UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

EFEITOS CLASTOGÊNICOS CAUSADOS POR VÁRIOS
SOROTIPOS DE *Ureaplasma urealyticum*
E ESPÉCIES DO GÊNERO *Mycoplasma* SOBRE
CULTURAS TEMPORÁRIAS DE LINFÓCITOS

REGINA AYR FLÓRIO DA CUNHA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profª. Dra. SUEKO TAKIMOTO MASAOKA

São Paulo
1993

REGINA AYR FLORIO DA CUNHA

TÍTULO: Efeitos clastogênicos causados por vários sorotipos
de Ureaplasma urealyticum e espécies do gênero
Mycoplasma sobre culturas temporárias de linfócitos.

Tese para obtenção do Grau de Doutor

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Sueko Takimoto Masaoaka
Presidente e Orientador

Prof. Dr. Sandra M. Ottati de O. Nitrini
2º Examinador

Prof. Assoc. Roberto Mitis Javaguita
3º Examinador

Prof. Dr. Célia Ryszkułnik Koiffman
4º Examinador

Prof. Dr. Anita Wayntal
5º Examinador

São Paulo, 19 de julho de 1.993.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe Otilia e à minha mana Mariangela,
sem dúvida nenhuma duas grandes mulheres das quais muito me
orgulho e as quais muito devo.

À Raquelzinha
com carinho

À Memória de meu pai
que partiu antes
dêste estar concluído

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que colaboraram para a realização deste trabalho e a eles serei eternamente grata.

Profa. Dra. Sueko Takimoto Masaoka pela orientação segura de mais um trabalho nosso.

Profa. Dra. Kioko Takei minha mestre , minha amiga.

Às Profas. Dras. Dulcinéia S.P. Abdalla, Yoshimi Yamamoto e Ana Campa colegas e amigas com quem sempre pude contar.

Ao Prof. Dr. Glavour Matté e Profa. Marilena Matté da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Saude Pública.

Às Profas. Dras. Célia Koiffmann e Anita Wajntal do Laboratório de Citogenética da Unidade de Aconselhamento Genético do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP por nos ter recebido e apoiado durante todo nosso estágio.

Ao Prof. titular Antonio Neto Cestari chefe do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP, por nos ter incentivado ao aprendizado das técnicas citogenéticas.

Ao Prof. Paulo S.Minami chefe do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Fac. de Farmácia da USP pelo apoio.

Aos demais colegas e funcionários, os meus sinceros agradecimentos.

Em especial a vocês : Deise Helena de Souza, com quem muito apreendi e a quem sou muito grata; à Suely Nonogaki A. Grosso, meu braço direito; à Sofia Fátima Cruz pelo esforço supremo na reta final; ao João pelo trabalho fotográfico; à Moema, bibliotecária; ao Sr. Raimundo e dona Ana pela amizade, ao Sr. Sarto e à Inês Cardillo por tudo.

À Maria Rosa Spedalletti e à Maria Tereza Freire pelo carinho e amizade a mim dedicados.

E ainda meus sinceros agradecimentos à:

Carlos Malheiros responsável pela concretização de nossa proposta de trabalho, ao conseguir junto à Difco americana o painel de cepas de micoplasmas.

CNPq pelo apoio financeiro ao nosso projeto.

INDICE

1 Introdução.....	1
1.1 Histórico.....	1
1.2 Considerações gerais sobre Micoplasmas envolvidos em patologia humanas.....	3
1.3 Possíveis mecanismos de patogenicidade.....	14
1.3.1 Adesinas; receptores e liberação de substâncias específicas.....	17
1.3.2 Ação enzimática.....	20
2 Objetivo.....	23
3 Material e Métodos.....	25
3.1 Cepas de micoplasmas empregados no presente estudo..	25
3.2 Meios de cultura utilizados no cultivo dos micoplasmas.....	26
3.3 Técnicas empregadas para a determinação das concentrações e viabilidade de micoplasmas utilizados no ensaio.....	33
3.3.1 Microtitulação.....	33
3.3.2 Macrotitulação.....	35
3.3.3 Teste de viabilidade das cepas.....	36
3.4 Cultura de linfócitos.....	38
3.5 Critérios de análise.....	42
3.5.1 Efeito dos micoplasmas no índice mitótico.....	42

3.5.2 Análise cariotípica.....	42
3.6 Análises estatística.....	44
4 Resultados.....	46
4.1 Índice mitótico.....	46
4.1.1 Graus de inibições mitóticas.....	48
4.1.1.1 Índices mitóticos iguais ou inferiores a 10.....	48
4.1.1.2 Mitoses normais.....	49
4.1.1.3 Mitoses alteradas com índices mitóticos superiores a 10.....	75
4.2 Teste de significância aplicado aos valores encontrados.....	76
4.3 Tipos de frequência de aberrações cromossômicas.....	78
4.4 Frequência total de aberrações cromossômicas.....	95
4.5 Determinação das frequências das células com uma alteração e das células com mais de uma alteração...	96
5 Discussão.....	100
6 Conclusões.....	113
7 Resumo.....	115
8 Summary.....	116
9 Referências Bibliográficas.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A representatividade dos micoplasmas dentro das patologias humanas é apenas em parte conhecida, sendo ainda, o universo de associações entre a sua presença e o desencadeamento de doenças, um campo aberto às investigações.

Dentre quase uma centena de diferentes espécies reconhecidas de micoplasmas, cêrca de trinta espécies podem ser patogênicas para o homem. Já bem conhecidas são as doenças, muitas vezes fatais, causadas em animais, insetos e plantas, quer em condições naturais, quer em condições experimentais. A busca de evidências que indiquem haver correlação entre a presença dos micoplasmas, a morbidade e até mesmo a mortalidade humanas, tem sido objeto de cientistas e pesquisadores em todo o mundo.

O estudo dos micoplasmas teve início em 1882 com Louis Pasteur, que preocupado em descobrir o agente causador da pleuropneumonia bovina, doença respiratória grave que dizimava rebanhos inteiros, verificou ser este, um microrganismo incomum, o qual não podia ser observado através da microscopia comum e tampouco crescia nos meios nutricionais, empregados usualmente em bacteriologia, naquela época (105).

A caracterização do agente anos mais tarde, possibilitou o reconhecimento da existência de outros microrganismos semelhantes, isolados de vários materiais clínicos envolvendo outras patologias animais, tendo sido denominados de "Pleuro Pneumoniae Like Organisms" (PPLOs) (34).

Posteriormente seguiram-se outros isolamentos de microrganismos do grupo PPLO, de animais, do solo, de material orgânico em decomposição, etc., até que em 1937, Dienes e Edsall registraram o isolamento do primeiro caso humano (29). Sucederam-se vários outros isolamentos de PPLOs do homem especialmente do trato urogenital, orofaringe e ocasionalmente de outros sítios anatômicos. Todavia a maioria não foi caracterizada antigênicamente ou sequer preservada para uma análise futura, o que impossibilitou a realização de uma correlação entre as cepas.

Em fins da década de 30 e início de 1940, foi detectada a existência de um processo pneumônico de etiologia não bacteriana, uma síndrome denominada de Pneumonia Atípica Primária (PAP). O agente foi evidenciado em 1944 por Eaton e somente em 1962 Chanock e al. conseguiram seu cultivo em meios artificiais; estava assim caracterizado o primeiro PPLO causador de uma doença humana. Em 1963, Mycoplasma pneumoniae foi o nome proposto pelo próprio Chanock e a partir daí muito se tem feito no campo da Micoplasmologia Humana, sobretudo nestas tres

últimas décadas (44).

1.2 Considerações gerais sobre Micoplasmas envolvidos em patologias humanas.

Muitos micoplasmas foram descobertos, enquanto que outros já conhecidos, tiveram elucidados vários de seus mecanismos de ação e reveladas muitas de suas características estruturais, envolvidas no processo da patogenia.

Estruturalmente estes microorganismos apresentam: ausência da parede celular, uma característica que os distingue de outros procariotos, sendo a responsável pela maioria das propriedades do grupo, incluindo sua morfologia típica e plasticidade. Envoltos somente por uma membrana trilamelar de natureza lipoproteica de aproximadamente 10 nm, possivelmente recobertos por uma camada extramembranosa poliônica de aproximadamente 15 a 30 nm de espessura, sintetizam suas proteínas através de ribossomos e de uma dupla fita de DNA, imersos no citoplasma (86).

Dentre as muitas espécies de micoplasmas humanos conhecidas, várias têm sido isoladas do trato geniturinário, algumas como prováveis oportunistas: Mycoplasma pneumoniae e Mycoplasma genitalium; outras como verdadeiros coloni-zadores: Mycoplasma fermentans, Mycoplasma hominis e Ureaplasma

urealyticum. Dentre estas, Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum são de longe as mais frequentemente encontradas. Apesar dos inúmeros estudos existentes na literatura, sua participação na patologia urogenital e suas possíveis consequências são ainda imprecisas (40).

Aguns comentários sobre o envolvimento do Mycoplasma fermentans, Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum na doença humana e suas implicações, serão aqui feitos com o intuito de trazer um melhor embasamento ao nosso trabalho.

Mycoplasma fermentans

Desde seu primeiro achado originalmente no trato geniturinário humano em 1950, Mycoplasma fermentans tem sido isolado raramente do homem.

Estudos sorológicos, contudo, têm sugerido ser comum a presença de anticorpos para Mycoplasma fermentans em soros de adolescentes e adultos jovens, contrastando com seu raro isolamento do material clínico. Esta aparente discrepância, talvez se deva ao fato de algumas de suas cepas serem encontradas intracelularmente.(122).

Recentemente, um micoplasma isolado por LO e col.(60), de um paciente com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS),

foi associada a complicações do sistema renal e sistema nervoso central. Inicialmente identificado como "Mycoplasma incognitus" foi mais tarde definido como Mycoplasma fermentans (cepa incognitus). Essa mesma cepa estava associada à doença respiratória aguda fatal em pacientes não infectados com retrovírus (HIV). Os autores reproduziram ainda infecção sistêmica fatal em primatas (59).

Tem sido proposto recentemente que o HIV requer a presença de micoplasmas como copatógenos para causar a síndrome da imunodeficiência adquirida. Mycoplasma fermentans (cepa incognitus) assim como Mycoplasma fermentans cepa KL4, PG18, IM1, têm a capacidade de ativar monócitos do sangue periférico humano e macrófagos de rato, e ainda secretar altos níveis de citocinas incluindo TNF alpha (tumor necrosis fator alpha) de maneira dose-dependente, fatores estes envolvidos na ativação do HIV. A secreção de interleucina 1 (IL-1) foi também estimulada, quando o microrganismo foi incubado com monócitos humanos (38, 72, 110).

Células de Mycoplasma fermentans de cepas isoladas do trato geniturinário inferior de indivíduos aparentemente saudáveis e de medula óssea de pacientes leucêmicos, têm também a propriedade de induzir a produção de substâncias tóxicas, letais, para ratos e macacos como foi demonstrado por Gabridge et al. (37, 9).

Apesar das baixas taxas de isolamento as possíveis consequências de sua presença nos vários sítios anatômicos, fazem com que se intensifiquem cada vez mais as pesquisas com Mycoplasma fermentans.

Mycoplasma hominis

Aparecendo como um verdadeiro comensal pertencente à microflora dos tratos geniturinários masculino e feminino, Mycoplasma hominis tem sido isolado em taxas consideráveis (8 a 50%) tanto de homens e mulheres saudáveis e sexualmente ativos, como de pacientes assintomáticos(30).

Vários são os trabalhos que associam Mycoplasma hominis com casos de aborto espontâneo (42), infecções intraamnióticas (74) (28), doença pélvica inflamatória (69), corioamnionite (125), febre pós parto(137, 43) etc., tendo sido reconhecido também como um patógeno extragenital em casos de infecções pulmonares (88, 136), artrite séptica(21, 77), infecções em pacientes transplantados (67, 48), com próteses (109) e em pacientes imunocomprometidos(67, 131). Contudo, seu envolvimento nas infecções do trato genital inferior da mulher e suas consequências, vem despertando cada vez mais interesse devido à correlação entre a presença do agente no trato genital e as alterações ginecológicas e obstétricas (11).

