para poder estudiar el desarrollo de la enfermedad en modelos experimentales. Aún con todo, sigue sin haber una metodología estandarizada para lograr un mantenimiento *in vitro* del parásito.

En este trabajo de fin de grado se realiza una revisión bibliográfica de *T. gondii*, su biología, y el proceso que desencadena, la toxoplasmosis. Además, se elabora un estudio comparativo sobre las formas de cultivo y mantenimiento de diversas líneas celulares para la obtención de parásito, complementado con el seguimiento de un protocolo realizado en la Universidad de Zaragoza para mostrar la metodología a la hora de iniciar un cultivo celular.

### **1.1. Abstract**

*Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite capable of reproduce in any kind of nucleated cell, and world-wide spread. It is estimated that around 30% of human population is seropositive to *T. gondii*; in fact, is well-known that it easily spread through its host, and when located in brain or eyes, it can generates chorioretinitis or meningoencephalitis, and disorders like schizophrenia, depression, mind changes. Pregnancy issues such as vertical transmission with abortion risk are also related to *T. gondii* if it affects pregnant women.

Continued studies have proved the viability of cell lines for the maintenance and procurance of viable *T. gondii*, which can be used to develop new drug treatments in order to fight it, tuning new diagnosis techniques, or even *in vivo* inoculation of tachyzoites and bradyzoites to be able to study the toxoplasmosis development in experimental models. Yet, we have not been able to make a standard method which may offer a continuous maintenance of this parasite *in vitro*.

In this review, a general approach to the understanding of *T. gondii* history, biology and social aftermath due to toxoplasmosis will be explained. In addition, different patrons for *T. gondii* culture and its maintenance will be discussed in order to obtain fresh samples of the parasite. With this, scientific researches would be ensured constantly and in long period terms. Thus, a culture protocol done in Universidad de Zaragoza will be added to illustrate the methodology followed to assure cell cultures.

## **2. Introducción**

*Toxoplasma gondii* es un parásito apicomplejo e intracelular, con una amplia distribución mundial y poseyendo carácter eurixeno, es decir, potencial para afectar a un amplísimo rango de especies, incluyéndose el hombre y aves. *T. gondii* fue identificado en el año 1908 por Nicolle y Manceaux en el roedor *Ctenodactylus gundi* y fue en 1970 cuando se descubrieron por primera vez los estadios sexuales del parásito, pudiéndose cerrar su ciclo de vida con el gato como hospedador definitivo. En él, desarrolla la multiplicación sexual en el intestino, produciendo ooquistes que, una vez liberados al ambiente, esporularán, volviéndose infectivos. Los ooquistes esporulados contienen esporozoitos, que al ser consumidos por hospedadores intermediarios, dan una fase de parasitemia, con replicación aguda del parásito en forma de taquizoíto. Esta fase puede conducir a la muerte del hospedador o bien ser controlada por los mecanismos de defensa del mismo. Si ocurre lo segundo, los taquizoítos se transforman en bradizoítos, formando quistes tisulares que pueden persistir durante toda la vida del hospedador (OIE, 2008).

El hombre puede verse afectado por este parásito ya sea por consumo de productos que contengan quistes tisulares así como por contacto directo con heces de gato infectadas con ooquistes o bien por productos contaminados por éstos ooquistes, incluso por consumo de agua contaminada si no recibe un tratamiento eficaz o, directamente, no es tratada (Dubey, 2004).

Al afectar al hombre, *T. gondii* puede desarrollar en él la enfermedad zoonótica conocida como toxoplasmosis. Existen muchas diferencias individuales en cuanto al desarrollo de la sintomatología en humanos que aún no han sido esclarecidas y se cree, puede ir ligado a la cepa de *T. gondii* en cuestión (Saeij *et al.*, 2005) pero sí que está claro que el parásito genera mayor incidencia clínica en individuos que tienen su inmunidad comprometida, destacando especialmente los casos de personas afectadas por el virus del SIDA (Sudgen *et al.*, 2016). En estos casos, el parásito puede diseminarse más fácil y rápidamente por el cuerpo de la persona afectada alcanzando lugares privilegiados, como es el cerebro o los ojos, en los cuales generará lesiones típicas como corioretinitis o meningoencefalitis que, en última instancia, pueden acabar conduciendo a la muerte de estos pacientes (Mondragón *et al.*, 2009; Klotz *et al.*, 2012; Sudgen *et al.*, 2016). También puede transmitirse verticalmente, ya que es capaz de atravesar la barrera placentaria y es un agente causal de abortos en varias de las especies a las que puede afectar, siendo especialmente relevante para los humanos, en los cuales está bien descrita la toxoplasmosis congénita (Diaz *et al.*, 2010). Si atraviesa la barrera placentaria en las primeras semanas del embarazo, acaba resultando en abortos tempranos mientras que si lo hace en las fases finales de la gestación, la infección suele permanecer oculta, sin sintomatología clínica, pero generando daños que, con el paso del tiempo, termina repercutiendo en la aparición sintomatología ocular o cerebral en el niño. La probabilidad de traspasar la barrera placentaria es muy baja al comienzo de la gestación y mucho más elevada en las fases finales de la misma (Rico-Torres *et al.*, 2016). *T. gondii* supone grandes costes socioeconómicos en términos de sufrimiento y mantenimiento de niños nacidos con retraso mental o alteraciones oculares (Dubey, 2004). Además, el *T. gondii* está ligado a pérdidas en especies como el ganado ovino, en las que también influye como factor inductor de abortos

(Lopes *et al.*, 2013; Müller & Hemphill, 2013).

Desde la década de los años 60-70, empezaron a realizarse estudios sobre la manipulación que *T. gondii* podía realizar sobre sus hospedadores intermediarios, usándose los ratones como modelo experimental, los cuales al ser infectados por *T. gondii*, perdían el miedo natural a los gatos, facilitando su ingestión para concluir el ciclo vital del parásito (Webster & McConkey, 2010). Desde entonces, se ha intentado extrapolar esta “teoría de la manipulación” a estudios realizados en personas inmunocompetentes, debido a la difusión global que tiene *T. gondii*, demostrándose la correlación entre *T. gondii* y esquizofrenia, y sospechándose su correlación con epilepsia, síndrome obsesivo-compulsivo e incluso autismo o enfermedad de Alzheimer (Fekadu *et al.*, 2010; Flegr, 2013). La asociación de *T. gondii* con patologías de esta clase se muestra a día de hoy aceptada, pues explicaría la mayor incidencia de ellas en regiones del mundo en las cuales la prevalencia del parásito es mayor (Markovitz *et al.*, 2015). Todo lo que hoy conocemos del *T. gondii* lo debemos al trabajo experimental realizado desde principios del siglo XX, a raíz del cual los investigadores han averiguado y caracterizado desde su ciclo de vida hasta las repercusiones que tiene para la salud, tanto animal como humana. Aún con todo, quedan muchas incógnitas por resolver acerca de este parásito (Di Cristina *et al.*, 2008).

Para conseguir el desarrollo de *T. gondii in vitro*, la metodología más extendida es la utilización líneas celulares en laboratorios de bioseguridad nivel 2 mínimo (Real Decreto 664/1997) con todo el aparataje necesario para mantener una línea celular que, posteriormente, pueda ser invadida por el parásito. Así, hay que lograr primero una población estable de dichas células, las cuales hay que propagar previamente. Con este fin, las células se cultivan con un medio nutritivo que intente reproducir las condiciones fisiológicas de desarrollo celular, el cual suele complementarse con un porcentaje variable de suplementos u hormonas, como el suero fetal bovino (SFB) como nutriente para el desarrollo de las susodichas células, todo esto recogido en un soporte físico adecuado. También se necesitará un suplemento combinado de antibiótico y antifúngico para evitar posibles contaminaciones de las líneas que afecten al posterior desarrollo del cultivo. Una vez preparado éste, las condiciones para el desarrollo celular se fijan en una cámara de incubación en rangos de temperaturas y concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> que permitan el adecuado crecimiento de las células (ATCC, 2016-d; Saadatnia *et al.*, 2010). Por último, elegir la cepa del parásito a usar es de vital importancia puesto que muchas de ellas presentan diferentes grados de invasión celular. Así, las cepas clásicas (RH) reconocidas tanto en Europa como América del Norte, las constituyen las líneas clonales tipos I, existiendo las líneas II y III, mucho menos estudiadas. De todos modos, cada vez se describen más “cepas anómalas” (todas aquellas que se salen de las americanas y europeas) que están recibiendo un creciente interés en su estudio (Paredes-Santos *et al.*, 2013; Fernández-Aguilar *et al.*, 2013).

Todo esto es de especial relevancia puesto que las diversas condiciones de cultivo para *T. gondii* hacen que la optimización del método de cultivo sea esencial a la hora de conseguir parásitos viables, grandes cantidades de éste para pruebas diagnósticas o bien para el desarrollo de nuevos fármacos para combatirlo eficazmente en los casos de enfermedad clínica. Por otro lado, el cultivo celular representa una forma más ética y económica de producción en masa de *T. gondii* a diferencia de los biomodelos, que utilizaban ratones como modelo vivo y que, en muchos casos, supone el sacrificio de estos animales.

### **3. Justificación y objetivos**

Para intentar comprender el alcance global que tiene *T. gondii*, así como para poder luchar contra él, se ha desarrollado a lo largo de la historia diversos métodos que intentan conseguir en el laboratorio las condiciones óptimas para el desarrollo del parásito. Primeramente, con el uso de biomodelos y más recientemente, con la sustitución progresiva de estos por los cultivos celulares. El uso contrastado de estos últimos para la obtención de parásitos abre una puerta a la eliminación completa del uso de animales de laboratorio para estos fines, aunque a día de hoy, la literatura refiere que un 32% de los estudios que se realizan siguen valiéndose de animales para obtener el parásito. Por tanto, este trabajo pretenderá

- 1- Conocer la biología y la clínica que provoca el parásito, reseñando sus características más peculiares y relevantes.
- 2- Revisar información acerca de iniciación y mantenimiento de cultivos celulares y, específicamente, indagar en cuál es el mejor método de cultivo celular para *T. gondii*.
- 3- Conocer el protocolo de mantenimiento de la línea celular Vero y su infección con taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.