A infecção do recém-nascido pelo Mycoplasma hominis e outros micoplasmas genitais ocorre provavelmente quando do nascimento, durante a passagem pelo canal vaginal, ou ainda mais raramente através da contaminação do líquido amniótico, decorrente da ascensão do microorganismo. Como consequência, muitas vezes, a despeito da ausência de sintomas, a infecção amniótica pode persistir e levar ao parto prematuro (81). Neste aspecto a imaturidade decorrente do parto prematuro é um dos principais problemas em obstetrícia, sendo responsável por cerca de 75% da morbidade e mortalidade neonatal (32, 82).

Os testes sorológicos positivos para Mycoplasma hominis, em mulheres com infertilidade secundária e anormalidades tubárias, estas como sequelas da doença pélvica inflamatória aguda, sugerem uma correlação entre a infecção por Mycoplasma hominis durante a gravidez e complicações do parto podendo causar posteriormente infertilidade tubária (68, 3). Uma vez que o mesmo pode ser isolado de gestantes em taxas que variam de 5.3 a 48.8%, a relação entre colonização e as alterações materno-fetais deve ser considerada (115).

Embora muitas vezes ainda ignorada, sua habilidade de tornar-se invasivo, passando de um simples colonizador à patógeno em potencial, tem levado pesquisadores a aprimorar técnicas de monitoramento da presença de Mycoplasma hominis e de outros micoplasmas genitais.

Ureaplasma urealyticum

Descoberto por Shepard em 1950, Ureaplasma urealyticum tem como habitat primário, primordialmente a superfície da membrana mucosa do trato geniturinário (91).

As altas taxas de colonização (40 a 70%) no trato genital inferior de mulheres sexualmente ativas sem qualquer sintomatologia de doença tem dificultado o estabelecimento de relação entre sua presença e a sua participação em patologias (30). Estas taxas podem variar com a idade, número de parceiros sexuais, uso de preservativos, e vários outros fatores, tais como, étnicos, sócio-econômicos e de risco.

A participação do Ureaplasma urealyticum na etiologia de uretrites não gonocócicas e prostatites crônicas com interferência direta na espermatogênese e portanto induzindo uma possível infertilidade masculina têm sido relatada (135, 9, 14, 127, 17).

Na mulher, em alguns casos de esterilidade por problemas tubários, Ureaplasma urealyticum e Mycoplasma hominis tem sido isolados com uma frequência em torno isolados com uma freqüência que no grupo controle (28%). A correlação entre os achados laparoscópicos e as culturas positivas para micoplasmas sugere serem esses microorganismos a causa da esterilidade (3).

Implicado em uma série de alterações gestacionais e infecções neonatais, devido a sua alta prevalência em mulheres grávidas, tem sido estudadas a relação entre colonização, parto prematuro (menos que trinta e sete semanas de gestação), perda fetal, ruptura prematura de membranas fetais, nascidos com baixo peso (menos que 2.500 gramas). (92, 27, 100, 101, 31). Embora estudos revelem que a transmissão vertical do Ureaplasma urealyticum não está correlacionado com o tipo de parto, se vaginalmente ou cesariana, e tampouco com o tempo de ruptura de membranas, vários autores ratificam a existencia de correlação. (126, 108, 106, 139).

A presença de Ureaplasma urealyticum em gestantes e as possíveis consequências dessa colonização tiveram como suporte o trabalho de Kundsinn e Driscoll de 1967, as quais, pela primeira vez estabeleceram uma correlação entre as chamadas "falhas da reprodução humana" e o isolamento de Ureaplasma urealyticum de vários tecidos de uma parturiente que abortara no segundo trimestre de gestação. (53).

Estudos subsequentes têm se referido à participação do Ureaplasma urealyticum nas várias alterações peri-gestacionais; embora não tenha sido definido etiológicamente, sua associação à pneumonia neonatal congênita não deixa dúvidas (20). Seu isolamento de pulmões fetais na ausência de outros determinantes causais, acrescido da detecção simultânea de anticorpos séricos para Ureaplasma urealyticum, tem contribuído

para definir seu papel na patologia (19, 85, 84, 15). Trabalhos experimentais com ratos recém-nascidos, tem revelado que a inoculação de cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas de pulmões de crianças recém-nascidas com problemas respiratórios, produziram nesses animais, um quadro de pneumonia intersticial aguda e auto-limitante (102). Estudos prospectivos e comparativos tem também demonstrado que crianças prematuras e com baixo peso (inferior a 1000 gramas), das quais Ureaplasma urealyticum foi isolado do aspirado endotraqueal nas primeiras 24 horas de vida, desenvolveram doença pulmonar crônica ou vieram a morrer, o mesmo não tendo sido observado em crianças não infectadas e nas mesmas condições de prematuridade (20).

Embora a patogênese da displasia bronco pulmonar (BPD) não tenha sido completamente definida, muitos fatores, entre eles a pneumonia, podem aumentar o risco desta doença crônica pulmonar (18, 114, 132). Diversos autores têm comprovado experimentalmente que o isolamento de Ureaplasma urealyticum da traquéia de recém-nascidos com baixo peso nas primeiras 24 horas está associada com o aumento na incidência de BPD, morte ou ambos; este quadro é agravado por hiperoxia, suplementação extra de O₂, nos pacientes infectados. (45, 107, 133, 106, 26).

Uma série de evidências sugerem uma associação entre infecção subclínica intra amniótica e parto prematuro. A invasão microbiana da cavidade amniótica ocorre em aproximadamente um terço de pacientes. Esta invasão microbiana é também um fator de

risco em caso de endometrite na mulher, onde Ureaplasma urealyticum é um dos microrganismos mais frequentemente isolados.(100, 101).

Embora dúvidas ainda persistam sobre a verdadeira representatividade do Ureaplasma urealyticum em várias patologias, tendo em conta seu isolamento frequente em pacientes assintomáticos, talvez estas possam ser dirimidas ao se considerar sua significativa heterogeneidade antigênica intra-espécie. Apesar de algumas vezes inconsistentes, alguns resultados nos conduzem à uma possível correlação entre a patogenicidade do Ureaplasma urealyticum com determinados sorotipos(83, 88, 98).

A colonização materna pelos seus vários sorotipos e as consequências de sua transmissão para o feto tem sido abordadas.

A sorovariedade intra-espécie do Ureaplasma urealyticum compreende 14 diferentes sorotipos divididos em dois grupos genéticos, A e B, baseados na homologia DNA-DNA, nos perfis resultantes da digestão dos DNAs por ação de endonucleases de restrição, pelos perfis protéicos resultantes das eletroforeses em gel de poliacrilamida uni e bidimensionais e análise por "Polymerase Chain Reaction" (PCR). O grupo A compreende os sorotipos II, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, e XII e o grupo B compreende os sorotipos I, III, VI e XIV, sendo que o sorotipo XIII não está incluído em nenhum dos dois grupos (5, 47, 71)

A necessidade de se realizar a sorotipagem das cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas dos vários materiais clínicos é cada vez mais contundente porquanto não se consegue definir a participação deste microrganismo em vários processos patológicos.

Recentemente, sucessivos isolamentos de Ureaplasma urealyticum do líquido céfalo raquidiano de recém-nascidos têm demonstrado ser este, uma das causas mais comuns de infecções do Sistema Nervoso Central (SNC). A sorotipagem das cepas isoladas utilizando-se reagentes sorotipo-específicos, incluindo anticorpos monoclonais, revelou que 70% das cepas isoladas dos LCR pertencia aos sorotipos I, III, VI, VIII ou X; as hemoculturas correspondentes realizadas concomitantemente foram positivas para Ureaplasma urealyticum em 3 casos, uma das cepas pertencia ao sorotipo III e as outras duas não puderam ser tipadas pela metodologia utilizada pelos autores. Tem sido observado, ainda, diferença na capacidade invasiva entre cepas do mesmo sorotipo, sendo interpretado como resultante da variação na expressão antigênica de cada cepa aliada a fatores específicos de cada hospedeiro (138).

Outro trabalho () revelou que de um total de 266 cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas da vagina, cérvix, endométrio e urina de 45 mulheres inférteis (121 cepas), e de 54 mulheres férteis (145 cepas), houve uma predominância dos sorotipos III,

IV e VI. No grupo infértil o sorotipo III foi o mais frequente sendo o sorotipo VI o mais predominante no grupo fértil. Tendo empregado para o painel de sorotipos de I a VIII o autor sugere que a utilização de um esquema de sorotipagem mais amplo seja utilizado (25).

A primeira evidência da associação entre aborto espontâneo e Ureaplasma urealyticum surgiu dos estudos realizados por Janete Robertson, que ao sorotipar várias cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas de tecidos provenientes do produto de abortos espontâneos, encontrou uma maior incidência do sorotipo VI (96). Alguns anos mais tarde o mesmo grupo em um segundo estudo semelhante, detectou taxas significativas de Ureaplasma urealyticum e destes a maioria (84.6%) pertencia ao grupo genotípico B, com uma maior predominância do sorotipo III. Baseando-se nas comparações com amostras clínicas provenientes de casos de abortos terapêuticos, utilizados como controle, os autores concluíram ser esta a primeira associação direta entre aborto espontâneo e Ureaplasma urealyticum (95).

Naessens, comparando a frequência dos sorotipos de I a X das cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas do material cervical de gestantes normais e com histórico de complicações gestacionais, observou ser o sorotipo IV o mais frequente no grupo de risco(73).

Além da variedade antigênica, alguns autores tentam associar a patogenicidade do Ureaplasma urealyticum com o chamado gradiente biológico que relaciona o número de microrganismos presentes e o efeito causado. Nesse particular, os critérios utilizados pra analisar a significancia entre o achado, sua concetração e o seu verdadeiro papel no quadro clínico, podem variar sobretudo de acordo com a amostra clínica. Assim, a avaliação quantitativa situa-se entre níveis mínimos de concentração compreendidos entre 10^3 UAC/ml e 10^4 UAC/ml. Alguns autores consideram como concentrações limítrofes de significância tanto para Ureaplasma urealyticum como para Mycoplasma hominis, em secreções vaginais concentrações $>/ 10^3$ UAC/ml; em casos de material endocervical, e as concentrações a serem consideradas seriam $>/ 10^4$ UAC/ml e $>/10^3$ UAC/ml quando a amostra clínica utilizada fôr o primeiro jato de urina. Em caso de detecção de Ureaplasma urealyticum em esperma, a significância fica ao redor de concentrações $>/ 10^3$ UAC/ml.(8, 22, 56, 115, 13, 24).

Apesar desses valores, em termos de patogenicidade, ainda não terem sido bem definidos torna-se necessário que se determine as concentrações micoplásmicas, sobretudo em se tratando de amostras clínicas provenientes de sítios anatômicos onde estes estão presentes como colonizadores.

1.3 Possíveis mecanismos de patogenicidade.

Desde há muito, aos micoplasmas de um modo geral, tem sido atribuídas uma série de alterações em células eucarióticas com maior ou menor poder deletério (66, 103). O conhecimento de tais interações poderá ser de relevância para elucidar alguns dos mecanismos pelos quais os micoplasmas causam doenças.

Espécies distintas de micoplasmas, podem induzir, em uma determinada célula, alterações diferentes, enquanto que uma mesma espécie de micoplasma pode causar efeitos diversos sobre um mesmo tipo de célula pertencente a espécies diferentes de hospedeiro. Aberrações cromossômicas, inibição e estimulação mitóticas e vários outros efeitos citopáticos têm sido observados (4, 23, 39, 75, 76, 79).

Micoplasmas infectam portanto muitos tipos de células, em decorrência de sua aderência à membrana plasmática, permanecendo localizados extracelularmente em estreita associação com a membrana da célula hospedeira. A influência sobre as células pode se dar de várias maneiras, sendo um dos efeitos mais contundentes, a estimulação da transformação blástica de linfócitos em cultura de células. A ativação linfocítica pode ocorrer em células B e/ou T de diferentes espécies de animais; a característica policlonal da ativação pode levar a possíveis consequências imunopatológicas (124).

Inúmeros são os trabalhos encontrados na literatura

envolvendo várias espécies de micoplasmas em alterações cariológicas. Porém, muito pouco se sabe sobre os efeitos causados pelo Ureaplasma urealyticum em tais casos. (1).