### **4. Metodología**

Para la realización de esta revisión bibliográfica se utilizó como referencia la web de la biblioteca de *unizar* como acceso a varias bases de datos (principalmente *Pubmed*, y *ScienceDirect*) que se emplearon como motor de búsqueda para la recopilación de artículos de diferentes revistas de divulgación científica y trabajos de investigación recopilándose información clave de los últimos 20 años de estudio, indexados en dichas bases de datos bajo el término inicial de "*Toxoplasma gondii*". El elevado número de resultados encontrados (697 referencias en *Pubmed*, solo en el año 2016) hizo que la búsqueda se debiera acotar con otros términos clave más específicos, cómo: "*Toxoplasma gondii cell culture*" o "*Toxoplasma gondii in vitro*". También se ha utilizado como medios de consulta libros sobre Parasitología, manuales contrastados y literatura concerniente a cultivos celulares. Se extrajo información del *American Type Culture Collection* (ATCC) responsable de la autenticación, preservación, producción y distribución de microorganismos y líneas celulares además de otros directorios web de ámbito internacional como el *Scottish Toxoplasma Reference Laboratory* (STRL) así como información relevante relacionada con *T. gondii* obtenida de manuales de la OIE acerca de animales terrestres, sin olvidar los marcos de legislación nacional en el ámbito laboratorial. La información extraída de los libros fue encontrada utilizando, también, el buscador de *unizar*, así como *Google academic* sirvió para hallar los manuales de laboratorio (como el manual *Cultek* acerca de cultivos celulares), mientras que los marcos legislativos consultados fueron encontrados a través del buscador facilitado por la Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado. Por último se incluye un protocolo de trabajo para la manipulación y propagación de *T. gondii* en cultivos celulares, del cual se siguió su desarrollo *in situ* en el laboratorio del Centro de investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza, y un anexo para ilustrar el proceso de revisión bibliográfica.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 *Toxoplasma gondii*

#### 5.1.1. Generalidades

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado. Su clasificación taxonómica actual lo encuadra como un parásito perteneciente al reino Protista, sub-reino Protozoo, filo *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, sub-clase *Coccidia*, orden *Eucoccidida*, sub-orden *Eimeria*, familia *Sarcocystidae*, género *Toxoplasma* y especie *Toxoplasma gondii* (Artigas & Amores, 2012; Raiden Grandía *et al.*, 2013). No obstante esto no fue siempre así pues, desde el momento de su descubrimiento en el año 1908 por los investigadores Nicolle y Manceaux hasta la década de 1930, se clasificaba al parásito en nueve especies diferentes según el hospedador en la cual se encontraba al parásito (*T. alencari*, *T. bahiensis*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae* y *T. serpai*). Cuando se descubrió que todas estas especies compartían unos mismos ciclos biológicos y características inmunológicas, se agruparon dentro de una misma especie, conocida como *T. gondii*. Así, *T. gondii* posee un marcado carácter eurixeno, esto es, la capacidad de afectar a un amplio y diverso número de especies diferentes durante su ciclo vital a modo de hospedadores intermediarios, encontrándose casos en casi cualquier especie conocida; tanto terrestre como marina, tanto domésticas como salvajes, con prevalencias variables que pueden venir condicionadas también según áreas geográficas (Dubey & Jones, 2008; García-Bocanegra *et al.*, 2010; Waap *et al.*, 2012; Fernández-Aguilar *et al.*, 2013; Raiden Grandía *et al.*, 2013).

*T. gondii* es un microorganismo unicelular evolucionado: con núcleo verdadero, aparato de Golgi, mitocondria y una serie de orgánulos característicos necesarios para la penetración celular y un complejo citoesqueleto que le permite realizar movimientos helicoidales para moverse, usando toda su masa para ello (Artigas & Amores, 2012). En este citoesqueleto se halla integrado el complejo apical (del cual deriva el nombre del filo en el que se engloban, además de *T. gondii*, a otros parásitos de géneros tales como *Plasmodium*, responsable de generar la malaria o *Babesia*, responsable de la babesiosis) que, se cree, desempeña un rol clave a la hora de que *Toxoplasma* desarrolle los mecanismos propios de invasión celular que necesita para perdurar, así como las formaciones de la vacuola parasitaria una vez dentro de las células hospedadoras (Hu *et al.*, 2006).

#### 5.1.2. Ciclo biológico

*T. gondii*, como parásito intracelular obligado, necesita estar dentro de células nucleadas para poder multiplicarse y expandirse. De este modo, encontramos dos etapas muy diferenciadas a lo largo de su ciclo: Una fase de reproducción sexual y otra asexual. La fase sexual se origina única y exclusivamente en el intestino del gato, que constituye el hospedador definitivo de *T. gondii*, mientras que la fase asexual puede originarse en cualquiera de los hospedadores intermediarios que posee *T. gondii* cuando éstos entran en contacto con las heces de los gatos o material contaminado por éstas que contengan ooquistes esporulados, o bien por la ingestión de bradizoítos alojados en quistes tisulares de otros hospedadores intermediarios.

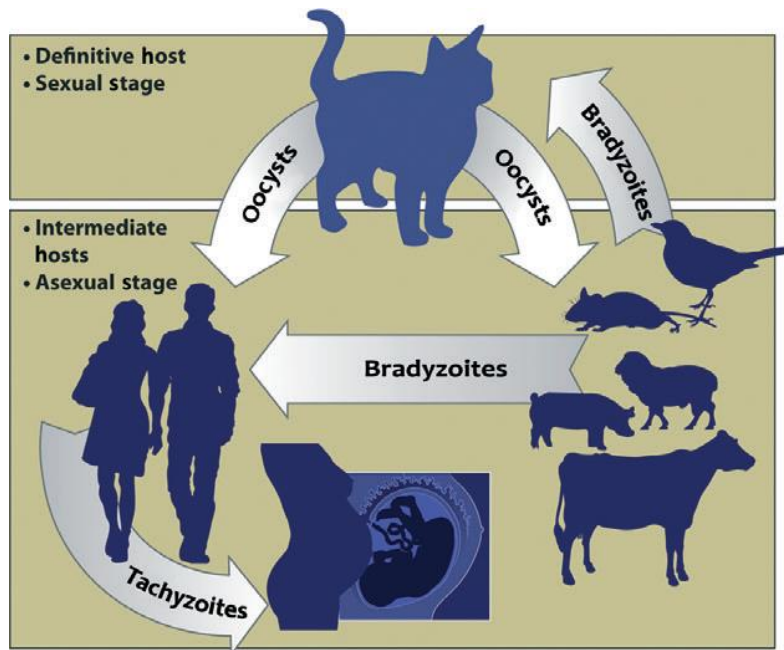


Figura 1: Esquemización del ciclo del *T. gondii*. El gato constituye el único hospedador definitivo conocido. En él se puede desarrollar la fase de multiplicación sexual. La compleja fase asexual resalta las vías de infección más comunes tanto como para animales como para humanos, así como las fases responsables de la infección en cada hospedador. Extraído de: Sullivan & Jeffers (2012).

Este complejo ciclo de vida presenta dos etapas diferenciadas, así como una alternancia entre fases de multiplicación activa y fases de latencia ilustrados en la figura 1. El ciclo comienza cuando el gato ingiere cualquiera de las tres formas del parásito (taquizoíto, bradizoíto u ooquiste esporulado) y estas alcanzan el intestino del animal, aunque se ha demostrado que la forma más infecciosa para los gatos son los bradizoitos, que llegarán hasta éste por ingestión de carne con quistes tisulares. Los ooquistes, a diferencia de en otras especies de coccidios, en el caso de *T. gondii* son mucho menos infectivos para el hospedador definitivo que para el intermediario (Dubey, 1998).

Los quistes ingeridos, que contendrán bradizoitos, se disuelven en el estómago del gato. Llegados los bradizoitos al intestino del animal, factores específicos, todavía desconocidos, inducen a los bradizoitos a generar primero una fase de diferenciación asexual (esquizoogonias) dentro de las células epiteliales intestinales para después liberar merozoitos que pasarán a macro y microgametos, capaces de recombinarse para generar ooquistes, que serán expulsados en las heces de los animales a razón de millones debido a los continuos ciclos de multiplicación que se sucede en el epitelio intestinal. Paralelamente a los ciclos de reproducción sexual, algunos bradizoitos pueden invadir la lámina propia y diferenciarse a taquizoitos, que se expanden por el organismo del gato y generan quistes tisulares con bradizoitos. Este proceso no suele generar sintomatología en los felinos. Se especula que en el caso de que sean ooquistes lo que ingiera el gato, *T. gondii* también se expande por el organismo como taquizoíto, generando posteriormente quistes tisulares con bradizoitos como si fuese un hospedador intermediario más, que podrían reactivarse, volver al intestino del gato y reiniciar la fase sexual propia del hospedador definitivo. La eliminación de ooquistes suele



durar de tres a quince días, hasta que el gato desarrolla inmunidad frente al parásito, momento en el cual la multiplicación intestinal cesa (Dubey, 1998; Weiss & Kim, 2000; Artigas & Amores, 2012; Sullivan & Jeffers, 2012; Meissner, 2013).

Estos ooquistes liberados al ambiente no son todavía infectantes para ningún hospedador, por lo cual han de sufrir un proceso de esporulación para adquirir dicha capacidad. Esta capacidad suele adquirirse en los cinco primeros días después de ser expulsados exterior, siempre y cuando se den las condiciones ambientales adecuadas. Cada ooquiste esporulado consta de dos esporoquistes, los cuales a su vez contienen cuatro esporozoítos (ocho en total). El ooquiste esporulado es una forma de resistencia que puede permanecer en el medio durante un año a la espera de un hospedador, además de ser muy resistentes frente a la acción de desinfectantes. La ebullición y congelación se han mostrado no obstante, como métodos eficaces a la hora de destruirlos (Dubey & Jones, 2008; Díaz *et al.*, 2010; Artigas & Amores, 2012; Raiden Grandía *et al.*, 2013).

Una vez alcanza a un hospedador intermediario potencial, el ooquiste esporulado de *Toxoplasma* inicia en él la fase de ciclo asexual. Esta comienza con la digestión del ooquiste en el estómago y liberación en intestino, al igual que el gato, desde donde se expande por el organismo del hospedador. El crecimiento y división es rápida, en forma de taquizoítos, que es fase activa de la replicación y que puede infectar a cualquier célula nucleada. El taquizoíto se multiplica por endodiogenia, de la cual surgen dos células hijas de una célula original. Este proceso perdurará hasta que la célula colapse y se lise, liberando entre 64 a 128 taquizoítos/célula al torrente sanguíneo que buscarán nuevas células que invadir, generándose así la fase de parasitemia (Díaz *et al.*, 2010). Esta etapa puede acabar con la muerte del hospedador si su respuesta inmune no es la adecuada o bien detenerse en caso de que si lo sea. Si se consigue controlar, los taquizoítos que se hallen dentro de células pueden usar la membrana vacuolar para desarrollar una pared quística. Formada ésta, los taquizoítos pasan a bradizoítos, que tienen una tasa de replicación mucho menor y constituye la forma de latencia o de persistencia dentro de los hospedadores intermediarios, aunque conservan sus características patógenas. Esta conversión de taquizoíto a bradizoíto suele producirse en tejidos de difícil acceso para la respuesta inmune, destacando entre ellos el tejido del sistema nervioso central, tejido muscular, tanto cardíaco como esquelético así como tejido placentario en caso de que la invasión se produzca durante el embarazo. Estos bradizoítos pueden permanecer indefinidamente en los quistes tisulares esperando un fallo en los mecanismos de defensa del hospedador intermediario, generando una nueva fase de parasitemia en forma de taquizoíto, o bien ser ingeridos por depredación por otro hospedador intermediario prolongándose el ciclo o bien por un felino para completarlo. Después de la ingestión de una de las formas parasitarias por el gato, el tiempo de excreción de ooquistes varía, pudiendo empezar a eliminarlos a los tres días si se ingirió bradizoítos. Si el ciclo se inicia con taquizoítos u ooquistes, el periodo hasta la eliminación de ooquistes varía de un mínimo de trece días a dieciocho, respectivamente (Dubey, 2006; Sullivan & Jeffers, 2012; Weilhammer *et al.*, 2012).

Resumiendo, *T. gondii* posee tres estadios diferenciándose en:

- 1- Taquizoíto: [Del griego *tachos* = velocidad, por Fenkel, 1973] Es la forma infectiva del parásito, y la cual fue identificada por primera vez. Posee una característica forma de

media luna, con uno de sus extremos más redondeados que el otro. Sus medidas son 6x2  $\mu\text{m}$ , posee orgánulos varios como mitocondrias, REL y REG, aparato de Golgi o ribosomas, además de estructuras como microtúbulos o anillos apicales y polares. Su núcleo se encuentra centrado, con agregados de cromatina y un nucléolo central.