Em 1971, Kundsín atribuiu ,pela primeira vez, ao Ureaplasma urealyticum a responsabilidade por uma série de alterações cromossômicas. Estudando os efeitos causados por duas diferentes cepas de Ureaplasma urealyticum (cepa T-Boston, isolada de membranas placentárias de um caso de aborto e cepa Spitzer, isolada do cérvici de uma paciente com infertilidade primária), sobre linfócitos em cultura de sangue periférico, observou que em um primeiro experimento houve uma diferença significativa entre o número total de aberrações cromossômicas observadas na cultura de linfócitos inoculada com a cepa T Boston e seu respectivo controle, diferença esta detectada também com a cepa Spitzer e seu controle. Observados diferentes números e tipos de alterações cromossômicas para cada isolado, os autores sugeriram haver diversidade no modo de ação entre as várias cepas de Ureaplasma urealyticum (52).

Quanto aos mecanismos envolvidos nessas e em várias outras alterações causadas pelos micoplasmas, sómente em parte são conhecidos. Com raras exceções as doenças causadas por êsses microrganismos são crônicas e de origem multifatorial, dependendo muitas vezes das condições ambientais, da predisposição genética do hospedeiro e sem dúvida da natureza da espécie envolvida.

1.3.1 Adesinas; Receptores e Liberação de Substâncias Específicas

Ainda dentre as considerações que devem ser feitas, a fim de uma melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade dos micoplasmas podemos ressaltar:

- a afinidade do microrganismo pela célula alvo (aderência);
- a natureza dos componentes da membrana responsável pela sua aderência à célula do hospedeiro e
- a capacidade dos micoplasmas de produzir e liberar substâncias específicas, tais como enzimas, toxinas ou inibidores metabólicos exercendo desta forma seu efeito patogênico (90).

- Aderência à superfície celular

Raramente os micoplasmas invadem a corrente sanguínea e os tecidos. Aderem e colonizam as células epiteliais dos tratos respiratório e geniturinário do homem e de animais infectados, podendo ser considerados como "parasitas" de superfície. A aderência dos micoplasmas é firme o bastante para evitar sua eliminação pelo epitélio ciliado ou pela urina. Além disso, a íntima associação dos micoplasmas com a superfície da célula hospedeira é extremamente vantajosa nutricionalmente para o

microorganismo, o qual irá desfrutar das altas concentrações de nutrientes absorvidos pela membrana da célula hospedeira como aminoácidos cofatores, além de ácidos graxos e colesterol "in vitro". Micoplasmas podem aderir a eritrócitos, células HeLa, espermatozóides, macrófagos, fibroblastos, células do epitélio traqueal, cultura de explantes traqueais e superfícies inertes como o vidro e o plástico. Os receptores envolvidos nas ligações com superfícies inertes seriam possivelmente diferentes daqueles envolvidos com a aderência a células. Os termos "sítio receptor" é utilizado para denominar os sítios da superfície das células hospedeiras que participam da aderência, enquanto o termo "sítio de ligação" ou adesinas, refere-se aos sítios específicos da membrana da célula micoplásmica responsável pela sua aderência (104, 50, 90).

- Natureza dos "sítios receptores" e dos "sítios de ligação" ou adesinas. Dentre os receptores da célula hospedeira envolvidos com as adesinas dos micoplasmas humanos citam-se:

-Resíduos de ácido siálico de glicoconjugados da membrana do hospedeiro funcionando como receptor específico para Mycoplasma pneumoniae e Mycoplasma genitalium.

-Sulfoglicolípides, tais como sulfogalactoglicolípides (SGG) e sulfogalactosil ceramide (SGC) presentes em células do endométrio e células espermáticas humanas representam os

receptores de Ureaplasma urealyticum e Mycoplasma hominis nesses tecidos (57, 90).

Quanto aos "sítios de ligação" ou adesinas dos micoplasmas humanos são relevantes as proteínas de membrana do Mycoplasma pneumoniae e Mycoplasma genitalium, sendo as proteínas P_1 do Mycoplasma pneumoniae (PM 170 kDa) e P_1 do Mycoplasma genitalium (PM 140 kDa), ambos de alto peso molecular, de maior importância na capacidade de aderência. A natureza das adesinas de Mycoplasma hominis ainda não está definida porém há hipótese de que sejam proteínas de membrana, por apresentarem sensibilidade a atividade proteolítica enzimática, ao calor e a ação da formalina (89).

Quanto às adesinas do Ureaplasma urealyticum muito pouco se conhece.

Produção e liberação de substâncias específicas:

Produtos finais do metabolismo celular micoplásmico como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido por Mycoplasma pneumoniae e Mycoplasma genitalium, tem sido considerado um dos principais fatores de patogenicidade. O dano celular neste caso só se processará quando a catalase ou peroxidase, produzida pela célula hospedeira for inibida; isto ocorre porque tanto Mycoplasma pneumoniae quanto Mycoplasma genitalium eliminam radicais superóxido (O_2) inibidores da catalase. Amônia é outro produto final do metabolismo de algumas espécies de micoplasmas

que pode representar, quando produzida em grandes quantidades, um fator de patogenicidade. A hidrólise da uréia proveniente do metabolismo dos ureaplasmas, e a hidrólise da arginina decorrente do metabolismo de algumas espécies de micoplasmas que utilizam a via arginina dihidrolase, (como Mycoplasma hominis e Mycoplasma fermentans em seu metabolismo alternativo), liberam amônia como produto final. A natureza dos fatores tóxicos presentes nas células e membranas do Mycoplasma fermentans não é bem conhecida, embora seus efeitos se assemelhem aos das endotoxinas de natureza lipopolissacárida de bactérias Gram negativas. (37)

1.3.2 Ação enzimática.

A possibilidade da patogenicidade dos micoplasmas estar ligada a enzimas por eles sintetizadas tem, cada vez mais, encontrado suporte experimental.

Uma série de trabalhos têm demonstrado que os micoplasmas contém atividade de peptidase. Aminopeptidases têm sido demonstradas em Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae e Mycoplasma fermentans (37). Proteases específicas para IgA tem sido observadas em cepas de Ureaplasma urealyticum e são espécie-específicas; desta maneira a ação de IgA secretora a nível de mucosa poderia ser bloqueada por proteases produzidas por Ureaplasma urealyticum. (97)

Um dos pontos bastante cruciais da patogenia dos micoplasmas humanos, sem dúvida se refere às implicações à nível da concepção. Grande parte das infecções intrauterinas estão associadas a gestações que resultaram em partos prematuros. Embora a compreensão dos mecanismos pelos quais o parto prematuro acontece seja limitada, a ação das prostaglandinas é sem dúvida parte importante do processo que envolve o parto.

Dentre as várias hipóteses que tentam associar a infecção placentária e coriamnionite, com o aumento de risco de partos prematuros e nascimento de natimortos, uma é a de que as fosfolipases produzidas pelos microrganismos poderiam afetar a biossíntese de prostaglandinas as quais diretamente induziriam ao parto prematuro. A ativação dessas fosfolipases poderiam hidrolisar os fosfolípidos da placenta e membranas, produzindo ácido araquidônico livre o qual estimularia uma variedade de vias biossintéticas levando à prematuridade ou à ocorrência de natimortos (99).

Recentemente tem sido demonstrada a atividade da Fosfolipase A e C endógena em cepas de Ureaplasma urealyticum. Este achado permite concluir que as fosfolipases do Ureaplasma urealyticum podem atuar como fator de virulência, quando este infecta membranas fetais, placenta e tecidos pulmonares do neonato (119).

Possivelmente vários outros fatores devem estar envolvidos nos processos de patogênese dos micoplasmas, porém muitos ainda hoje não têm elucidados seus modos de ação.

2. OBJETIVO

As interações célula-micoplasma, suas conseqüentes implicações clínicas e sua discutida patogenicidade foram o suporte que nos motivou desenvolver um modelo "in vitro" que permitisse de algum modo demonstrar os possíveis efeitos de várias espécies de micoplasmas sobre cromossomos humanos, obtidos de culturas temporárias de linfócitos.

As cepas empregadas no presente estudo compreenderam 11 sorotipos da espécie Ureaplasma urealyticum, com a finalidade de se demonstrar o perfil comportamental dos vários sorotipos nas condições estudadas, conforme sua diversidade antigênica. Cepas de Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans e Mycoplasma pneumoniae fizeram parte do nosso estudo, a fim de ensaiar todos os microrganismos encontrados mais frequentemente no trato geniturinário e que também têm seu potencial patogênico já delineado.

Para tanto realizamos as seguintes etapas:

1. Padronização das condições ótimas das culturas temporárias de linfócitos submetidos a estimulação, na presença de onze diferentes sorotipos de Ureaplasma urealyticum, duas

cepas de Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans e Mycoplasma pneumoniae.

2. Estudo da influência desses micoplasmas sobre a mitose linfocitária e a avaliação dos resultados em relação aos respectivos controles.

3. Estudo do efeito de diferentes concentrações de micoplasmas no modelo experimental aqui proposto.

4. Detecção dos tipos de alterações observadas em mitoses obtidas na presença de micoplasmas e seus respectivos controles.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia consistiu na realização de cultivo de linfócitos em presença de diferentes espécies e sorotipos de micoplasmas e de alguns de seus sobrenadantes, a fim de se observar possíveis efeitos clastogênicos à nível cromossomal.

3.1 Cepas de micoplasmas empregados no presente estudo:

As cepas da espécie Ureaplasma urealyticum, ATCC (American Type Culture Collection), compreendendo 11 sorotipos, foram cedidas pela Difco (Detroit). Estudou-se os efeitos destes sorotipos e de 4 de seus sobrenadantes provenientes dos respectivos caldos de cultivo. Os sorotipos analisados foram:

- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27813 sorotipo I
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27814 sorotipo II
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27815 sorotipo III
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27817 sorotipo V
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27818 sorotipo VI
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27819 sorotipo VII
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 27618 sorotipo VIII
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 33175 sorotipo IX
- Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 33699 sorotipo X

-Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 33695 sorotipo XI

-Ureaplasma urealyticum cepa ATCC 33696 sorotipo XII

Os sobrenadantes testados foram os referentes às cepas Ureaplasma urealyticum ATCC 27815 sorotipo III, Ureaplasma urealyticum ATCC 27819 sorotipo VII, Ureaplasma urealyticum ATCC 27814 sorotipo II e Ureaplasma urealyticum ATCC 33699 sorotipo X.

Dentre as espécies do gênero Mycoplasma, foram estudados: Mycoplasma hominis cepas ATCC 15056 e Mycoplasma hominis ATCC 23114; Mycoplasma fermentans cepa ATCC 19689 e Mycoplasma pneumoniae ATCC 15492.

3.2 Meios de cultura utilizados no cultivo dos micoplasmas

Os meios utilizados para cultivo, repique, manutenção e titulação das cepas de micoplasmas, com suas respectivas formulações são descritas a seguir:

Meio líquido utilizado para o cultivo de cepas de Ureaplasma urealyticum (U₁₀ mod.).

Meio líquido (U₁₀ mod) - A elaboração deste meio

baseou-se no meio líquido (U_{10} mod.) (117); ficando sua composição para 100 ml a que se segue:

Caldo PPLO(difco)	1,47 g
-------------------	--------

Agua deionizada e bidestilada	70 ml
-------------------------------	-------

- O pH do meio foi ajustado para 5,5 com solução de HCl 2N.

Após a autoclavagem a 121° C por 20 minutos, foram adicionados esterilmente, os seguintes componentes:

Soro estéril e normal de cavalo	20 ml
---------------------------------	-------

Extrato de levedura a 25%	10 ml
---------------------------	-------

Cloridrato de L-cisteína(sol. a 2%)	0,5 ml
-------------------------------------	--------

Solução de uréia à 10%	0,5 ml
------------------------	--------

Suplemento VX(*) (Difco)	0,5 ml
--------------------------	--------

GHL tripeptideo (Sigma)	0,1 ml
-------------------------	--------

Solução de Vermelho de fenol a 1%	0,1 ml
-----------------------------------	--------

Penicilina G potássica	1.000 U.I. ml
------------------------	---------------

- O pH final do meio foi ajustado para 6,0 com solução de HCl 2N.

(*)A composição original do meio utiliza o suplemento CVA (vitaminas, cofatores, e amino-ácidos) da GIBCO Diagnostics; contudo o mesmo foi por nós substituído pelo suplemento VX da Difco (número do catálogo 3354-54-1).

As cepas foram inoculadas em 20 ml de meio líquido U_{10mod} e incubadas a 37° C em microaerofilia (jarra com vela) por 18-24 horas tendo sido realizados repiques volume/volume subsequentes até 500 ml de volume final a cada 18-24 horas. O

cultivo em meio líquido foi acompanhado de semeadura em meio sólido A₇, o qual será descrito oportunamente, para observação colonial.

Meio líquido utilizado para cultivo das cepas de Mycoplasma hominis ATCC 15056 e ATCC 23114.

Meio líquido de Arginina (MLA). Este meio foi elaborado conforme recomendações do LDMI (87) tendo-se suprimido da formulação original a polimixina, a anfotericina B e a eritromicina e substituindo-se novamente o suplemento CVA pelo suplemento VX, ficando a sua composição como se segue:

Caldo PPLO	1,47 g
Água deionizada e bidestilada	70 ml
-O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.	

Adicionou-se posteriormente de maneira estéril:

Soro estéril e normal de cavalo	20 ml
Extrato de levedura à 25%	10 ml
Cloridrato de L-arginina(sol.à 30%)	0,66 ml
Suplemento VX	0,5 ml
Solução vermelho de fenol à 2%	0,1 ml
Penicilina G potássica	1000 U.I. ml

O pH do meio foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução de NaOH 1 N.

As cepas de Mycoplasma hominis foram semeadas e incubadas em microaerofilia a 37 °C por 24-48 horas. A seguir os repiques foram realizados volume/volume até serem completados

500 ml de cultura. Os repiques em meio líquido foram acompanhados de sementeiras em meio sólido A₇ e incubados nas condições acima descritas.

Meio líquido utilizado para o cultivo de Mycoplasma fermentans ATCC 19619

Meio líquido de Glicose (MLG) - Este meio baseou-se no meio originalmente padronizado por Aluotto (2) e sua composição modificada(*) é a seguinte:

Caldo de cérebro e coração	3,26 g
Água deionizada e bidestilada	88 ml

O meio foi autoclavado a 121⁰ C por 15 minutos.

Adicionou-se posteriormente de maneira estéril:

Fração de soro PPLO (Difco)	1,5 ml
Glicose solução estéril à 10%	10 ml
Vermelho de fenol solução à 1%	0,5 ml

- O pH do meio foi ajustado para 7,6 com o auxílio de solução de NaOH 1N.

(*) Foram suprimidos da formulação original o extrato de levedura e o soro de cavalo, que foi substituído pela fração do soro.

A cepa foi incubada em anaerobiose, em jarras Gaspak utilizando como sistema gerador Anaerobac por 24 a 48 horas.

Repiques subsequentes foram realizados volume/volume, até que se obtivesse 500 ml de cultura. O cultivo em meio líquido foi acompanhado do cultivo em meio sólido A₇ também em

anaerobiose.

Meio líquido utilizado para o cultivo do Mycoplasma pneumoniae ATCC 15492

A cepa de Mycoplasma pneumoniae foi semeada em 20 ml de meio líquido SP-4, com incubação em aerobiose por 48-72 horas. Repiques simultâneos volume/volume foram realizados a fim de que se obtivesse 500 ml de caldo de cultura.

Meio líquido SP-4 (modificado) (129)

A formulação deste meio para 100 ml é a que segue:

Caldo PPLO (Difco)	0,35 g
Triptona(Difco)	1,0 g
Bacto-peptona(Difco)	0,53 g
Vermelho de fenol a 1% (Difco)	0,40 ml
Água destilada e deionizada	61,6 ml

Dissolvidos os ingredientes, ajusta-se o pH para 7,5 com NaOH 1 N. Autoclavar a 121⁰ C por 15 minutos.

A seguir adicionar de maneira estéril:

Meio Fischer com Glutamina (HF 5008, Sigma)	sem
bicarbonato de sódio(*)	5,0 ml
Extrato de levedura a 25%	3,5 ml
Levedura dessecada (Difco) a 2%	10,0 ml
Soro fetal bovino(**)	17,0 ml
Penicilina G potássica	1.000 U.I. ml
Dextrose a 50% (Difco)	2,0 ml

(*)Dentre as modificações realizadas na formulação do meio SP-4 original, destacam-se a substituição do CMRL 1066 (Gibco) pelo meio de Fisher. A hidratação deste meio foi feita com 100 ml de água deionizada; uma vez hidratado acrescentou-se 1,125g de bicarbonato de sódio ajustando-se o pH para 7,5. Este meio foi estocado em geladeira em frasco ambar ao abrigo da luz.

(**)O soro fetal bovino foi inativado a 56⁰ C durante 30 minutos.

A supressão do acetato de tálio 10% (sigma) foi feita uma vez que, o emprego dessa substância tem como finalidade inibir prováveis contaminantes presentes nos materiais clínicos; em nosso caso por estarmos trabalhando com cepas puras ATCC, seria desnecessário incorporá-lo ao meio.

Os repiques em caldo foram acompanhados de semeadura em meio sólido SP-4.

A seguir seguem-se as formulações dos meios sólidos A₇ e SP-4.

Meio solido A₇ (mod.) (116) - Utilizado para cultivo e observação colonial das cepas estudadas de Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans.

Caldo PPLO	2,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0150 g
Água deionizada e bidestilada	63 ml

- O pH foi ajustado entre 5,5 e 6,0 utilizando-se solução de HCl 2N.

A seguir adicionou-se:

Agar Noble	0,9 g
------------	-------

O meio foi autoclavado a 121⁰ C por 15 minutos e esterilmente foram adicionados:

Soro estéril e normal de cavalo	20 ml
Extrato de levedura à 25%	10 ml
Solução de uréia à 10%	1 ml
Solução de glicose à 10%	5 ml
Suplemento VX(*)	0,5 ml
Penicilina G potássica	1000 U.I. ml

(*) Foi adicionado à formulação original o suplemento VX.

Meio sólido SP-4 para cultivo de Mycoplasma pneumoniae

O meio solido foi preparado adicionando-se 0,85g de Agar Noble(Difco) à formulação descrita para o meio líquido SP-4.

3.3 Técnicas empregadas para a determinação das concentrações e viabilidade de micoplasmas utilizados no ensaio

O inóculo foi empregado nas seguintes concentrações: 10^3 UAC/ml, 10^4 UAC/ml, 10^5 UAC/ml e concentrações maiores que 10^5 UAC/ml e as metodologias empregadas para a titulação estão descritas a seguir:

3.3.1 Microtitulação (40)

Em placas plásticas de poliestireno de microtitulação (Microplaca de fundo chato para cultura de células marca PETECIL) foram adicionados 225 microlitros de

diferentes caldos para o cultivo dos micoplasmas em estudo: (U₁₀ mod) para a titulação das cepas de Ureaplasma urealyticum; MLA para a titulação das cepas de Mycoplasma hominis; MLG para a titulação da cepa de Mycoplasma fermentans e SP-4 líquido para a titulação da cepa do Mycoplasma pneumoniae nos poços de números 2 a 12. No primeiro poço foram colocados 250 microlitros do meio líquido específico para a cepa em estudo, e foi considerado CONTROLE. No poço número 2 foram adicionados 25 microlitros do caldo da cultura a ser titulada em 225 microlitros do meio líquido de cultivo. Com auxílio de pipeta automática, realizou-se diluição seriada na razão 10. Desta maneira foram obtidas diluições crescentes da amostra, a partir de 1/10. Uma gota (25 μ l) de óleo mineral estéril foi acrescentada em cada poço a fim de proporcionar atmosfera de anaerobiose parcial quando da titulação das cepas de Ureaplasma urealyticum, e de Mycoplasma fermentans. Para a titulação das cepas Mycoplasma hominis ATCC 23114 e Mycoplasma hominis ATCC 15056 a incubação foi feita em microaerofilia (jarra com vela); no caso de Mycoplasma pneumoniae esta foi realizada em aerobiose (86)

Foi considerado título ou concentração, o inverso da maior diluição cujo meio apresentou mudança de cor em relação aos controles. A microtécnica foi empregada por utilizar pequenos volumes da amostra a ser titulada.

A foto abaixo ilustra a metodologia empregada.

Figura 1 - Microtécnica utilizada na titulação dos inóculos das cepas de micoplasmas.

3.3.2 Macrotitulação

A titulação foi executada em tubos de hemólise em lugar de placas de microtitulação. Esta técnica possibilita uma melhor visualização do "ponto de viragem", por se estar trabalhando com volumes maiores. Foram empregados 0,9 ml do meio de cultivo e 0,1 ml da cepa de Mycoplasma pneumoniae a ser titulada.

Uma vez tituladas as cepas, estas foram utilizadas como inóculos nos testes com as culturas temporárias de linfócitos humanos.

3.3.3 Teste de viabilidade das cepas

Padronizados os inóculos, estes foram acrescentados à cultura de linfócitos permanecendo em incubação conjunta por 72 horas. Findo esse período, com a finalidade de se verificar a viabilidade das cepas, e imediatamente antes da adição de colchicina ao sistema, volumes de 0,1 ml foram semeados em meio sólido e em meio líquido (correspondentes à espécie em estudo) sendo posteriormente incubados nas condições respectivas.

A constatação da viabilidade, foi feita pela observação da multiplicação em meio líquido (mudança de cor do meio) e meio sólido (observação microscópica das placas).

As fotos que seguem ilustram o teste em meio sólido.

Figura 2 - Cultura de linfócitos inoculadas com cepa de Mycoplasma hominis ATCC 23114 após 72 horas de cultivo conjunto em meio sólido A₇.

Figura 3 - Cultura de linfócitos inoculada com cepa Ureaplasma urealyticum sorotipo X, após 72 horas de cultivo conjunto em meio sólido A₇.

3.4 Cultura de Linfócitos

Foi realizada a partir de culturas de linfócitos de indivíduo do sexo feminino, 42 anos, em boas condições de saúde, não exposto recentemente a drogas, tampouco a radiações e sem histórico atual de infecção bacteriana ou viral. Com a finalidade de se padronizar o experimento, foi utilizada uma só doadora durante todo o experimento.

As culturas de linfócitos de sangue periférico foram realizadas seguindo técnica modificada da Moorhead e col. (70).

Foram colhidos, através de punção venosa, 20 ml de sangue com auxílio de seringa estéril heparinizada; para tanto foi utilizada a heparina sódica da Roche (Liquemine); foram feitas trocas de agulha após a heparinização e novamente após a colheita do sangue.

A seringa foi mantida em posição vertical, em fluxo laminar, por 2 a 3 horas para que houvesse a sedimentação das hemácias. O sobrenadante foi transferido para frasco estéril, homogeneizado, e cerca de 0,5 ml foram distribuídos em frascos com 4 ml de meio de cultura. A partir desse material foram feitas ainda contagens globais de leucócitos a fim de se quantificar aproximadamente o número de linfócitos utilizados em cada frasco de cultivo.

O meio de cultura consistiu de 90 ml do meio 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1,6 ml de fitohemaglutinina (Cultilab).

Em alguns ensaios foi empregada a fitohemaglutinina P (Bacto Phytohemagglutinin-P número 3110 Difco). Neste caso o volume utilizado foi de 125 ul/100 ml.

Foram feitas duplicatas das amostras acompanhadas de um frasco controle. Os frascos amostra consistiam de 4 ml de meio 199 suplementado, acrescidos de 0,5 ml de sobrenadante homogeneizado do sangue heparinizado como descrito acima e 1 ml de cada uma das concentrações de micoplasma a saber: 10^3 UAC/ml, 10^4 UAC/ml, 10^5 UAC/ml e concentrações maiores do que 10^5 UAC/ml.

Os frascos controle tiveram suprimidos os inóculos contendo as culturas de micoplasmas.

Todas as culturas foram incubadas por 72 horas em aerobiose em estufa a $36,5^0$ C e incluíam portanto para cada concentração 3 frascos: duplicatas das amostras e mais um controle.

Ao fim das 72 horas, foram acrescentados 0,1 ml de colchicina, na concentração de 4×10^{-5} M, por frasco que tem como finalidade deixar os linfócitos em metáfase. Estes foram

incubados por mais uma hora antes de se tirar as culturas.

Foram realizados testes de viabilidade dos linfócitos utilizando-se a coloração Azul de Tripan 1% em solução fisiológica.

A seguir, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de centrifuga e submetidos à centrifugação de 300 g durante 5 minutos.