- 2- Bradizoíto: [Del griego *brady* = lento, por Fenkel, 1973] Es la forma de persistencia *in vivo* del parásito, que pueden encontrarse en cualquier parte de un animal parasitado durante el periodo de latencia. Los quistes tisulares, que pueden llegar a medir de 5 a 200  $\mu\text{m}$  son la cubierta utilizada por los bradizoítos para ocultarse del sistema inmune del hospedador y poder reactivar la infección cuando las condiciones sean mejores. El bradizoíto mide 7x1,5 $\mu\text{m}$  y pueden encontrarse dos o varios cientos según el tamaño y la antigüedad que posea el quiste en el que se encuentran.
- 3- Ooquiste: El ooquiste es el resultado final de la fase sexual que desarrolla el parásito en el intestino del gato común (*Felis silvestris catus*) y, una vez liberados al medio ambiente, bajo las condiciones adecuadas, se da la esporulación de estos pasando a constituir ooquistes infectantes. Su tamaño oscila alrededor de 10 a 12  $\mu\text{m}$  sin esporular y de 11 a 13  $\mu\text{m}$  una vez esporulados.

### 5.1.3. Transmisión

Existen varias vías de transmisión del parásito a sus hospedadores intermediarios (Acha & Szyfres, 2003; Dubey, 2009):

- 1- Consumo de carnes infectadas con quistes tisulares: Los bradizoítos, contenidos en quistes tisulares en hospedadores intermediarios, mantienen su potencial patógeno a la espera de ser depredados. Esta es una de las vías principales de infección para el ser humano, y va ligada por lo general al consumo de carne poco o mal cocinada y a prácticas higiénicas deficientes a la hora de manipular los productos. Esta categoría es la principal para explicar las rutas de transmisión entre carnívoros y de cómo el gato adquiere el parásito; debido a la ingestión de roedores o aves infectados (Swierzy *et al.*, 2014).
- 2- Ingestión de ooquistes esporulados: La ingestión de ooquistes es la vía que quizás pueda explicar mejor la gran difusión mundial que ha logrado el parásito y como éste afecta, aparte de especies carnívoras, también herbívoras. Los ooquistes tienen una capacidad sin igual para permanecer infectivos en el medio ambiente (hasta 1 año) y dado que los gatos pueden eliminar millones en sus heces, facilita las posibilidades de difusión enormemente. Esto también se extiende a que los ooquistes pueden resistir en el agua (Dubey, 2004) ampliando todavía más la difusión.
- 3- Congénita (transmisión vertical): Esta vía se da tanto en humanos como ratones y pequeños rumiantes, aunque pueda afectar potencialmente a cualquier especie. *T. gondii*, una vez alcanza su hospedador intermedio y está en la primera fase de parasitemia, los taquizoítos son capaces de alcanzar al feto por medio de la placenta.

#### 5.1.4. Toxoplasmosis

*T. gondii* constituye un organismo muy especializado a la hora de propagarse y ser capaz de persistir tanto en ambientes desfavorables como en una amplia gama de hospedadores (Mondragón & Muñiz, 2009). *T. gondii* también destaca por ser uno de los parásitos zoonóticos más relevantes, ya que sus características le otorgan una capacidad sin igual para persistir y difundirse en la población humana usando a su favor tanto el ambiente como el amplio rango de hospedadores intermediarios que puede encontrar para, en última instancia, llegar a su hospedador definitivo y completar su ciclo vital. En consecuencia, las organizaciones de Salud Pública de varias regiones, como el *Scottish Toxoplasma Reference Laboratory* (STRL) realizan periódicamente evaluaciones epidemiológicas del parásito en la población humana y animales y dictan recomendaciones para controlar su difusión y alcance.

*T. gondii* tiene un carácter oportunista a la hora de desarrollar la toxoplasmosis, esto se debe a que, por lo general, suele ser asintomática en la mayoría de individuos, con excepción de aquellos que tengan reducida su capacidad inmunológica o bien en caso de que se dé transmisión vertical a través de la placenta. Esto resulta en que, aunque las tasas de infección por el parásito varíen según zonas desde un 20 hasta el 80%, la aparición de sintomatología directamente derivada sea muy escasa, o vaya ligada a brotes esporádicos, ligados al consumo de carne cruda o poco cocinada (Acha & Szyfres, 2003).

Generalmente, cuando se adquiere el parásito, si los afectados son pacientes inmunocompetentes no suelen mostrar ningún síntoma o bien la sintomatología es inespecífica y fácilmente confundible con la de otras afecciones como la gripe común o la mononucleosis. La sintomatología que puede producir en estos pacientes es fiebre moderada, linfadenopatía y astenia (Weiss & Kim, 2000; Yang *et al.*, 2014).

El mayor riesgo que entraña *T. gondii* se da cuando infecta a personas inmunocomprometidas o bien se transmite verticalmente. En el primer caso, los pacientes que padezcan el virus del SIDA son los mayores exponentes. En ellos, *T. gondii* muestra una especial preferencia por el tejido nervioso central del paciente, causándoles necrosis cerebrales en las áreas afectadas y posibles cambios de comportamiento como secuelas de estas necrosis. Estas lesiones se creen que suceden a consecuencia del rápido intercambio de fases que experimenta el parásito, pasando de bradizoítos alojados en quistes a taquizoítos, los cuales serán eliminados por las células del sistema inmune. En los casos de individuos inmuno-comprometidos, se cree que son incapaces de cubrir un cupo de células defensoras para limitar la multiplicación de los taquizoítos provenientes de los quistes, lo que lleva en última instancia a la aparición la encefalitis toxoplásmica. La gravedad de *T. gondii* en la invasión placentaria depende de en qué momento del embarazo se dé, resultando en abortos si la invasión se produce en las primeras semanas del embarazo, o bien en una infección crónica si se produce al final de la gestación, que puede desencadenar consecuencias a lo largo de la vida del afectado como la aparición de coriorretinitis o ceguera, y se cree que ocurre igual con pacientes inmunocomprometidos (Weiss & Kim, 2000). Las tasas de infección por *T. gondii* es variable entre países, destacando España, en donde la infección afecta al 56,7% de la población general, pero la primoinfección en embarazadas es de solo 0,056% mientras que en Francia y EE.UU. la frecuencia de la toxoplasmosis se data en 1 de cada 1500 partos y 1 de cada 4000,

respectivamente. La transmisión congénita, aun con todo, no representa importancia epidemiológica para el humano debido a su rareza (pese a sus consecuencias clínicas) y porque la persona infectada solo es una fuente infecciosa para el propio feto, a diferencia de los pequeños rumiantes por la posibilidad de difusión a un mayor número de personas (Acha & Szyfres, 2003; Lopes *et al.*, 2013).

Paralelamente, se conoce que *T. gondii* es capaz de alterar el comportamiento en las personas en las que se halla latente. Este hecho está ampliamente demostrado en el ratón como hospedador intermediario, ya que se ha observado que éste pierde el miedo hacia el gato por acción directa de *T. gondii*. Por su parte, en los seres humanos se ha demostrado la coincidencia de la infección de *T. gondii* y esquizofrenia en algunos individuos, pero no en todos. Esta correlación se ve manifiesta en pacientes que sufren por primera vez episodios esquizofrénicos, en los cuales se hallan aumentados los niveles de IgG, IgM e IgA frente a *T. gondii* (Webster & McConkey, 2010). Recientemente, se ha evaluado en ratones como afecta la inoculación del parásito a machos y hembras, demostrándose que en los machos aumentan los niveles de testosterona al ser infectados, al igual que en los hombres, lo que podría explicar por qué *Toxoplasma* pueda generar diferencias en los cambios de comportamiento según el género del afectado (Flegr, 2013).

Así, puede afirmarse que los felinos son el eslabón clave en la difusión del parásito, ya que sin él no existe la fase sexual y por tanto la producción de ooquistes. Esto engloba tanto a los félidos salvajes como al gato doméstico. La posesión de un gato como mascota no implica una mayor probabilidad de contraer el parásito ya que, primeramente dependerá de que el propio felino esté infectado y en fase de eliminación de ooquistes, seguido del estado inmunológico de las personas que vivan con él. La infección por *T. gondii* está mucho más ligada al consumo de carnes contaminadas con quistes tisulares y al consumo oral de ooquistes esporulados de forma accidental, generalmente ligado a contacto con félidos salvajes o áreas en las que estos felinos se encuentren presentes. Durante el embarazo, para prevenir la infección, las recomendaciones a seguir son: un consumo de carne bien cocinada y mantenerse alejada de zonas con alta densidad de felinos, especialmente durante las primeras fases del embarazo en las cuales la infección por *T. gondii* resulta más dañina para el feto (Weiss & Kim, 2000).

## **5.2 Mantenimiento de cultivos celulares *in vitro***

### **5.2.1. Generalidades**

Un cultivo celular se define como una técnica, o conjunto de estas, que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservándose al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Esta técnica se considera a día de hoy imprescindible para los laboratorios e investigación científica, ya que permite estudiar, toda la biología y bioquímica celular además de las interrelaciones celulares, poseyendo aplicaciones específicas en sectores como parasitología, bacteriología, virología, desarrollo de fármacos, nuevas técnicas diagnósticas para patógenos, siendo actualmente imprescindible en el estudio oncológico.

Históricamente, Wilhem Roux es considerado el pionero del cultivo de tejidos puesto que fue

en 1885 cuando consiguió mantener células de embrión de pollo, mientras que Ross Harrison (1907) fue el primer científico que realizó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo* con médula espinal de anfibios. Desde la década de 1940 se han logrado los mayores avances, primero con el aislamiento de los antibióticos, que se aplicaría posteriormente para mantenimiento de cultivos, seguido del aislamiento de la línea celular L de un ratón. Esto demostró que se podían formar clones de células si éstas eran alimentadas con los nutrientes adecuados. En 1952 se consiguió obtener la primera línea celular humana continua, HeLa, que perdura hasta hoy. En 1954, Rita Levi-Montalcini y col. establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo reafirmando lo anterior sobre la línea celular L (González & Sánchez, 2015).

Los cultivos celulares actualmente se clasifican en tres tipos diferentes que son:

- Cultivo de órganos, que permiten mantener la arquitectura de los tejidos *in vivo* y los tipos celulares diferenciados, pero no crecen en exceso ni pueden propagarse.
- Explantes primarios, obtenidos a partir de fragmentos de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie, se logra una proliferación de las células periféricas del explante.
- Cultivo celular primario; es el más expandido y utilizado, se obtiene de explantes o bien de células disgregadas de tejidos y su mayor beneficio es que permite la proliferación de las células aunque se pierdan las interacciones entre ellas. Esta proliferación se sucede hasta que ocupan toda la superficie en la que se hallen delimitadas, fenómeno en el cual se habla de que las células logran la confluencia. Una vez se alcanza esta confluencia, las células detienen la proliferación pues contactan entre ellas y será el momento en el que hayan de trasladarse a otro soporte si se desea que prosigan su proliferación. Estos cultivos a su vez se subdividen en dos tipos: cultivos de monocapa, con crecimiento adherente, que crecerán adheridas a un soporte sólido; y los cultivos en suspensión, propios de las células hematopoyéticas, tumorales o líneas transformadas, las cuales crecerán dispersas en el medio de cultivo (González & Sánchez, 2015).

La iniciación de los cultivos celulares (Figura 2) se realiza entonces sobre un soporte inicial hasta que dichas células ocupen toda la superficie otorgada. Dada la confluencia, se hace necesario realizar resiembras para que las células iniciales sigan creciendo. En los pases sucesivos que se realicen, las células se irán homogeneizando ya que la célula con mayor tasa de crecimiento desplaza al resto. Estos cultivos tienen un número, determinado según el tipo celular, de posibles divisiones que pueden realizar antes de entrar en el periodo de senescencia, que es el momento en el cual no pueden seguir replicándose por el progresivo acortamiento que los telómeros del núcleo celular ha ido sufriendo con el paso de las generaciones. Una sucesión de pases de un cultivo genera las llamadas líneas celulares, cultivos extraídos a partir de los primarios en los cuales la cantidad de células va aumentando, siendo del tipo celular que responde al que mayor tasa de crecimiento genere. Estos cultivos o líneas celulares pueden llegar a traspasar los límites de la senescencia, fenómeno que se origina bien espontáneamente o inducido (como por una infección vírica) y genera lo que se conoce como líneas celulares continuas.

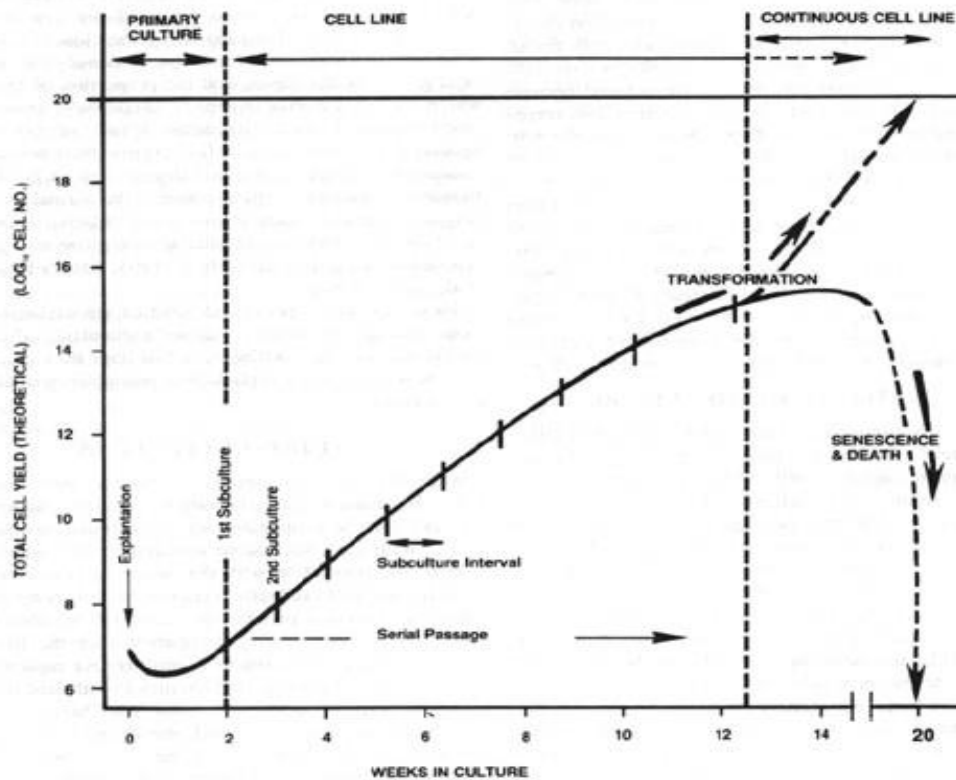


Figura 2: Gráfica de evolución de una línea celular ficticia a lo largo de las semanas. Se puede apreciar en ella el momento en el que se realizan los subcultivos, los procesos que la línea va sufriendo a lo largo de las semanas así como su desarrollo hasta alcanzar el periodo de senescencia. Si se convierte en una línea celular continua, burlaría la senescencia y podría seguir replicándose (Extraído de Manual Cultek, 2007).

## 5.2.2. Líneas celulares continuas

Las líneas celulares continuas poseen una serie de características especiales que son altamente beneficiosas para el desarrollo de los parásitos intracelulares, entre las que destacan homogeneidad sin igual, aneuploidía o heteroploidía (variaciones en el número normal de cromosomas de la célula) altas velocidades de crecimiento y rendimiento del cultivo elevado, así como menores requerimientos de suero para su mantenimiento que una línea ordinaria, lo que benefician mucho la fisiología del parásito para desarrollarse en ellas. Estas líneas celulares se caracterizan entonces por poseer, generalmente, carácter maligno (solo si sufren el proceso de transformación, por el cual hay cambios genotípicos), inmortalidad y crecimiento aberrante (Segretín, 2002; Freshney, 2010; González & Sánchez, 2015).

Las líneas celulares más utilizadas son las líneas continuas HeLa, Vero, THP1, HEp-2, LLC-MK2, Marc-145 y HFF. Las líneas celulares Vero y HeLa son las más comúnmente utilizadas por todos los laboratorios, siendo las demás más específicas a la hora de buscar un objetivo. La línea celular Vero se caracterizó por primera vez en el año 1962 cuando se extrajo del riñón de un mono verde africano en buen estado de salud. Esta línea celular posee aneuploidía y un crecimiento ilimitado y se ha usado clásicamente en el desarrollo de vacunas víricas. La línea celular HeLa, aislada en el año 1952 de Henrietta Lacks, paciente afroamericana que padecía un tumor maligno en el cuello uterino, destaca por ser la primera línea celular continua humana aislada. A día de hoy, sigue siendo una de las más destacadas por poseer una rápida

replicación (hasta 23h) crecimiento adherente, robustez, ser fáciles de cultivar en medios comunes y por ser una de las líneas que mejores resultados ofrecen para el cultivo y estudio de virus además de por la dificultad que entraña obtener nuevas líneas celulares continuas de humano. La línea TPH-1, por su parte, fue aislada de un niño con leucemia, la línea HEp-2 proviene de un carcinoma epitelial humano siendo muy utilizadas para pruebas antigénicas, mientras que la línea HFF proviene de fibroblastos de tejido tisular (ATCC, 2016-a, 2016-b, 2016-c). Las líneas LLC-MK2 y Marc-145 al igual que las Vero provienen de células renales de mono de Rhesus (Cuellar *et al*, 2012) siendo las Marc-145 muy utilizadas para estudios de virología (Sheets, 2000; Ballesteros *et al.*, 2013; González & Sánchez, 2015)

### 5.2.3. Medios de cultivo

Las líneas celulares han de sembrarse previamente en extensión en placas, para lograr un aumento en el número total de células totales y poder realizar cualquier trabajo de investigación necesario sobre ellas. Para lograr la expansión y crecimiento de las líneas, será necesario elegir un medio de cultivo para el crecimiento de las células. Los medios, pues, son una compleja mezcla de componentes que consta de cuatro elementos: Sustrato de cultivo, condiciones fisiológicas del medio, condiciones físico químicas y fase gaseosa.

Para realizar un cultivo celular se requiere un medio de soporte para los sustratos de cultivo, existiendo en el mercado un gran número de posibilidades a la hora de mantener un cultivo celular, que puede ir desde clásicas placas de vidrio para la observación directa, o bien microsoportes para células dependientes de anclaje, hasta matrices tridimensionales en las cuales la adhesión celular replica con exactitud a la formación que poseería en un tejido original (Freshney, 2010). En el caso particular del mantenimiento de una línea celular continua, una de las posibles opciones es la utilización de frascos de Roux, que además de facilitar el crecimiento en monocapa de las células, poseen un tapón con filtro que permite el intercambio gaseoso para las líneas celulares que en él se hallen, habilitando la transpiración gaseosa una vez se estén incubando.

Las condiciones fisiológicas del medio comprende el medio de cultivo, que va a ser la sustancia que intente recrear con la mayor exactitud las condiciones fisiológicas que las células necesitan para crecer y desarrollarse. Los principales medios utilizados a día de hoy son:

- Basal Medium Eagle (BME): Medio básico que solo posee aminoácidos esenciales, ha de ser suplementado con SFB y es el más recomendado para la línea HeLa.
- Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM): El más comúnmente utilizado para todos los cultivos, posee mayor concentración de aminoácidos pero suele ser suplementado igualmente.
- RPMI 1640: Diseñado especialmente para el crecimiento de linfoblastos o líneas celulares leucémicas, por lo que se recomienda para la línea TPH-1.
- Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Contiene cuatro veces más aminoácidos y vitaminas que BME, uso en selección de hibridomas o líneas altamente exigentes.
- Iscove's Modified DMEM (IMDM): Medio muy completo que incluye albúmina bovina, transferrinas, selenito, etc. Es muy útil para cultivo de linfocitos libre de suero o bien para otros tipos celulares con bajas concentraciones de suero.

- Medio L-15 de Leibovitz: Recomendado para cultivo de virus.

La composición de todos estos medios tiene características comunes, ya que todos poseen: Soluciones salinas equilibradas, que incluyen usualmente bicarbonato sódico suplementado con glucosa, aminoácidos, vitaminas, glucosa, hormonas y factores de crecimiento, siendo el suero fetal bovino (SFB o FBS en inglés) y el suero de ternera, *calf serum* (CS) los más comunes para asegurar el crecimiento celular.

Estos medios garantizan que las células realizarán un crecimiento adherente, lo que conllevará que las células se fijen a la placa de soporte para expandirse. Muchos de estos medios han de ser suplementados. Diferentes cultivos o líneas celulares tendrán mayores requerimientos de estos suplementos según la exigencia fisiológica de las células, lo que hace que a la hora de realizar cultivos con las diversas líneas se necesiten cantidades variables de estos suplementos. Todo esto supone un gran inconveniente para la estandarización de protocolos experimentales y de producción. Por ello se realizan importantes esfuerzos para la definición de medios definidos para el crecimiento celular. Esto, además de la reproducibilidad buscada, permite establecer medios selectivos en los que crezca el tipo celular deseado. Tienen como desventaja la gran cantidad de esfuerzo necesario para su definición, así como que en muchos casos el crecimiento de las células en estos medios es menor, las líneas finitas permanecen viables menos generaciones (Cultek, 2007).

Adicionalmente, para la realización del cultivo celular se precisará controlar aspectos físico-químicos como el pH, capacidad tampón, osmolaridad, temperatura, viscosidad y tensión superficial. El pH óptimo para las líneas celulares suele ser de 7,4 aunque puede variar entre el 7 y 7,7 añadiéndose tampón en el medio con el fin de evitar variaciones bruscas que estropeen el cultivo. La mayoría de células crecen bien a rangos de osmolalidad comprendidos 260-320 mOsm/kg y se desarrollan a temperaturas entre los 33 y 37°C. La viscosidad está determinada por el contenido en suero pero tiene poca influencia en el crecimiento, mientras que la tensión superficial ha de permanecer baja (Segretín, 2002; Cultek, 2007).

La fase gaseosa está regulada en la incubadora tiene la finalidad de mantener una correcta relación de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> siendo lo habitual 95 y 5%, respectivamente. El CO<sub>2</sub>, además, influye en el pH del medio por lo que es especialmente relevante tener en cuenta la tensión de éste a la hora de adecuar las condiciones necesarias para alcanzar el pH óptimo. En la actualidad se tiende más al uso de soluciones tamponadoras para regular este parámetro, como el HEPES ya que del correcto equilibrio entre parámetros depende el desarrollo del cultivo celular.