Após a retirada do sobrenadante, foram acrescentados lentamente 4 ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M, previamente aquecida a 37⁰ C. Esta tem como finalidade romper as células, expondo melhor os cromossomos a serem analisados. Os frascos foram deixados em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente.

Imediatamente foram acrescentados, em cada frasco com auxílio de pipeta Pasteur algumas gotas de fixador (constituído de metanol/ácido acético na proporção de 3:1), com homogenização constante, adicionando-se a seguir mais 4 ml do fixador.

A seguir os tubos foram centrifugados a 300 g por 5 minutos. Findo este tempo, retiraram-se os sobrenadantes e mais 4 ml de fixador foram acrescentado repetindo-se a operação por mais 2 vezes. Retirados os sobrenadantes, foram acrescentados

à cada tubo, algumas gotas de fixador novo. Este sedimento foi transferido para lâminas previamente lavadas e mantidas a 4⁰ C imersas em água destilada .

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foram gotejados de uma altura aproximada de 50 cm, 3 a 4 gotas do material sobre as lâminas geladas colocadas sobre a boca de um frasco de diâmetro adequado, contendo água a 60⁰C e imerso em banho maria à mesma temperatura.

A diferença térmica entre o banho maria à 60⁰ C e a lâmina gelada possibilita a fixação do material. As lâminas assim preparadas foram deixadas à temperatura ambiente *overnight* para serem posteriormente identificadas e coradas. A técnica de coloração constituiu-se de deposição sobre as mesmas, de um filme de solução tampão fosfato pH=6,8 ao qual se acrescentou 4 a 5 gotas de corante de Giemsa, deixando-se por 5 minutos. Decorrido esse tempo as lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente.

O exame cromossômico foi realizado em microscópio óptico (marca Zeiss) com aumento de 1000 vezes. As lâminas foram analisadas em teste cego e na íntegra.

Mitoses mais representativas foram fotografadas utilizando-se filme High Contrast e revelador D19.

Para as cópias foi utilizado o papel fotográfico F-3 e

o revelador Dektol todos da marca Kodak.

3.5 Critérios de Análise

3.5.1 Efeitos dos micoplasmas no índice mitótico.

Para tal avaliação, calculou-se os índices mitóticos provenientes das culturas-controle, e das culturas-teste nas três concentrações: 10^3 UAC /ml, 10^4 UAC/ml e 10^5 UAC/ml. No cálculo do índice mitótico considerou-se em teste cego, a porcentagem de metáfases encontradas em 1.000 núcleos de cada uma das culturas. Foram computadas somente núcleos em metáfase em relação àqueles em outras fases do ciclo celular.

3.5.2 Análise cariotípica

As metáfases foram analisadas ao microscópio óptico e classificados quanto à presença de aberrações estruturais (111, 130). Foram contadas as células estimuladas (núcleos) e as mitoses mais representativas de aberrações estruturais foram desenhadas e posteriormente fotografadas.

As anomalias cromossômicas estruturais consideradas foram as seguintes:

GAPS (falhas) - O gap representa uma pequena descontinuidade da cromatina (região acromática) ao longo do

cromossomo, sem haver contudo, deslocamento das frações. Os gaps ou falhas podem ser cromatídicos ou cromossômicos quando atingem respectivamente uma ou ambas as cromátides em um mesmo ponto.

QUEBRAS - Foi considerado quebra, uma descontinuidade cromossômica com deslocamento da parte distal da cromátide e/ou uma descontinuidade maior que a largura de uma cromátide, sem haver deslocamento do fragmento. Essas quebras também podem ser classificadas em cromatídicas ou cromossômicas, se afetam uma ou ambas as cromátides na mesma região, respectivamente. Foram também consideradas como quebras cromatídicas os fragmentos simples não emparelhados, como quebras cromossômicas os fragmentos acêntricos e as deficiências cromossômicas.

REARRANJOS - São figuras em cuja origem participam dois ou mais cromossomos que realizam trocas entre as cromátides. Os rearranjos são considerados cromatídicos se forem provenientes de alterações em uma só cromátide, e cromossômicos se envolverem as duas cromátides.

ANEL - Resulta da interação de duas alterações dentro de um mesmo braço do cromossomo não duplicado, levando à remoção de uma região entre o centrômero e a porção final do braço cromossômico. Essas regiões terminais da porção deletada frequentemente se ligam novamente formando um anel acêntrico, enquanto as porções terminais e cêntricas do par cromossômico se

ligam novamente para dar um pequeno braço cromossômico.

DISJUNÇÃO CENTROMÉRICA PREMATURA - (PCD) - Este tipo de alteração foi primeiramente descrito por German em 1979 (112) ao se referir à Síndrome de Roberts.

Consiste em uma disjunção centromérica que pode ser total quando envolve todos os cromossomos em mitose, ou, parcial quando até três cromossomos são envolvidos.

DESCONDENSAÇÃO CENTROMÉRICA - Este tipo de alteração foi aqui denominada, para os casos em que a região do centrômero se apresentava descondensada ou acromática.

3.6 Análise estatística

Foram empregados os seguintes testes estatísticos:

- Teste de χ^2 (quiquadrado) de Pearson

Foi aplicado para determinar se os ensaios realizados com três diferentes concentrações de micoplasmas apresentavam número de células alteradas significativamente diferentes entre si, na tentativa de se observar a influência da concentração dos microrganismos sobre o processo mitótico nas condições aqui empregadas.

- Teste de significância para a diferença de duas proporções populacionais

Este teste foi aplicado em cada cepa para determinar a significância entre o número de células alteradas quando comparadas com o controle, individualmente, para cada concentração.

Os testes empregados utilizaram nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) (121).

4. RESULTADOS

Foram estudados os efeitos de cepas de micoplasmas representadas por 11 sorotipos de Ureaplasma urealyticum, 4 de seus sobrenadantes do caldo de cultivo correspondentes aos sorotipos I, III, VII, e X; duas cepas de Mycoplasma hominis ATCC 23114 e ATCC 15056, Mycoplasma fermentans ATCC 19689 e pela espécie Mycoplasma pneumoniae ATCC 15492 sobre culturas temporárias de linfócitos humanos.

4.1 Índice Mitótico

Dentre os efeitos observados, as inibições mitóticas parciais (índices mitóticos inferiores a 10) e totais, constituíram-se nos mais contundentes. Estas e outras alterações foram observadas em determinadas concentrações de algumas cepas, como podem ser observadas na Tabela I.

Tabela I. Efeitos dos micoplasmas sobre a mitose em função das concentrações dos inóculos (UAC/ml)

AMOSTRAS	INIBIÇÃO TOTAL DA MITOSE	INIBIÇÃO PARCIAL DA MITOSE	MITOSES ALTERADAS	MITOSES NORMAIS
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO I	$\frac{5}{10}$			$\frac{3}{10} \frac{4}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO II		$\frac{3}{10} \frac{4}{10} \frac{5}{10}$		
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO III		$\frac{3}{10} \frac{4}{10} \frac{5}{10}$		
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO V			$\frac{3}{10} \frac{5}{10}$	$\frac{4}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VI			$\frac{3}{10} \frac{5}{10}$	$\frac{4}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII	$\frac{3}{10} \frac{5}{10}$		$\frac{4}{10}$	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VIII			$\frac{3}{10} \frac{4}{10} \frac{5}{10} \frac{5}{>10}$	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO IX			$\frac{3}{10} \frac{4}{10} \frac{5}{10}$	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO X	$\frac{5}{10}$	$\frac{3}{10} \frac{4}{10}$		
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XI			$\frac{3}{10} \frac{4}{10} \frac{5}{10}$	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XII	$\frac{5}{10}$	$\frac{4}{10}$	$\frac{3}{10}$	
<i>M.HOMINIS</i> ATCC 15056	$\frac{4}{10} \frac{5}{10} \frac{5}{>10}$			
<i>M.HOMINIS</i> ATCC 23114	$\frac{5}{10}$	$\frac{3}{10}$		$\frac{4}{10}$
<i>M.FERMENTANS</i> ATCC 19689	$\frac{4}{10} \frac{5}{10}$	$\frac{3}{10}$		
<i>M.PNEUMONIAE</i> ATCC 15492	$\frac{5}{10}$		$\frac{3}{10} \frac{4}{10}$	
SORRENADANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO II	$\frac{S}{1} \frac{S}{2}$			
SORRENADANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO III		$\frac{S}{2}$	$\frac{S}{1}$	
SORRENADANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII	$\frac{S}{2}$		$\frac{S}{1}$	
SORRENADANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO X				$\frac{S}{1} \frac{S}{2}$

4.1.1 Graus de inibições mitóticas

Os vários graus de inibição ou alteração mitóticas de acordo com as diferentes cepas e concentrações de micoplasmas foram analisados dividindo-se em 3 grupos:

4.1.1.1 Índices mitóticos iguais a zero ou inferiores a 10:

- As concentrações de inóculo iguais ou superiores a 10^5 UAC/ml das cepas Ureaplasma urealyticum sorotipo XII; Ureaplasma urealyticum sorotipo X; Ureaplasma urealyticum sorotipo II; Ureaplasma urealyticum sorotipo VII; Ureaplasma urealyticum sorotipo I; Ureaplasma urealyticum sorotipo III; Mycoplasma hominis ATCC 15056; Mycoplasma hominis ATCC 23114; Mycoplasma fermentans ATCC 19689; Mycoplasma pneumoniae ATCC 15492 e os sobrenadantes das cepas Ureaplasma urealyticum sorotipo III; Ureaplasma urealyticum sorotipo VII e Ureaplasma urealyticum sorotipo II.

- As concentrações iguais a 10^4 UAC/ml das cepas: Mycoplasma hominis ATCC 15056; Mycoplasma fermentans; Ureaplasma urealyticum sorotipo XII; Ureaplasma urealyticum sorotipo X; Ureaplasma urealyticum sorotipo II e Ureaplasma urealyticum sorotipo III.

- As concentrações de 10^3 UAC/ml das cepas: Ureaplasma urealyticum sorotipo X; Ureaplasma urealyticum sorotipo II; Ureaplasma urealyticum sorotipo VII; Ureaplasma urealyticum sorotipo III; Mycoplasma hominis ATCC 23114 e Mycoplasma fermentans.

4.1.1.2 Mitoses Normais:

- As concentrações de 10^4 UAC/ml das cepas Ureaplasma urealyticum sorotipo V; Ureaplasma urealyticum sorotipo VI; Ureaplasma urealyticum sorotipo I e Mycoplasma hominis ATCC 23114.

- A concentração de 10^3 UAC/ml da cepa Ureaplasma urealyticum sorotipo I e o sobrenadante do caldo de cultivo da cepa Ureaplasma urealyticum sorotipo X.

De um total de 19 amostras estudadas, 13 (68,4%) demonstraram efeitos drásticos de inibição parcial ou total da mitose em pelo menos uma concentração; 10 (52,6%) apresentaram em pelo menos uma concentração, mitoses com alterações e em somente 5 amostras (26,3%) todas as mitoses observadas foram normais.

Uma melhor visualização do efeito dos micoplasmas, suas concentrações e os índices mitóticos, comparados com seus respectivos controles poderá ser feita através de histogramas. As figuras a seguir demonstram o exposto:

Ureaplasma urealyticum

Concentração 10^3 uac/ml

FIG. 4 ÍNDICES MITÓTICOS DOS 11 SOROTIPOS DE *UREAPLASMA UREALYTICUM* NA CONCENTRAÇÃO IGUAL A 10^3 UAC/ML, COMPARADOS COM OS ÍNDICES MITÓTICOS DOS RESPECTIVOS CONTROLES.

Ureaplasma urealyticum

Concentração 10^4 uac/ml

FIG.5 ÍNDICES MITÓTICOS DOS 11 SOROTIPOS DE UREAPLASMA UREALYTICUM OBSERVADOS PARA CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO IGUAIS A 10^4 UAC/ML, COMPARADOS COM OS RESPECTIVOS CONTROLES.

Ureaplasma urealyticum

Concentração 10^6 uac/ml

FIG. 6 ÍNDICES MITÓTICOS DOS 11 SOROTIPOS DE UREAPLASMA UREALYTICUM NA CONCENTRAÇÃO DE 10^5 UAC/ML, COMPARADOS COM OS RESPECTIVOS CONTROLES.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27813

FIG.7 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO I, NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27814

FIG.8 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO II NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27815

FIG. 9 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO III NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27817

FIG. 10 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO U NAS CONCENTRAÇÕES DE 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27818

FIG. 11 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO UI NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27819

FIG. 12 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO VII NAS CONCENTRAÇÕES DE 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 27618

FIG.13 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO VIII NAS CONCENTRAÇÕES
 10^3 , 10^4 , 10^5 E 10^5 UAC/ML E DE SEUS RESPECTIVOS CONTROLES

Ureaplasma urealyticum
ATCC 33175

FIG.14 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO IX NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 33699

FIG.15 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO X NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 33695

FIG.16 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO XI NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 , 10^5 UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum
ATCC 33696

FIG. 17 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO XII NAS CONCENTRAÇÕES 10³, 10⁴ E 10⁵ UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Ureaplasma urealyticum (ATCC 27814)

Concentração 10^5 uac/ml

FIG. 18 ÍNDICES MITOTICOS DO SOROTIPO II NA CONCENTRAÇÃO 10^5 UAC/ML, DE SEUS SOBRENADANTES (S_1 E S_2) E RESPECTIVOS CONTROLES (C E CS).

Ureaplasma urealyticum (ATCC 27815)

Concentração 10^5 uac/ml

FIG. 19 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO III NA CONCENTRAÇÃO 10^5 UAC/ML, DE SEUS SOBRENADANTES (S_1 E S_2) E RESPECTIVOS CONTROLES (C E CS).

Ureaplasma urealyticum (ATCC 27819)

Concentração 10^5 uac/ml

FIG. 20 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO VII NA CONCENTRAÇÃO 10^5 UAC/ML, DE SEUS SOBRENADANTES (S_1 E S_2) E RESPECTIVOS CONTROLES (C E CS).

Ureaplasma urealyticum (ATCC 33699)

Concentração 10^5 uac/ml

FIG.21 ÍNDICES MITÓTICOS DO SOROTIPO X NA CONCENTRAÇÃO 10^5 UAC/ML, DE SEUS SOBRENADANTES (S_1 E S_2) E RESPECTIVOS CONTROLES (C E CS).

Mycoplasma sp

Concentração 10^3 uac/ml

FIG. 22 ÍNDICES MITÓTICOS DAS CEPAS MYCOPLASMA HOMINIS ATCC 23114 E ATCC 15056, MYCOPLASMA FERMENTANS E MYCOPLASMA PNEUMONIAE NA CONCENTRAÇÃO 10^3 UAC/ML E RESPECTIVOS CONTROLES.

Mycoplasma sp

Concentração 10^4 uac/ml

FIG.23 ÍNDICES MITÓTICOS DAS CEPAS MYCOPLASMA HOMINIS ATCC 23114 E ATCC 15056; MYCOPLASMA FERMENTANS E MYCOPLASMA PNEUMONIAE NA CONCENTRAÇÃO 10^4 UAC/ML E RESPECTIVOS CONTROLES.

Mycoplasma sp

Concentração 10^5 uac/ml

FIG. 24 ÍNDICES MITÓTICOS DAS CEPAS MYCOPLASMA HOMINIS ATCC 23114 E ATCC 15056, MYCOPLASMA FERMENTANS E MYCOPLASMA PNEUMONIAE NA CONCENTRAÇÃO 10^5 UAC/ML E RESPECTIVO CONTROLES.

Mycoplasma hominis
ATCC 23114

FIG.25 ÍNDICES MITÓTICOS DA CEPA MYCOPLASMA HOMINIS
ATCC 23114, NAS CONCENTRAÇÕES 10^4 , 10^5 E 10^5
UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Mycoplasma hominis ATCC 15056

NHM= Não houve Mitose

FIG.26 ÍNDICES MITÓTICOS DA CEPA MYCOPLASMA HOMINIS
ATCC 15056, NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 e 10^5
UAC/ML E DE SEU RESPECTIVO CONTROLE.

Mycoplasma fermentans
ATCC 19689

FIG.27 ÍNDICES MITÓTICOS DA CEPA MYCOPLASMA FERMENTANS
NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEU
RESPECTIVO CONTROLE.

Mycoplasma pneumoniae
ATCC 15492

FIG. 28 ÍNDICES MITÓTICOS DA CEPA MYCOPLASMA PNEUMONIAE NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 E 10^5 UAC/ML E DE SEUS RESPECTIVOS CONTROLES.

Os efeitos extremos dos micoplasmas sobre as culturas temporárias de linfócitos, quais sejam: inibição total da mitose e nenhuma influência na mitose, permitem concluir seguramente que nas condições experimentais aqui utilizadas, alguns micoplasmas em determinadas concentrações são capazes interferir no processo mitótico.

Por isso, as próximas etapas de análise somente serão realizadas para o grupo a seguir:

4.1.1.3 Mitoses alteradas com índices mitóticos superiores a 10

As cepas que induziram alterações mitóticas, bem como as frequências em que tais alterações ocorreram em função das concentrações micoplásmicas, estão expressas na Tabela II.

Tabela II. Número e Frequência das alterações em função das concentrações micoplásmicas (UAC/ml) - N^o (F)

AMOSTRAS	10^3	10^4	10^5	$>10^5$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO V	15(2,3)	0(0,0)	3(0,62)	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VI	8(1,9)	0(0,0)	5(1,76)	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII		1(1,09)		
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VIII	1(0,57)	20(9,7)	29(7,8)	13(48,1)
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO IX	8(10,7)	1(0,05)	4(17,4)	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XI	4(0,59)	1(0,82)	33(6,82)	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XII	6(1,88)			
<i>M. PNEUMONIAE</i>	5(0,99)	6(4,69)		
SOBRENADANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO III			5(8,5)	
SOBRENADANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII			1(4,0)	

4.2 Teste de Significância aplicado aos valores encontrados

Aplicando-se o teste estatístico de χ^2 com a finalidade de se verificar se as frequências de alterações obtidas nas culturas-teste são significativas quando comparadas às frequências das respectivas culturas-controle, os seguintes resultados foram obtidos:

- As culturas-teste que apresentaram alterações mitóticas significativas foram: Ureaplasma urealyticum sorotipo VIII nas concentrações 10^4 UAC/ml; 10^5 UAC/ml e maiores que 10^5 UAC/ml; Ureaplasma urealyticum sorotipo XI na concentração 10^5 UAC/ml; Ureaplasma urealyticum sorotipo IX nas concentrações 10^3 UAC/ml e 10^5 UAC/ml; Ureaplasma urealyticum sorotipo XII na concentração 10^3 UAC/ml e os sobrenadantes das cepas Ureaplasma urealyticum sorotipo VII e Ureaplasma urealyticum sorotipo III. Estes dados estão expressos na tabela III.

Tabela III. Significância do número de alterações mitóticas observadas em função das concentrações micoplásmicas (UAC/ml).

AMOSTRAS	NÚMERO DE ALTERAÇÕES MITÓTICAS SIGNIFICATIVO	NÚMERO DE ALTERAÇÕES MITÓTICAS NÃO SIGNIFICATIVO
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO V		$\frac{3}{10} ; \frac{5}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VI		$\frac{3}{10} ; \frac{5}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII		$\frac{4}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VIII	$\frac{4}{10} ; \frac{5}{10} ; > \frac{5}{10}$	$\frac{3}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO IX	$\frac{3}{10} ; \frac{5}{10}$	$\frac{4}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XI	$\frac{5}{10}$	$\frac{3}{10} ; \frac{4}{10}$
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XII	$\frac{3}{10}$	
<i>M.PNEUMONIAE</i>		$\frac{3}{10} ; \frac{4}{10}$
SOBREDANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO III	$\frac{5}{1}$	
SOBREDANTE <i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII	$\frac{5}{1}$	

4.3 Tipos e frequência de aberrações cromossômicas.

As aberrações cromossômicas encontradas nas células em metáfase, foram as seguintes: quebras cromatídicas (QCT) e cromossômicas (QCR), falhas cromatídicas (GAPS), fragmentos acêntricos; disjunção prematura do centrômero parcial ou total (PCDp e PCDt); rearranjos cromatídicos e cromossomos em anel.

Algumas aberrações cromossômicas não puderam ser totalmente esclarecidas, porém por terem apresentado incidência significativa, quando da análise dos efeitos causados pela cepa Ureaplasma urealyticum sorotipo VIII, foram computados como "outras" alterações. Nesta análise classificatória foram também incluídos os cromossomos em anel e cromossomos formando figuras multi-radiais. As figuras 29 e 30 ilustram algumas das aberrações cromossômicas acima mencionadas.

Figura 29 - Cromossomos em anel ( ), falha cromatídica ( ),
quebras cromatídicas ( ), disjunção prematura de
centrômero parcial ( ), fragmento cromossômico ( ).

Figura 30 - Descondensação centromérica (—→), disjunção prematura do centrômero total (⇨), fragmento cromossômico (—→), rearranjos cromatídicos (—→), mitose com múltiplas alterações (⇨).

Algumas das alterações drásticas causadas nas culturas de linfócitos poderão ser observadas através das figuras 31 e 32.

Figura 31 - A figura ilustra mitoses alteradas (◄), e ao redor forma cocóides de micoplasmas (em lâmina após 72 horas de cultivo conjunto). Aumento 1.000 vezes.

Figura 32 - Esta figura demonstra agregados linfocitarios, e núcleos não estimulados, consequência da presença de micoplasmas. Aumento 400 vezes.

As aberrações cromossômicas estruturais mais frequentes foram os *gaps*, quebras cromatídicas, descondensação centromérica parcial e quebras cromossômicas. A maior frequência de *gaps* cromatídicos e quebras cromatídicas pôde ser observada nas culturas com as cepas Ureaplasma urealyticum sorotipo VIII em concentrações maiores que 10^5 UAC/ml e com o sorotipo IX nas concentrações 10^5 UAC/ml e 10^3 UAC/ml e em uma das duplicatas do sobrenadante Ureaplasma urealyticum sorotipo VII. A maior frequência de quebras cromossômicas ocorreu na cultura-teste com

sobrenadante Ureaplasma urealyticum sorotipo VII. A maior frequência de quebras cromossômicas ocorreu na cultura-teste com o sorotipo VIII, na concentração maior que 10^5 UAC/ml.

A alteração denominada descondensação de centrômero parcial foi mais frequente na concentração 10^5 UAC/ml do sorotipo IX. Cromossomos em anel foram vistos nas culturas-teste do sorotipo XI na concentração 10^3 UAC/ml e do Mycoplasma pneumoniae na concentração 10^3 UAC/ml. Figuras multirradiais como rearranjos cromatídicos foram vistos nas culturas-teste com Ureaplasma urealyticum sorotipo VI e Mycoplasma pneumoniae ambos na concentração 10^4 UAC/ml. As alterações cromossômicas estruturais múltiplas (envolvendo mais do que três cromossomos da mitose) somente apareceram nas culturas-teste, não tendo sido observadas nas culturas- controle. Estas tiveram nos gaps cromatídicos sua maior frequência de alterações, seguida das quebras cromossômicas.

As frequências com que estas alterações apareceram distribuídas em cada cultura-teste, em função das concentrações micoplásmicas, e nos sobrenadantes testados podem ser observadas através das figuras a seguir:

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 27815)

IPM=Inibição Parcial da Mitose

FIG.33 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES OBSERVADAS SOMENTE NO CONTROLE DO SOROTIPO III. A ALTERAÇÃO CAUSADA PELA CEPA FOI A INIBIÇÃO PARCIAL DA MITOSE EM TODAS AS CONCENTRAÇÕES ENSAIADAS.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 27817)

FIG.34 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO U.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 27818)

FIG. 35 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO VI.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 27819)

NHM= Não Houve Mitose

FIG.36 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO VII.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 27618)

FIG. 37 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO VIII

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 33175)

FIG. 38 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO IX

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 33695)

FIG. 39 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO x I

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Ureaplasma urealyticum (ATCC 33696)

IPM=Inibição Parcial da Mitose
NHM=Nao Houve Mitose

FIG. 40 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM FUNÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DOS INÓCULOS DO SOROTIPO XII.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Sobrenadante: U. urealyticum(ATCC 27815)

NHM= Não Houve Mitose

FIG. 41 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM FUNÇÃO DOS
EFEITOS DOS SOBRENADANTES DO SOROTIPO III.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES Sobrenadante: U. urealyticum(ATCC 27819)

NHM= Não Houve Mitose

FIG. 42 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM FUNÇÃO DOS
EFEITOS DOS SOBRENADANTES DO SOROTIPO VII.

FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕESxCONCENTRAÇÕES *Mycoplasma pneumoniae* (ATCC 15492)

NHM = Não Houve Mitose

FIG. 43 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM CONSEQUÊNCIA DA AÇÃO DA CEPA *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* NAS CONCENTRAÇÕES 10^3 , 10^4 e 10^5 UAC/ML.

4.4. Frequência total de aberrações cromossômicas.

No resultado global da análise cromossômica em teste cego, os gaps cromatídicos representaram 51,5% do total de alterações; as quebras cromatídicas 14,2%; as quebras cromossômicas 4,1%; pcdp 5,9%; pcdt 4,1%; dcp 6,5%; dct 4,1%; outras alterações 9,5% representadas por: cromossomos em anel 1,2%, rearranjos cromatídicos 1,2% e um conjunto de alterações não definidas, 7,1% do total de alterações sendo este número bastante expressivo e significativo estatisticamente.

As culturas-controle apresentaram 53,6% de gaps cromatídicos; 17,9% de quebras cromatídicas cuja frequência comparada à cultura-teste não foi significativa estatisticamente. A frequência de quebras cromossômicas neste grupo foi significativamente mais elevada que o grupo teste, utilizando-se o teste de significância para a diferença de duas populações ($t > 1,645$ para $\alpha=5\%$).

No que se refere às alterações múltiplas, a descondensação do centrômero parcial foi somente observada em uma mitose do controle (3,6%). Esta frequência se compara às observadas nas culturas-teste (6,5%).

4.5 Determinação das frequências das células com uma só alteração e das células com mais de uma alteração

Ao se determinar as frequências de células com uma só alteração e de células com mais de uma alteração os seguintes resultados foram observados: de um total de 104 células alteradas, 35 (33,7%) apresentavam uma única alteração enquanto que 69 células (66,3%) possuíam mais do que uma alteração.

O número de células com uma alteração nas culturas-controle foi de 4 (25%) sendo que para células com mais de uma alteração esse número foi de 12 (75%).

As frequências de células com uma alteração e com mais de uma alteração foram estatisticamente semelhantes entre o grupo teste e o grupo controle.

As tabelas IV e V apresentam a distribuição das várias alterações por célula e por cepa nas várias concentrações.

Tabela IV. Células com uma só alteração nas culturas-teste e culturas-contrôle.

CULTURAS TESTE	CONCENTRAÇÃO UAC/ml	NÚMERO DE CÉLULAS COM 1	GAP	QCT	QCB	BCp	BCt
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO V	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10	2		1		1	
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VI	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10	5	5				
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10	2	1	1			
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VIII	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10	1		1			
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VIII	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10 ⁵ > 10	1 6 5	1 6 3				1
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO IX	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10	1		1			
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XI	3 10 ⁴ 10 ⁵ 10	1 7	1 6			1	
SOBRENADANTE DO SOROTIPO VII	S 1	1		1			
CULTURAS CONTROLE		4	3	1			

Tabela V. Células com mais de uma alteração nas culturas-teste e culturas-contrôle.

CULTURAS TESTE	CONCENTRAÇÕES UAC/ml	CÉLULAS COM MAIS DE 1	GAP	QCT	QCR	PCD _p	PCD _t	DC _p	DC _t	OUTROS
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO V	3									
	10 ⁴	7	4	2		2		2	1	2
	10 ⁵									
	10 ⁶									
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VI	3									
	10 ⁴	1	3							
	10 ⁵									
	10 ⁶	2	2							1
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII	3									
	10 ⁴	1								1
	10 ⁵	9	11		2			3	2	1
	10 ⁶	13	8	2	1		1	1	4	6
	>10 ⁶	3	6	2						
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO IX	3									
	10 ⁴	3	6	1		1				
	10 ⁵	1				1				
	10 ⁶	1	2					1		
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XI	3									
	10 ⁴	3	1				2			1
	10 ⁵									
	10 ⁶	8	14	8	1			3		
<i>U.UREALYTICUM</i> SOROTIPO XII	3									
	10 ⁴	6					2	4		
	10 ⁵									
	10 ⁶									
<i>M. PNEUMONIAE</i> ATCC 15492	3									
	10 ⁴	4				4				1
	10 ⁵	4	3	2						1
	10 ⁶									
SOBRENADANTE SOROTIPO III	S 1	3	2		1					2
CULTURAS CONTROLE		12	10	3	6	2				

Uma análise resumida de todos os resultados experimentais obtidos revelou que, independentemente das concentrações em que foram estudadas, várias cepas apresentaram efeitos drásticos sobre o processo mitótico, desde uma inibição parcial à uma inibição total da mitose.

Nestes casos estão compreendidos os sorotipos II, III e X, as cepas de Mycoplasma hominis ATCC 15056 e Mycoplasma fermentans e os sobrenadantes das culturas dos sorotipos II, III, VII. As inibições parciais ou totais obtidas em consequência das concentrações dos inóculos puderam ser observadas: Ureaplasma urealyticum sorotipos I, VII, XII e Ureaplasma urealyticum sorotipos III e VII, Mycoplasma hominis e Mycoplasma pneumoniae.

Dentre as amostras testadas que apresentaram mitoses alteradas, foi possível verificar que para algumas cepas a concentração do inóculo teve alguma influência na frequência das alterações. Nestes casos citam-se Ureaplasma urealyticum sorotipos V, VI, VII, VIII, IX, XI e XII e a cepa Mycoplasma pneumoniae, muito embora somente foram estatisticamente significantes os dados observados para os sorotipos VIII, IX, e XI.

5.DISCUSSÃO

As alterações na organização cromossomal representam um dos efeitos mais característicos e facilmente detectáveis quando da exposição celular a agentes mutagênicos.

Culturas temporárias de linfócitos humanos do sangue periférico constituem uma das técnicas mais sensíveis para a detecção "in vitro" de tais efeitos, no material genético humano.(93)

Fraquetemente os efeitos observados nos testes citogenéticos "in vitro", são inferidos para a situação "in vivo",apesar de uma proporção considerável de agentes mutagênicos tem demonstrado efeitos divergentes entre as duas condições experimentais.(35, 64).

Portanto os estudos "in vitro" servem apenas como indicativo dos estudos "in vivo", uma vez que nestes, as características individuais dos doadores, tais como: idade, sexo e constituição genética podem interferir na frequência de células com aberrações cromossômicas (55).

De acordo com dados da literatura, a frequência média de células com alterações cromossômicas em indivíduos normais varia de 1 a 6% (41), podendo ainda ser encontrados valores de

6.98% (63), de 1 a 20% (61) e de 5,6 a 6,5% (58).

No presente experimento, das culturas controles que apresentaram alterações, as seguintes frequências de aberrações cromossômicas foram encontradas: 2,62%, 0,8%, 0,2%, 0,3%, 1,3% e 0,27% sendo a média 0,5%. Tais resultados estão portanto, inferiores aos dados obtidos por outros autores.

Em culturas de linfócitos humanos em que se utiliza a fitohemaglutinina como agente mitogênico, a síntese de DNA tem início nas primeiras 24-48 horas de cultivo. Após a estimulação, tem-se duas subpopulações celulares que diferem entre si quanto a síntese de DNA; uma constituída de células que dividir-se-ão precocemente em 24 horas e outra composta de células de divisão tardia que iniciarão sua primeira divisão 24 horas após (49, 33).

Os linfócitos de proliferação precoce e os de proliferação tardia parecem diferir, quanto a susceptibilidade frente a agentes mutagênicos, no que se refere às aberrações cromossômicas estruturais (10).

Estes dados demonstram que, na análise citogenética, o tempo de permanência das células em cultura é um dos principais fatores que influenciam na frequência de aberrações cromossômicas. Portanto, após 48 horas de cultivo a 37°C, grande parte dos linfócitos já realizou sua primeira divisão, e com 72

horas algumas células já completaram duas ou três divisões. Desta maneira devem ser avaliados tanto "in vivo" quanto "in vitro" os resultados da primeira divisão celular. Contudo, certos agentes mutagênicos inibem a replicação normal das células "in vitro", sendo portanto necessário um tempo maior de cultivo para obtenção de um número considerável de metáfases (35).

No presente experimento, os linfócitos foram mantidos em estufa a 37°C por 72 horas. Este tempo foi escolhido por ter sido observado, em plano piloto, que utilizando-se como inóculos cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas de casos de uretrites, quando, em concentrações mais elevadas colocadas em cultivo com linfócitos humanos do sangue periférico, dificultavam a replicação normal das células fornecendo baixos índices mitóticos. Portanto, devido a necessidade de se avaliar um número considerável de metáfases e obter mutações cromossômicas estáveis, optou-se por um tempo de incubação maior.

No decorrer do experimento foram empregados, como agentes mitogênicos duas fitohemaglutininas de procedências diferentes. Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se a fitohemaglutinina da marca Cutilab, sendo posteriormente substituída pela Fito P(R) Difco. Testes de atividades mitogênicas foram realizados com ambas e os índices mitóticos obtidos foram semelhantes.

No que se refere à padronização do inóculo, o emprego de 1 ml de caldo de cultivo das cepas, poderia a princípio ter interferido no processo mitótico em decorrência da alteração na proporção fitohemaglutinina/volume final da amostra. Controles contendo 5 ml de meio 199 ou invés de 4 ml foram processados para o cultivo de linfócitos e os resultados dos índices mitóticos, revelaram não ter qualquer interferência do volume na estimulação mitótica. Esta metodologia foi semelhante a empregada por Copperman (23) em seu estudo com cepas viáveis e não viáveis de Mycoplasma hominis, as quais inibiam o efeito mitogênico da fitohemaglutinina.

Foram também realizados testes com a finalidade de se observar efeitos do pH sobre a cultura de linfócitos. Acrescentando-se 1 ml do meio líquido U₁₀ (pH=5,5-6,0) à cultura de linfócitos, observou-se uma inibição parcial da mitose como consequência da alteração do pH do meio. O mesmo não foi observado quando inoculamos 1 ml dos caldos provenientes do cultivo de 24 horas das cepas de Ureaplasma urealyticum pelo fato destes apresentarem um pH ao redor de 7,2 compatível com o processo mitótico. O mesmo procedimento foi realizado quando da inoculação das cepas de Mycoplasma hominis(ATCC 23114) e Mycoplasma hominis(ATCC 15056) após cultivo de 48-72 horas.

Nos casos das cepas de Mycoplasma fermentans(ATCC 19689) e Mycoplasma pneumoniae(ATCC 15492), espécies cujo produto final do metabolismo é ácido, os inóculos foram

preparados centrifugando-se a 12.000 g os caldos de cultivo dos mesmos nas concentrações 10^3 UAC/ml; 10^4 UAC/ml; 10^5 UAC/ml e ressuspendendo-se os "pellets" com 1 ml de meio 199.

Vários sistemas celulares têm sido utilizados na tentativa de elucidar alguns dos efeitos citopáticos decorrentes da infecção micoplásmica.(123, 128).

Scheineider et al.(113) e Fogh (36), estudando os possíveis efeitos dos micoplasmas sobre culturas de células do líquido amniótico, constataram serem estes microorganismos responsáveis por um aumento significativo no número de alterações cromossômicas.

O diagnóstico precoce dessas anormalidades no início da gestação, através da amniocentese, tem revelado ser de inestimável importância, uma vez que a análise cromossômica das células amnióticas em cultivo e a detecção de um cariótipo anormal, poderiam demonstrar o grau de acometimento fetal, possibilitando a realização de um aborto terapêutico.

Com a finalidade de demonstrar os efeitos citopáticos e citotóxicos da cepa T- 960 de Ureaplasma urealyticum (sorotipo VIII), em concentrações iguais a 10^3 UAC/ml, 10^4 UAC/ml e 10^6 UAC/ml respectivamente, sobre várias linhagens celulares, Kotani (51) e Masover (62) verificaram serem estes mínimos, afetando de maneira pouco significativa os índices de multiplicação celular.

Por outro lado, a infecção de uma dessas linhagens por espécies diferentes de micoplasmas conduziu a alterações cromossômicas extremas, redução da taxa de multiplicação celular, e aumento da granularidade citoplasmática (78, 66).