#### **5.2.4. Contaminación y viabilidad celular**

A la hora de considerar la iniciación de un cultivo celular, también es importante valorar que el desarrollo y expansión de éstos suele ser lento (varias semanas), lo cual posibilita la aparición de contaminación, siendo lo más común la aparición de bacterias u hongos, aunque la diseminación de algunas cepas de virus mediante el uso de sueros bovinos es igualmente posible. Estos problemas de contaminación generalmente irán ligados a fallos de los equipos, de la esterilidad empleada a la hora de la manipulación de los cultivos así como la del propio ambiente de trabajo. Los problemas de contaminación a la hora de realizar cultivos de rápido



crecimiento suelen ser un contratiempo menor pues no se dispone del tiempo necesario para que aparezca contaminación, pero en cultivos celulares de desarrollo más lento, es un problema que hay que tener presente y luchar contra él. Las vías para hacerlo son pues: el correcto mantenimiento de la asepsia a la hora de la manipulación, limpieza de los equipos que vayan a utilizarse, así como un buen mantenimiento de éstos, y más específicamente, el uso y suplemento de agentes antibióticos y fungicidas a la hora de preparar el cultivo celular, siendo mayoritario el uso de la combinación de penicilina o estreptomina y anfotericina. (Segretín, 2002; Cultek, 2007; Freshney, 2010; Otero, 2014).

Para comprobar que el desarrollo del cultivo celular haya sido el adecuado, se fijará una confluencia deseada a partir de la cual habrá de realizarse un proceso de tripsinización para desprender las células de la monocapa formada y poder establecer una resiembra. Estas células tendrán un mayor o menor rendimiento para el cultivo dependiendo de lo buenas que hayan sido las condiciones de cultivo anteriores, por lo cual será importante contar con un método como el azul de tripán que sirva para establecer la viabilidad de las células obtenidas, para lo cual una vez teñidas se realizará un conteo en una cámara de Neubauer (Cuellar *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2013).

### **5.2.5. Ventajas y desventajas del cultivo celular**

En definitiva, las ventajas de los cultivos son económicas, éticas porque, se reduce el uso y posible sacrificio de animales, un control preciso del medio extracelular que repercute en homogeneidad, poder obtener una mayor precisión en los estudios. Por el contrario, como desventajas tenemos que es una técnica muy sensible que precisa asepsia estricta, heterogeneidad en las velocidades de crecimiento y diferenciación y por último, la validez de los resultados *in vitro* pueden variar de los obtenidos *in vivo*.

## **5.3. Mantenimiento *in vitro* de *Toxoplasma gondii***

### **5.3.1. Introducción**

*T. gondii*, como ya se ha apuntado a lo largo de la revisión bibliográfica, fue estudiado por primera vez a principios del siglo XX y ha sido utilizado como un modelo de desarrollo de los parásitos apicomplexos a lo largo de la historia.

La obtención del parásito se ha realizado clásicamente a partir de biomodelos, con ratones de laboratorio a los cuales se infectaban inoculándoles taquizoítos, bradizoítos o bien alimentándolos con ooquistes. A los pocos días se produce la toxoplasmosis sistémica, en la que los animales pueden morir por la infección aguda y muestran signos de la infección. Después de este periodo, el parásito se distribuye por las regiones corporales de más difícil acceso. Para recuperar el parásito, los métodos dependerán del objeto del estudio que se quiera realizar, pero dicha recuperación de parásitos conlleva, en muchos casos, el sacrificio de los animales. La utilización de biomodelos para obtención de parásito es el método más fiable y utilizado debido a la rapidez y sencillez del proceso, y por generar muestras viables y

libres de contaminación. Por otra parte, los biomodelos presentan un problema de pérdida de patogeneidad progresiva del parásito, que obliga a hacer nuevas inoculaciones para mantener dicha patogeneidad (Chew *et al.*, 2012; Contreras-Ochoa *et al.*, 2015; Fenoy *et al.*, 2015). Es por esto y por las implicaciones éticas que conllevan el uso de modelos animales en el laboratorio que el cultivo celular ha ido ganando terreno en los laboratorios, incluso suplantando los biomodelos, debido a la posibilidad de mantener cultivos celulares como un suministro constante de parásitos (Chatterton *et al.*, 2002; Chatterton *et al.*, 2010; Saadatnia *et al.*, 2010). Existen otros métodos descritos para la conservación de parásito fuera de células o biomodelos como pueden ser la criopreservación o mantenimiento en sueros no suplementados a bajas temperaturas, pero tienen el inconveniente de ser métodos caros o bien no conseguir una viabilidad prolongada durante mucho tiempo (Mavin *et al.*, 2003; Mzabi *et al.*, 2015; Kalani *et al.*, 2016). Los biomodelos, de todos modos, presentan inconvenientes, ya que a la hora de realizar estudios acerca de pruebas inmunológicas, este modelo fracasa porque los mecanismos de defensa inmunológicos del ratón están presentes y puede alterar el correcto desarrollo del experimento. La obtención de parásito en la mayoría de la literatura consultada se realiza a partir de ratones, teniendo una referencia de Chatterton *et al.* (2010) en la cual en el año 2008 el 32% de los estudios realizados aún partían de animales.

A la hora de iniciar un cultivo celular para *T. gondii* se precisará de un laboratorio de bioseguridad nivel II ya que el *T. gondii* presenta riesgo biológico para los humanos, además, el trabajo con el parásito ha de ser minucioso. Por otra parte, el uso de estos laboratorios exigen cierto nivel de conocimiento a la hora de manipular el material de riesgo biológico por lo cual tienen acceso restringido (Real Decreto 664/1997; ATCC, 2016-f).

### **5.3.2. Cultivo celular de *Toxoplasma gondii***

Para conseguir mantener a *T. gondii* en cultivos celulares, aparte de unas perfectas condiciones durante el cultivo, hace falta definir tanto la línea celular que se usará en el proceso, así como la cepa de *Toxoplasma* que se va a cultivar y la metodología bajo la cual se va a realizar todo el procedimiento. Todo esto se realiza con el fin de poder obtener parásito para poder desarrollar investigaciones en diversos campos, como puede ser el desarrollo de nuevos fármacos para combatir la toxoplasmosis (Portes *et al.*, 2012, Rivera-Fernández *et al.*, 2016), para estudiar su biología (Mavin *et al.*, 2004) o bien el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas (Chatterton *et al.*, 2002; Freshney, 2010; González & Sánchez, 2015).

Generalmente se utilizan líneas celulares continuas que provienen de un tejido u órgano tumorales que nos permite conseguir un suministro de parásito viable a largo plazo, ya que *T. gondii* necesita siempre una célula hospedadora en la que replicarse previamente. Se incluyen entre las líneas celulares utilizadas para propagar *T. gondii* las líneas: Vero, HeLa, THP-1, HEp-2, HFF, LLC-MK2 y Marc-145 (ATCC, 2016-a, 2016-b, 2016-c, 2016-e, 2016-g; Ashburn *et al.*, 2000; Saadatnia *et al.*, 2010; Fonseca-Geil *et al.*, 2011; Portes *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2013; Paredes-Santos *et al.*, 2016). Para la línea HeLa hay descrita amplia bibliografía (Evans *et al.*, 1999; Ashburn *et al.*, 2000; Chatterton *et al.*, 2002; Chatterton *et al.*, 2010, Salimi *et al.*, 2016) señalando que es la mejor línea para mantener cultivos de *T. gondii* a lo largo del tiempo y obtener grandes cantidades de parásito viable. Chatterton *et al.*, (2002) comprobó que para mantener el cultivo durante largo tiempo era conveniente cambiar las condiciones de cultivo

una vez alcanzado el pico de máxima infección celular por el parásito, lo que hacía que, rebajando las condiciones de 37°C a 25°C, se pueda obtener taquizoítos de manera periódica cada 168h.

Muchas veces es imposible conseguir los dos objetivos primordiales del cultivo celular en uno solo: Conservación a largo plazo de las cepas deseadas sin tener que hacer pases en animales, así como la obtención barata y cuantiosa de parásito con fines antigénicos. Por esta razón, se han realizado estudios que intentan buscar nuevas condiciones para el cultivo de las líneas celulares y mantenimiento del parásito (Harmer *et al.*, 1996). Paralelamente, Evans *et al.* (1999) logró demostrar que las células de la línea HeLa son muy adecuadas para la consecución de una producción larga y continua de taquizoítos viables, aspecto también remarcado por Chatterton *et al.* (2010) mientras que Cuellar *et al.* (2012) comprobó que las células Vero presentan un buen índice de crecimiento y mayor consecución de células en el mismo periodo de tiempo que las células de la línea THP-1, que resultaron más eficaces como sujeto de invasión parasitaria por parte de *T. gondii*, siendo también muy adecuada para modelos de invasión y de diferenciación celular. Ballesteros *et al.* (2013) comparó en su estudio las líneas Vero y HEp-2, concluyendo que la línea HEp-2 es muy recomendable para el estudio de *Toxoplasma* si se para la realización de pruebas diagnósticas y por la alta obtención de parásito viable, mientras que Saadatnia *et al.* (2010) postuló que la línea Vero es la mejor para la obtención de taquizoítos viables.

Otro de los puntos clave para la consecución del cultivo de *T. gondii* es el medio a suministrar a las células para que se desarrollen adecuadamente. Aquí, los estudios consultados no difieren de lo recomendado por ATCC (ATCC, 2016-a, 2016-b, 2016-c, 2016-e, 2016-g); los medios DMEM y EMEM son los más utilizados por ser los más ricos en aminoácidos y más genéricos, y también porque son los recomendados para los cultivos de Vero y HeLa, que constituyen las líneas celulares más empleadas, aunque puede usarse en otras líneas como la HEp-2 y LLC-MK2 (Evans *et al.*, 1999; Chatterton *et al.*, 2002; de Assis Moura *et al.*, 2009; Chatterton *et al.*, 2010; Sadaatnia *et al.*, 2010; Ballesteros *et al.*, 2013; Contreras-Ochoa *et al.*, 2013; Paredes-Santos *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2015). El empleo de otros medios, como puede ser el RPMI-164, suele ir ligado al cultivo de las líneas celulares THP-1 y HFF (Cuellar *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2013; Guirelli *et al.*, 2015) ya que es el que mejor se adapta a sus necesidades.

Por su parte, los suplementos de SFB suelen variar en concentraciones entre el 10 en cultivos de crecimiento, pudiendo rebajarse hasta el 5%, 2%, o incluso eliminarse, cuando el cultivo está en mantenimiento. Existen estudios (Harmer *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1999; da Costa Silva *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2013) que demuestran que la rebaja posterior de la concentración de medio para mantenimiento, una vez establecida la confluencia celular, es igualmente efectiva y se consigue minimizar los problemas derivados del empleo de sueros como inducción de hipersensibilidad, evitar contaminaciones ligados a su empleo así como ahorro en los costes (Harmer *et al.*, 1996; Portes *et al.*, 2012; Weilhammer *et al.*, 2012; Guirelli *et al.*, 2015; Rivera-Fernández *et al.*, 2016; Salimi *et al.*, 2016).

Las condiciones de cultivo generales suelen estar a temperaturas de 37°C y concentraciones de CO<sub>2</sub> del 5% (Ashburn *et al.*, 2000; Saadatnia *et al.*, 2010; Chew *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2015) existiendo estudios paralelos (Chatterton *et al.*, 2002; Chatterton *et al.*, 2010; Salimi *et al.*,

2016) que demuestran que estas condiciones pueden ser variables.

Por norma general, el crecimiento de un cultivo celular suele ser más lento que el de bacterias y hongos, por lo que se hace necesario el empleo de antibiótico y antifúngico para evitar la aparición de contaminaciones que echen a perder el cultivo, siendo los más comúnmente utilizados la penicilina, estreptomina, gentamicina y anfotericina, en concentraciones variables. (Fonseca-Geil *et al.*, 2011; Degirmenci *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012; Cuellar *et al.*, 2012; Weilhammer *et al.*, 2012; Contreras-Ochoa *et al.*, 2013; Kalani *et al.*, 2016).

La cepa de taquizoítos que se van a utilizar para invadir el cultivo celular constituye un aspecto clave, debido a las características de cada línea clonal. Las más comúnmente utilizadas son las cepas RH tipo I, debido a su fácil invasión celular y crecimiento, además de ser la responsable de los casos agudos de toxoplasmosis (Saeij *et al.*, 2005; de Melo Ferreira *et al.*, 2006; Rico-Torres *et al.*, 2016). Cada línea clonal posee varias cepas que presentan diferentes grados de infección, así como de replicación, poder para diseminarse o bien para sobrevivir. Esta diferenciación de características dentro de las diferentes cepas puede responder a un rasgo evolutivo del *T. gondii*, que le permitiría diseminarse a través de los hospedadores intermediarios con mayor facilidad (de Melo Ferreira *et al.*, 2006).

Aunque la literatura refiere el uso de la cepa RH como la más ampliamente investigada (da Costa-Silva *et al.*, 2012) el gran número de cepas posibles de este parásito hace mandatorio que se necesiten más estudios respecto a ellas para entender mejor la fisiología del parásito y sus mecanismos patógenos, siguiendo el ejemplo de Paredes-Santos *et al.* (2016) que se valió de la cepa EGS para sus estudios, en los que se observó que esta cepa posee una capacidad mayor para diferenciarse espontáneamente en condiciones fisiológicas del estadio de taquizoíto al de bradizoíto, lo que en condiciones de laboratorio puede obtenerse mediante exposición a factores de estrés como alcalinización del medio o choques con calor (Müller & Hemphill, 2013). La cepa BK también está documentada de ser utilizada para algunos estudios (Harmer *et al.*, 1996).

Igualmente, otro de los aspectos más relevantes en cuanto al mantenimiento de *T. gondii* en cultivos celulares es la cantidad infectante de parásito que ha de inocularse a las células para la obtención de parásito viable, así como la viabilidad de éstos y la posible contaminación. Una vez más la bibliografía muestra resultados dispares, puesto que mientras que Saadatnia *et al.* (2010) encontró que la infección más eficaz era con un inóculo de  $1 \times 10^7$  taquizoítos, obteniendo la mejor multiplicación y menor contaminación de las muestras al trabajar sobre la línea Vero. En otros casos, parece que lo más óptimo sea realizar la infección de las células una vez estén en máxima confluencia y con un ratio de infección 1:1 célula-parásito o ligeramente superior. El estudio de da Costa Silva *et al.* (2012) utilizó ratios célula-parásito de 1:1,5 y 1:3, siendo el primer ratio el que mejor resultado ofreció y corroborando lo postulado por Saadatnia. La mayoría de la bibliografía consultada, no obstante, realizó la inoculación de las células con ratios de 1:1 (Harmer *et al.*, 1996; Chatterton *et al.*, 2002; Chatterton *et al.*, 2010; Degirmenci *et al.*, 2011; Salimi *et al.*, 2016) pero también existen estudios como el de Assis Moura *et al.* (2009) en el cual se utilizan bradizoítos como inóculo y ratios de 1:5, 1:10 y 1:20 parásito-célula, debido a la particularidad del estudio (utiliza células intestinales de gato)

así como las de los bradizoítos, que resultan muy infectivos en estas células.

Una vez iniciado el cultivo celular y seleccionada la cepa de taquizoítos que se vaya a utilizar, se procederá a realizar la invasión parasitaria de las células. Aquí, Saadatnia *et al.* (2010) estudió las diferentes confluencias celulares en las cuales la invasión del parásito es más eficaz llegándose a la conclusión de que a un porcentaje del 85% se produce la mejor obtención de taquizoíto viable, con mayores tasas de multiplicación así como una menor contaminación de la muestra sobre la línea Vero. No obstante Cuellar *et al.* (2012) da Costa-Silva *et al.* (2012) y Ballesteros *et al.* (2013) demuestran que el tema de la confluencia puede ser variable dependiendo de los procedimientos realizados a la hora del estudio puesto que ellos lograron conseguir sus objetivos con confluencias celulares por encima del 85%, incluso al 100%. Para otras líneas celulares (HeLa, HFF, LLC-MK2) se realiza la infección con taquizoítos por lo general con el 100% de confluencia celular, o aproximada (Chatterton *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2012; Paredes-Santos *et al.*, 2016).

Para conocer la viabilidad de los parásitos obtenidos, suele realizarse una prueba con azul de tripán. Esta prueba utiliza el colorante señalado para determinar el número de células presentes en suspensión, basado en el principio que las células vivas poseerán una membrana celular intacta que no permitirá a los colorantes teñir las células, mientras que las células dañadas si dejarán pasar los colorantes. Una vez realizada la tinción, se realiza una observación, generalmente en cámara de Neubauer, y recuento de las células. Si el porcentaje de células teñidas es alto, se considerará el cultivo inviable. La determinación de la viabilidad puede hacerse también con otros métodos como citometría de flujo (Saadatnia *et al.*, 2010; Fonseca-Geil *et al.*, 2011; Cuellar *et al.*, 2012). Por otra parte también resulta importante la evaluación del rendimiento del cultivo, índice que se obtiene dividiendo el número final de taquizoítos extracelulares viables obtenidos sobre el número de taquizoítos iniciales, lo que permite establecer comparaciones entre diversos métodos de cultivo del parásito y poder optimizar las condiciones de cultivo (Ballesteros *et al.*, 2013).

Además de todos estos métodos de cultivo en líneas celulares, existen otras formas de obtener taquizoítos, ya sea utilizando líneas celulares con condiciones menos convencionales así como sin su uso. De este modo encontramos los resultados ofrecidos por estudios como el de Harmer *et al.* (1996) el cual inició un cultivo celular en base a la línea HEp-2 con condiciones de cultivo y sin suero sin ninguna concentración de CO<sub>2</sub>, obteniendo buenos resultados hasta la aparición de contaminaciones. También se ha descrito sobre la línea HeLa (Salimi *et al.*, 2016) que el cultivo celular puede ser viable sin la utilización de CO<sub>2</sub>, mientras que Kalani *et al.* (2016) demostró que el mantenimiento de taquizoítos viables puede realizarse a 4°C adicionados con tampón fosfato salino (PBS) sin la utilización de líneas celulares. Esto permitiría su conservación de manera económica, pero no su multiplicación.

### **5.3.3 Protocolo de cultivo *Toxoplasma gondii* en la línea celular Vero**

La realización de este protocolo se ha efectuado en base a lo que se ha observado en los últimos meses en el laboratorio del edificio Centro de investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza, durante el cual mi labor fue la observación directa de cómo se iniciaba un cultivo celular con la

línea Vero para, posteriormente, ser infectada con taquizoítos de *T. gondii* provenientes de biomodelos, previamente infectados con ooquistes por vía oral.

Las condiciones bajo las que se ha trabajado siempre han sido de máxima esterilidad en una cabina de flujo laminar y, en concreto, cuando se trabaja con *Toxoplasma gondii*, en una cabina de bioseguridad tipo II.A con flujo laminar. Todo el material que se ha utilizado debía ser estéril (cubres, contadores, pipetas, pipetas serológicas, etc). El manejo de los botes de cultivo, así como el de los frascos con los distintos medios y reactivos, se ha realizado evitando tocar las superficies de las bocas y cuellos de los mismos, minimizando así posibles contaminaciones. Las pipetas utilizadas han sido estériles y desechables, tratando de evitarse que la punta de las mismas tocara ninguna superficie antes de que fueran introducidas en los botes de cultivo además de en los botes de medio, recomendándose la utilización de doble guante así como la desinfección con alcohol de los mismos antes de introducirlos dentro de la cabina para reducir el riesgo de contaminación.

Antes de iniciar el manejo de la línea celular, la superficie de la cabina ha de ser limpiada con un producto desinfectante (alcohol al 70%, Halamid o similar) para posteriormente poder introducir en la cabina el material que se vaya a utilizar, encendiéndose la luz ultravioleta dejándola actuar durante unos 15 minutos. Durante el tiempo de esterilización de la cabina, los medios de cultivo (DMEM) y el PBS se irán atemperando ya que éstos se mantienen en refrigeración. Los medios no deben estar turbios (posible contaminación que exigiera desecharlos) así como se recomienda que la tripsina (500mg/L) no esté mucho tiempo a temperatura ambiente porque puede inactivarse. Transcurrido el tiempo de esterilización se apaga la luz ultravioleta, se enciende la luz blanca de la cabina y se conecta el flujo laminar (hasta que no se estabilicen los ventiladores no se puede iniciar el trabajo).

El mantenimiento de las células VERO se ha realizado mediante pases 1:6, es decir, a partir de un frasco Roux con tapiz confluyente del cual se subcultivaba en otros 6 nuevos frascos Roux de la siguiente manera: Se sacaba el frasco con células de la estufa, observándose células con un microscopio óptico invertido de contraste de fases con el objetivo 10x, y se utilizaban aquellos en los que se apreciaba una imagen con un tapiz totalmente confluyente de células y medio transparente. Si se observaba turbio, era sinónimo de contaminación.

El frasco de Roux era introducido dentro de la cabina (previa limpieza externa con alcohol) retirándose el medio por decantación o mediante pipeta y depositándolo en un tubo falcon (30-50ml) que luego se desechaba. Se lavaba el frasco de células con PBS 1x estéril (5ml para los botes de 25cm<sup>2</sup>) mediante pipeta dos veces y siempre sobre el tapiz celular moviendo el bote suavemente con el PBS en contacto con toda la superficie celular y retirando con la misma pipeta. El lavado con el PBS es imprescindible ya que permite retirar del medio los restos de SFB que podrían inhibir la acción de la tripsina. Una vez lavado se procedía a añadir la tripsina. Para los botes de 25cm<sup>2</sup> se ha utilizado una cantidad de 1ml, dejándola actuar durante 2-3 minutos en la estufa a 37°C. Transcurrido ese periodo se revisaba, bien a trasluz o mediante el microscopio invertido de contraste de fases, y se comprobaba si se las células se habían desprendido. Podía efectuarse pequeños golpes en el lateral del bote para favorecer el proceso. Si las células no se habían desprendido, el frasco era devuelto a la estufa un par de minutos más. Posteriormente, se detenía la acción de la tripsina mediante la adición con

jeringuilla (con filtros de 0,22µm) de medio de cultivo (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB). El % del suplemento de SFB varía en función de lo que se requiriese; si se trataba de mantener la línea celular, el medio de cultivo era suplementado con 10% de SFB y antifúngico 1% (Si se infecta con *Toxoplasma gondii* el medio debe estar suplementado con el 5% de SFB y sin antifúngico). (Antibiótico sin antifúngico 100x (Penicilina – Estreptomina) y con antifúngico 100x (Penicilina-Estreptomina-Fungizona). El volumen de medio a añadir era, como mínimo, igual al volumen de tripsina, aunque es conveniente añadir más cantidad para diluir la tripsina. Por ello se le añadía 5ml que, junto al ml de la tripsina nos daba un volumen de 6ml (Volumen\*). Este volumen se resuspendía varias veces con una pipeta (unas 10 veces y sin hacer espuma) para disgregar bien las células y se depositaba 1ml en cada uno de los nuevos botes (6 botes). Posteriormente se le añadía a cada bote 5ml de medio nuevo (cada bote contenía 6ml de volumen). El número de pase y los días que pasan desde el último pase eran anotados en el lateral del frasco. Normalmente, se guardaba un bote del pase anterior y los restantes eran descartados. Los botes de cultivo no se deben tocar hasta pasadas como mínimo 6 horas, de este modo, las células se depositan en el fondo del bote y se pegan. El mantenimiento del cultivo se llevaba a cabo en estufa a 37°C y con una botella de CO<sub>2</sub> conectada al 5%.

Para conocer la concentración de las células obtenidas, se realiza el recuento de las mismas en una cámara de Neubauer. Para ello, se hace una dilución 1/10 de la suspensión celular (\*volumen de 6 ml que contiene 1ml de tripsina + el medio antes de dividirlo) en tripán azul al 0.05% en PBS al 1x en un eppendorf (volumen 1,5ml) se ponen 100µl del volumen universal + 900 µl de tripán azul, se mezclan bien, se toman 9µm de la dilución y se dispensan en cada una de las hemicámaras. Se contabilizan 4 hemicámaras y se hace la media de los cuatro recuentos. Para cuantificar las células/ml se utiliza la siguiente fórmula: media del recuento x 10 (dilución) x 10000 (factor de la cámara)/ml Para cuantificar todas las células que tenemos en el bote se multiplica por el volumen total (6 ml). Para infectar se necesita una dosis celular de 3-5 x 10<sup>5</sup> células para botes de 25 cm<sup>2</sup>.

El subcultivo se ha realizado mediante pases 1:6, es decir a partir de un bote de células infectadas con taquizoítos de *T. gondii* (que se obtuvieron a partir de ratones infectados con la cepa VEG realizando lavados intraperitoneales) preparándose otros 6 nuevos botes. Para mantener los aislados de *T. gondii* se necesitan 6 botes de células VERO no infectadas, preparados previamente según el procedimiento anterior, solo que, en este caso, con suplemento del 5% de SFB y sin antifúngicos. A las 24-48 horas de haber preparado los botes con cultivo con la cantidad de células conocidas se procedía a infectar. Sin embargo, es posible que este tiempo resulte mayor ya que para proceder a la infección el tapiz celular deberá estar confluyente. Para subcultivar el aislado, se tomaba de la estufa un bote ya infectado y se observaba al microscopio invertido. Se debe ver el tapiz con infección generalizada, con numerosas vacuolas grandes en el interior de las células y abundantes taquizoítos saliendo de las mismas y flotando en el sobrenadante. El frasco de células infectadas era entonces introducido en la cabina raspándose el tapiz con una varilla estéril. Se pasaba el volumen a través de una aguja de insulina (25G) 2-3 veces para romper las células y liberar los taquizoítos intracelulares. Inmediatamente se realizaba el recuento de taquizoítos de la misma manera que la descrita con anterioridad. Para ello se tomaban 100 µl + 900 µl de tripán azul al 0.05%

en PBS.

Una vez realizado el recuento, se distribuía 1 ml a cada uno de los nuevos 6 botes con células Vero (previa retirada del medio anterior) y se añadía 5ml de medio de cultivo nuevo suplementado con 5% de SFB y sin antifúngicos, hasta completar un volumen total de 6ml. El mantenimiento se lleva a cabo de la misma forma en la estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

## **6. Conclusiones**

*Toxoplasma gondii* es un parásito apicomplejo difundido por todo el mundo, que puede afectar a toda clase de animal de sangre caliente y multiplicarse en cualquier célula nucleada. Aunque conocemos su ciclo vital y su desarrollo, hay muchas preguntas sin respuesta en torno a sus mecanismos efectores una vez se halla en un hospedador, así como la importancia y magnitud real que puede suponer este parásito en nuestro día a día. Lo que sí que se ha podido demostrar, es que aunque el gato es un eslabón clave en su ciclo vital, la posesión de este animal no implica mayor probabilidad de infectarse por el parásito puesto que las infecciones en los humanos suelen ir ligadas al consumo de carne infectada mal preparada y cocinada.

Los cultivos celulares tienen ventajas éticas y económicas obvias, pero el empleo de estos implica dificultades para mantener el propio cultivo, siendo imposible conseguir cantidades masivas del parásito y conservar su infectividad a lo largo del tiempo sin tener que recurrir a pasajes en biomodelos. La diversidad de datos y procedimientos aúnan en la conclusión de que es imposible establecer una única estrategia para la realización de un cultivo celular que pueda satisfacer todas las necesidades para el estudio de *T. gondii*. Cada línea celular posee una serie de características propias que las hacen más viables según el fin investigativo que se precise.

Por último, la realización del protocolo de mantenimiento de *T. gondii* sobre la línea celular Vero ha supuesto el poder presenciar de primera mano cómo se trabaja en un laboratorio, ya que, a pesar de la revisión bibliográfica, aunar todos los conceptos analizados se hace una tarea muy ardua hasta que no se observa directamente cómo se realiza.

## **6. Conclusions**

*Toxoplasma gondii* is a world-wide spread apicomplexan parasite capable of infect any kind of blood-warmed animal and proliferate in any kind of nucleated cell. Although we know its life cycle, there are still many questions without an answer. Some of them are how its mechanism works *in vivo*, and which its real magnitude is. Even so, it has been demonstrated that cats, even being such a vital part at its life cycle, it does not represent a major factor to spread the parasite to human beings due to the fact that human infections are more related to raw meat or barely cooked beef consumption.

Cell cultures have demonstrated to have ethic and economic advantages, but its use still means difficulties such as long term maintenance, acquire of massive parasite quantities and long period infective ability preservation without appealing to bioassay passages. Diversity between



data and methods has proven that is impossible to establish a universal culture strategy which can be able to satisfy every need in *T. gondii's* research. Each cell line has its own characteristics, which are more appropriate to acquire different aims.

Finally, the elaboration of this laboratory protocol has supposed to me to be present watching how the maintenance protocol of *T. gondii* in Vero cells has been done. This has meant an important aid because, despite digging through all the quoted literature, it would have been impossible to figure out how a real laboratory works without watching it by myself.

## **7. Valoración personal**

La realización de este trabajo ha supuesto un ejercicio de búsqueda y síntesis de textos de carácter científico que nunca antes me había visto abocado a hacer a lo largo de esta carrera, y que me servirá de inestimable ayuda a la hora de enfrentar experiencias similares en un futuro próximo. Quitando el plano académico, en la vertiente personal este trabajo ha permitido ampliar mi conocimiento en temas que, aunque ya habían despertado previamente mi interés, nunca había tenido ocasión de investigar tan profundamente, siendo una gratificante forma de seguir *in situ* la evolución de un cultivo, aprendiendo con ello todas las etapas de preparación del cultivo así como la familiarización con las pautas que deben seguirse en un laboratorio, que, sin haber presenciado de primera mano, muy seguramente no habría entendido completamente ni tenido en consideración a la hora de planear mí ya cercano futuro profesional.

## **8. Bibliografía**

- Acha, P., & Szyfres, B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Parasitosis, Publicacion Cinetifica Tecnica*, 580: 53–64.
- Artigas, R., & Amores, W. (2012). Aspectos básicos sobre la patogenia, respuesta inmune y bioseguridad en el trabajo con el *Toxoplasma gondii*. *Correo Científico*, 16: 1º.
- Ashburn, D., Evans, R., Chatterton, J. M., Joss, A. W., & Ho-Yen, D. O. (2000). *Toxoplasma* dye test using cell culture derived tachyzoites. *Journal of clinical pathology*, 53: 630-633.
- Ballesteros, D. A., Benavides, Y. L., & Cely, A. Z. (2013) Comparación del cultivo *in vitro* de *Toxoplasma gondii* cepa RH en las líneas celulares Hep-2 y Vero. *SECCIÓN ARTÍCULOS ORIGINALES REVISTA UNIVERSIDAD Y SALUD*, 15(2): 209 - 217.
- Barbosa, B. F., Gomes, A. O., Ferro, E. A. V., Napolitano, D. R., Mineo, J. R., & Silva, N. M. (2012). Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Veterinary Parasitology*, 187: 44-52.
- Chatterton, J. M. W., Evans, R., Ashburn, D., Joss, A. W. L., & Ho-Yen, D. O. (2002). *Toxoplasma*

- gondii* *in vitro* culture for experimentation. *Journal of Microbiological Methods*, 51: 331-335.
- Chatterton, J. M. W., McDonagh, S., & Ho-Yen, D. O. (2010). *Toxoplasma* tachyzoites from cell culture are more appropriate in some situations. *Journal of clinical pathology* 63: 438-440.
- Chew, W. K., Wah, M. J., Ambu, S., & Segarra, I. (2012). *Toxoplasma gondii*: Determination of the onset of chronic infection in mice and the *in vitro* reactivation of brain cysts. *Experimental Parasitology*, 130: 22-25.
- Contreras-Ochoa, C. O., Lagunas-Martínez, A., Belkind-Gerson, J., Díaz-Chávez, J., & Correa, D. (2013). *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Experimental Parasitology*, 134: 256-265.
- Cuellar, J. A., Hernández, A., Villegas, E., & Gómez, J. E. (2012). Eficiencia de cultivo *in vitro* de *Toxoplasma gondii* en las líneas celulares THP1 y Vero. *Biomédica*, 32(3): 461-466.
- da Costa-Silva, T. A., da Silva Meira, C., Frazzatti-Gallina, N., & Pereira-Chioccola, V. L. (2012). *Toxoplasma gondii* antigens: Recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. *Experimental Parasitology*, 130: 463-469.
- da Silva, L. L. R., Portes, J. de A., de Araújo, M. H., Sant'ana Silva, J. L., Rennó, M. N., Netto, C. D., DaMatta, R. A. (2015). Further evidence that naphthoquinone inhibits *Toxoplasma gondii* growth *in vitro*. *Parasitology International* 64: 622-631.
- de Assis Moura, M., Reis Amendoeira, M. R., & Santos Barbosa, H. (2009). Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 104(6): 862-864.
- de Melo Ferreira, A., Vitor, R. W. A., Gazzinelli, R. T., & Melo, M. N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1): 22-31.
- Degirmenci, A., Döskaya, M., Caner, A., Çiçek, C., Korkmaz, M., Gürüz, Y., & Üner, A. (2011). *Toxoplasma gondii* RH Ankara: Production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Experimental Parasitology*, 128: 1-8.
- di Cristina, M., Marocco, D., Galizi, R., Proietti, C., Spaccapelo, R., & Crisanti, A. (2008). Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into bradyzoites and tissue cyst formation *in vivo*. *Infection and Immunity*, 76: 3491-3501.
- Díaz, L., Zambrano, B., Chacón, G., Rocha, A. & Díaz, S. (2010). Toxoplasmosis y embarazo. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXVII*, 1: 54-67.
- Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1019-1024.
- Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126: 57-72.

- Dubey, J. P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology*, 140: 69-75.
- Dubey, J. P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55: 467-475.
- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39: 877-882.
- Dubey, J. P., & Jones, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38: 1257-1278.
- Evans, R., Chatterton, J. M., Ashburn, D., Joss, a W., & Ho-Yen, D. O. (1999). Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 18: 879-884.
- Fekadu, A., Shibre, T., & Cleare, A. J. (2010). Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders--overview of evidence and mechanisms. *Folia parasitológica*, 57: 105-113.
- Fenoy, I. M., Sánchez, V. R., Soto, A. S., Picchio, M. S., Martin, V., & Goldman, A. (2015). *Toxoplasma gondii* infection modulate systemic allergic immune response in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 154: 47-50.
- Fernández-Aguilar, X., Ajzenberg, D., Cabezón, O., Martínez-López, A., Darwich, L., Dubey, J. P., & Almería, S. (2013). Fatal toxoplasmosis associated with an atypical *Toxoplasma gondii* strain in a Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, 196: 523-527.
- Flegr, J. (2013). How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends in Parasitology*, 29: 156-163.
- Flegr, J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*–human model in studying the manipulation hypothesis. *Journal of Experimental Biology*, 216(1): 127–133.
- Fonseca-Geil, G., Alvarez, M., García, G., Cox, R., Morier, L., Fonte, L., & Guzmán, M. G. (2011). Plaque Formation of *Toxoplasma gondii* in Vero Cells using Carboxymethylcellulose. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 5(4): 194-196.
- Freshney, R.I. (2010). Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications (Sixth edition). *Wiley-Blackwell, University of Glasgow*. 21-22, 47-50, 89-90, 299-311.
- García-Bocanegra, I., Simón-Grifé, M., Dubey, J. P., Casal, J., Martín, G. E., Cabezón, O. & Almería, S. (2010). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitology International*, 59: 421-426.
- Guirelli, P. M., Angeloni, M. B., Barbosa, B. F., Gomes, A. O., Castro, A. S., Franco, P. S., & Ferro, E. A. (2015). Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma*

*gondii* infection. *Placenta*, 36: 1106-1114.

Harmer, C., Aspöck, H., & Hassl, A. (1996). *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: Easy handling long-term propagation. *Journal of Microbiological Methods*, 27: 221-223.

Harmer, C., Hassl, A., Kreinecker, S., & Aspöck, H. (1996). *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: Economic and efficient mass production. *Journal of Microbiological Methods*, 27: 225-228.

Hu Ke, Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., & Murray, J. M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine - The apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 2(2): 121-138.

Kalani, H., Daryani, A., Sharif, M., Ahmadpour, E., Alizadeh, A., Nasrolahei, M., Sarvi, S., Kalani, F., & Faridnia, R. (2016). Comparison of Eight Cell-Free Media for Maintenance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Iranian Society of Parasitology*, 11: 104-109.

Klotz, C., Aebischer, T., & Seeber, F. (2012). Stem cell-derived cell cultures and organoids for protozoan parasite propagation and studying host-parasite interaction. *International Journal of Medical Microbiology*, (302): 203-209.

Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Hall, J. E., & Tidwell, R. R. (1991). Activity of pentamidina and pentamidine analogs against *Toxoplasma gondii* in cell cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 193-215.

Lopes, W. D. Z., Rodriguez, J. D. A., Souza, F. A., dos Santos, T. R., dos Santos, R. S., Rosanese, W. M., & da Costa, A. J. (2013). Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 195: 47-56.

Markovitz, A. A., Simanek, A. M., Yolken, R. H., Galea, S., Koenen, K. C., Chen, S., & Aiello, A. E. (2015). *Toxoplasma gondii* and anxiety disorders in a community-based sample. *Brain, Behavior, and Immunity*, 43: 192-197.

Mavin, S., Evans, R., Chatterton, J. M. W., Ashburn, D., Joss, A. W. L., & Ho-Yen, D. O. (2003). *Toxoplasma gondii* from liquid nitrogen for continuous cell culture: Methods to maximise efficient retrieval. *British Journal of Biomedical Science*, (60): 217-220.

Mavin, S., Joss, a W. L., Ball, J., & Ho-Yen, D. O. 2004. Do *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites evolve during continuous passage? *Journal of Clinical Pathology*, (57): 609-611.

Meissner, M. (2013). The asexual cycle of apicomplexan parasites: New findings that raise new questions. *Current Opinion in Microbiology*, 16: 421-423.

Mondragón, R. & Muñiz, S. (2009). *Toxoplasma gondii*, un parásito asesino re-emergente. *Revista de Educación Bioquímica*, 28: 52-58.

Müller, J., & Hemphill, A. (2013). In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 43: 115-124.

- Mzabi, A., Escotte-Binet, S., Le Naour, R., Ortis, N., Audonnet, S., Dardé, M. L., & Villena, I. (2015). Optimization of the cryopreservation of biological resources, *Toxoplasma gondii* tachyzoites, using flow cytometry. *Cryobiology*, 71: 459-463.
- Paredes-Santos, T. C., Martins-Duarte, E. S., Vitor, R. W. A., de Souza, W., Attias, M., & Vommaro, R. C. (2013). Spontaneous cystogenesis *in vitro* of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology International*, 62: 181-188.
- Paredes-Santos, T. C., Tomita, T., Yan Fen, M., de Souza, W., Attias, M., Vommaro, R. C., & Weiss, L. M. (2016). Development of dual fluorescent stage specific reporter strain of *Toxoplasma gondii* to follow tachyzoite and bradyzoite development *in vitro* and *in vivo*. *Microbes and Infection*, 18: 39-47.
- Portes, J. de A., Netto, C. D., da Silva, A. J. M., Costa, P. R. R., DaMatta, R. A., dos Santos, T. A. T. & Seabra, S. H. (2012). A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, 186: 261-269.
- Raiden Grandía, G., Ángel Entrena, G., & Jeddú Cruz, H. (2013). Toxoplasmosis en *Felis catus*: Etiología, epidemiología y enfermedad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24: 131-149.
- Rico-Torres, C. P., Vargas-Villavicencio, J. A., & Correa, D. (2016). Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35: 1079–1088.
- Rivera Fernández, N., Mondragón Castelán, M., González Pozos, S., Ramírez Flores, C. J., Mondragón González, R., Gómez de León, C. T. Mondragón Flores, R., Marreo Ponce, Y., J. Arán, V., & Martins Alho, M.A. (2016). A new type of quinoxalinone derivatives affects viability, invasion, and intracellular growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Parasitology Research*, 115: 2081-2096.
- Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B. Y., Maimunah, A., & Rahmah, N. (2010). Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Tropical Biomedicine*, 27: 125-130.
- Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21(10): 476–481.
- Salimi, M., Shojaee, S., Keshavarz, H., & Mohebbali, M. (2016). Cyst Formation from Virulent RH Strain of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite: *In Vitro* Cultivation. *Iranian Society of Parasitology*, 11: 81-85.
- Sugden, K., Moffitt, T. E., Pinto, L., Poulton, R., Williams, B. S., & Caspi, A. (2016). Is *Toxoplasma gondii* infection related to brain and behavior impairments in humans? Evidence from a population-representative birth cohort. *PLoS ONE*, 11: 1-14.
- Sullivan, W. J., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 717-733.

Swierzy, I. J., Muhammad, M., Kroll, J., Abelmann, A., Tenter, A. M., & Lüder, C. G. K. (2014). *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: A critical interplay for food-borne parasite transmission. *International Journal for Parasitology*, 44: 91-98.

Waap, H., Cardoso, R., Leitão, A., Nunes, T., Vilares, A., Gargaté, M. J. & Ângelo, H. (2012). *In vitro* isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 187: 542-547.

Webster, J. P., & McConkey, G. A. (2010). *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: Clues as to mechanism of action. *Folia Parasitologica*, 57: 95-104.

Weilhammer, D. R., Iavarone, A. T., Villegas, E. N., Brooks, G. A., Sinai, A. P., & Sha, W. C. (2012). Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 42: 947-959.

Weiss, L. M., & Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 5: 391-405.

Yang, Z., Ahn, H. J., & Nam, H. W. (2014). Gefitinib inhibits the growth of *Toxoplasma gondii* in HeLa cells. *Korean Journal of Parasitology*, 52: 439-442.

Páginas web consultadas correspondientes a Organizaciones de ámbito nacional e internacional

ATCC (2016-a): HeLa (ATCC<sup>R</sup> CCL-2<sup>TM</sup>). Recuperado de: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx#culturemethod>

ATCC (2016-b): HEp-2 (ATCC<sup>R</sup> CCL-23<sup>TM</sup>). Recuperado de: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-23.aspx#culturemethod>

ATCC (2016-c): HFF (ATCC<sup>R</sup> SRC-1041<sup>TM</sup>). Recuperado de: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/SCRC-1041.aspx#culturemethod>

ATCC (2016-d): Protistology culture guide, tips for propagating protozoa and algae. Recuperado de: <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/ProtistologyGuide.ashx>

ATCC (2016-e): THP-1 (ATCC<sup>R</sup> TIB-202<sup>TM</sup>). Recuperado de: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-202.aspx#culturemethod>

ATCC (2016-f): *Toxoplasma gondii* (ATCC<sup>R</sup> PRA-310<sup>TM</sup>). Recuperado de: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PRA-310.aspx?geo\\_country=es#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PRA-310.aspx?geo_country=es#documentation)

ATCC (2016-g): Vero cells (ATCC<sup>R</sup> CCL-81<sup>TM</sup>). Recuperado de: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-81.aspx?geo\\_country=es#](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-81.aspx?geo_country=es#)

Cultek (2007): Documento de aplicación: Cultivos celulares. Recuperado de: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica\\_Cultivos\\_Celulares](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares)

[2007.pdf](#)

ESPAÑA. 1997. Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. BOE nº 124 24/05/1997. Recuperado de: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/agen\\_bio.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/agen_bio.pdf)

González Mañas, J. M., & Sánchez Marino, A. (2015). Introducción al cultivo celular. *Universidad Del País Vasco*, 1–12. Recuperado de: [http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf)

OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres (2008) Capítulo 2.9.10 Toxoplasmosis. Recuperado de: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.10.%20Toxoplasmosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.10.%20Toxoplasmosis.pdf)

Otero, J. A. (2014). Tipos de contaminación en cultivos celulares y su prevención, (3–5). Recuperado de: <http://servicios.unileon.es/formacion-pas/files/2014/02/Contaminaciones-y-prevencion.pdf>

Segretín, M.E. (2002). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos celulares de animales 1-6) *ArgenBio: Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología*. Recuperado de: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>

Sheets, R. (2000). History and Characterization of the Vero Cell Line. *Vaccines and related Biological Products Advisory Committee*, 1–12. Recuperado de: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a.pdf>

Scottish *Toxoplasma* Reference Laboratory: Annual report 2014-2015. Recuperado de: <http://www.documents.hps.scot.nhs.uk/labs/strl/ar-strl-2014-2015.pdf>

World Health Organization. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Recuperado de: <http://www.who.int/bulletin/volumes/91/7/12-111732/en/>