Tais efeitos demonstram que o grau de infectividade micoplásmica depende da cepa infectante e do sistema celular envolvido.

O questionável papel patogênico do Ureaplasma urealyticum nas patologias do trato geniturinário e as possíveis conseqüências de um não tratamento, fizeram com que vários estudos envolvendo a espécie, fossem realizados.

Por apresentar uma grande heterogeneidade antigênica intra-espécie, uma possível correlação entre alguns de seus sorotipos e a presença de sinais e sintomas de doença, tem sido enfocada. Portanto a grande reatividade cruzada apresentada entre os sorotipos dificulta muitas vezes essa correlação. (73, 119).

A proposição do presente estudo foi a tentativa de encontrar uma correlação entre os efeitos causados por 11 sorotipos de Ureaplasma urealyticum sobre linfócitos humanos.

Dentre os resultados aqui obtidos, as cepas que apresentaram efeitos drásticos sobre a mitose, inibição total e

parcial, pertenciam aos sorotipos II, III, VII, e X. Alguns autores têm incriminado os sorotipos pertencentes ao grupo B (I, III, VI e XIV) os mais ~~Fraquetemente~~ envolvidos nas patologias humanas, enquanto que outros tem demonstrado que também os sorotipos IV, VIII e X do grupo A também tem sido isolados de pacientes (25, 95, 138, 73, 80). Com as devidas ressalvas, quanto à extrapolarmos os resultados obtidos em nosso modelo experimental "in vitro " para a situação "in vivo", constatamos que tanto o sorotipo III quanto o sorotipo X estão entre os mais eficientes na indução da inibição mitótica, um dos mais, senão o mais grave dos danos celulares observados. Estes resultados apresentam-se concordantes com os dados obtidos por outros autores .

Quanto à produção de alterações estruturais cromossômicas significativas, os sorotipos envolvidos foram VIII, IX e XI. Destaque deve ser feito ao sorotipo VIII por ter apresentado a maior frequência de alterações. Apesar de pertencer ao grupo A, pouco participativo dos processos patológicos, de acordo com Quin (83, 134), este sorotipo também tem papel relevante na doença humana.

Desta maneira dentre o painel constituído de 11 sorotipos de Ureaplasma urealyticum testados, sete causaram efeitos consistentes à nível mitótico e dentre eles três (sorotipos III, VIII e X) possuíam suporte clínico na literatura.

Apesar do reduzido número de trabalhos experimentais envolvendo a sorotipagem de cepas de Ureaplasma urealyticum isoladas de amostras clínicas, pelo exposto fica claro a importância de sua realização.

As outras espécies aqui estudadas: Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans e Mycoplasma pneumoniae apresentaram os seguintes resultados: Mycoplasma hominis ATCC 23114 e ATCC 15056 e Mycoplasma fermentans tiveram efeitos drásticos sobre a mitogênese, inibindo-a total ou parcialmente; dados estes compatíveis com os obtidos em outros estudos (4). Foram testadas duas cepas de Mycoplasma hominis com a finalidade de avaliar possíveis variações de comportamento, tendo em conta a existência de diferenças genotípicas e fenotípicas intra espécie (77).

Quanto a espécie Mycoplasma pneumoniae os efeitos observados foram desde alterações na mitose em determinadas concentrações até inibição total do processo mitótico.

No que se refere às concentrações de micoplasmas utilizadas como inóculo, 10^3 UAC/ml; 10^4 UAC/ml e 10^5 UAC/ml, foram empregadas concentrações mais próximas daquelas encontradas na infecção humana.

Dentre as amostras testadas, as que apresentaram

alterações nas mitoses, como consequência da variação da concentração dos inóculos citam-se: Ureaplasma urealyticum sorotipos VII,VIII IX e XI; e a espécie Mycoplasma pneumoniae. Aula et al. (4) estudando o comportamento das espécies Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans e Mycoplasma salivarium sobre cultura temporária de linfócitos verificaram que essas três espécies causavam inibição mitótica quando era utilizado um inóculo de aproximadamente 10^6 CFU (unidades formadoras de colônias) ; o mesmo não foi observado para inóculos de 10^3 CFU/ml, exceto para Mycoplasma salivarium. Nossos resultados aparentemente não são concordantes, todavia a unidade aqui utilizada para determinar a concentração do inóculo foi UAC/ml (unidades de alteração de cor=CCU/ml=color change units). De acordo com Masover(363) o número de CCU₅₀ é cerca de duas vezes maior que o número em CFU. Portanto ao se trabalhar com UAC uma maior concentração de micoplasmas estaria sendo inoculada quando comparada à CFU. Isto em parte justificaria as diferenças entre os resultados.

Quanto aos tipos de alterações estruturais cromossômicas, em nosso estudo encontrou-se maior frequência de gaps, quebras cromatídicas, quebras cromossômicas o mesmo tendo sido observado por Schneider (113), Aula(4) e Kundsinn (52). As demais alterações: disjunção prematura de centrômero, descondensação centromérica, cromossomos em anel e rearranjos cromatídicos foram observadas em frequências menores. Foram também detectados danos extremos à mitose, dificultando

inclusive a identificação dos cromossomos, tais alterações foram computadas em "outras".

Alguns autores como Paton (78) e Fogh (36) também relataram o aparecimento de variedades cromossômicas estruturalmente não definidas decorrentes de infecção micoplásmica utilizando outros modelos experimentais.

A análise das alterações foi também realizada considerando-se a frequência destas, em células com uma e com mais de uma alteração. Desta maneira, supõe-se que células com múltiplas alterações tenham uma maior preditividade no que se refere à capacidade dos micoplasmas de induzir alterações mutagênicas.

Nossos resultados indicam que alterações cromossômicas e inibição mitótica em culturas temporárias de linfócitos estão associadas com algumas cepas de micoplasmas e em alguns casos possivelmente com o número de microorganismos.

As razões pelas quais esses fenômenos ocorrem ainda hoje é discutida.

As grandes concentrações de amônia liberada pelos ureaplasmas como produto final de seu metabolismo, possivelmente exercem efeitos tóxico inibitórios, além de danos cromossomais. Os testes aqui realizados envolvendo os sobrenadantes dos caldos

de cultivo em concentração 10^5 UAC/ml de 4 sorotipos de Ureaplasma urealyticum: sorotipo III, sorotipo VII, sorotipo X e sorotipo II, nos revelaram que excetuando o sobrenadante procedente do sorotipo X, os demais inibiram total ou parcialmente a mitose, além de causarem alterações nestas mitoses. Os resultados obtidos com o sobrenadante do sorotipo X, foram portanto discrepantes quando comparados aos observados com a cepa, não se tendo nenhuma justificativa para o achado.

De acordo com Barile (7) cepas de Mycoplasma hominis isolados de diversos tecidos de pacientes com diferentes doenças, apresentam marcantes diferenças genotípicas e fenotípicas. O autor concluiu que cepas que colonizam diferentes tecidos podem diferir também na capacidade de produzir doenças. Sua patogenicidade está correlacionada com a habilidade que diferentes cepas possuem de adsorver a diferentes substratos celulares.

Portanto, quanto às causas dos efeitos produzidos pela espécie Mycoplasma hominis, talvez em parte se justifiquem pela depleção de aminoácidos essenciais do meio empregado para a cultura de linfócitos (meio 199), como consequência da atividade arginina deiminase, enzima produzida por esses microorganismos. O mesmo podendo eventualmente ser inferido para Mycoplasma fermentans (4, 23) em decorrência de seu metabolismo análogo ao do M. hominis.

Barile (6) demonstrou que Mycoplasma pneumoniae estimula a transformação blástica e mitoses de culturas de linfócitos obtidas de pacientes com Pneumonia Atípica Primária,

sendo que os efeitos por ele observados foram alterações e inibições mitóticas.

Tais alterações talvez sejam decorrentes da ação de alguns de seus produtos metabólicos liberados no meio de cultura, havendo necessidade de estudos mais detalhados nesse particular.

Embora nossos resultados sejam susceptíveis à tecnologia empregada e ao modelo experimental utilizado, de uma maneira geral ratificam o fato de que a infecção micoplásmica pode acarretar danos cromossomais, celulares, e teciduais muitas vezes irreversíveis.

De acordo com Lee (54), estudando mulheres com febre pós parto ,das quais Ureaplasma urealyticum foi isolado das respectivas hemoculturas, verificou que os anticorpos destas pacientes apresentavam uma forte reatividade cruzada entre os sorotipos I, II, III, IV, VIII, representativos dos grupos genotípicos A e B, sobretudo na fase convalescente, cuja resposta imune foi dirigida à polipeptídeos comuns aos vários sorotipos de Ureaplasma urealyticum testados.

A importância de se sorotipar os isolados de Ureaplasma urealyticum das amostras clínicas, bem como sua quantificação se justifica pelos resultados observados.

Preocupados com as possíveis consequências de uma infecção ureaplásmica, em gestantes e as possíveis seqüelas que

poderiam atingir o feto, propusemos a presente abordagem. De acordo com nossos resultados a infecção ureaplásmica poderá , em determinadas condições responder por eventuais danos cromossomais, conduzindo a um processo abortivo.

Além disso a metodologia empregada poderá ser de utilidade no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, como indicativo dos sorotipos de Ureaplasma urealyticum que poderiam estar mais envolvidos nas alterações do processo mitótico e suas consequências.

6. CONCLUSÕES

Com intuito de se determinar os possíveis efeitos clastogênicos dos micoplasmas sobre cromossomos humanos em culturas temporárias de linfócitos foram realizadas várias padronizações metodológicas. Para tanto estudou-se onze sorotipos de Ureaplasma urealyticum, duas cepas de Mycoplasma hominis, uma cepa de Mycoplasma fermentans e uma cepa de Mycoplasma pneumoniae.

Os sorotipos II, III, e X da espécie Ureaplasma urealyticum, a cepa de Mycoplasma hominis ATCC 15056 e Mycoplasma fermentans inibiram parcial ou totalmente a mitose, independentemente das concentrações dos inóculos.

A influência das concentrações dos inóculos sobre o processo mitótico foi observada nos sorotipos I, VII e XII da espécie Ureaplasma urealyticum, na cepa de Mycoplasma hominis ATCC 23114, e na cepa de Mycoplasma pneumoniae.

Para algumas cepas, as concentrações de micoplasmas inoculadas, tiveram influência na frequência de outros tipos de alterações: Ureaplasma urealyticum sorotipos V, VI, VII, VIII, IX, XI e XII, e a espécie Mycoplasma pneumoniae . Estatisticamente foram significantes os dados observados para os sorotipos VIII, IX, XI, e XII da espécie Ureaplasma urealyticum.

As alterações observadas mais freqüentemente foram: os gaps cromatídicos e as quebras cromatídicas.

Foram observados comportamentos diferentes entre as diferentes espécies de micoplasmas e entre diferentes cepas das espécies: Ureaplasma urealyticum e Mycoplasma hominis.

7. RESUMO

Os efeitos clastogênicos causados por diferentes cepas Ureaplasma urealyticum e por cepas do gênero Mycoplasma foram avaliados "in vitro", utilizando-se culturas temporárias de linfócitos humanos.

Inibições, total ou parcial da mitose foram produzidos pelos sorotipos II, III e X de Ureaplasma urealyticum, independentemente das concentrações dos inóculos de micoplasmas utilizados. Já os sorotipos I, VII e XII do Ureaplasma urealyticum, a cepa Mycoplasma hominis ATCC 23114 e a cepa Mycoplasma pneumoniae foram influenciadas pela concentração dos micoplasmas.

Mitoses alteradas foram observadas nas cepas Ureaplasma urealyticum VIII, IX e X. A maior frequência de alterações foram de gaps cromatídicos e quebras cromatídicas.

Os resultados obtidos neste modelo experimental "in vitro" revelaram haver comportamentos diferentes entre os vários sorotipos de Ureaplasma urealyticum e entre espécies do gênero Mycoplasma.

Essas diferenças observadas, "in vitro", poderão de alguma forma contribuir para melhor compreensão dos efeitos da colonização desses microorganismos em humanos.

8. SUMMARY

Clastogenic effect caused by different strains of Ureaplasma urealyticum and by strains of Mycoplasma sp were evaluated in vitro by using temporary cultures of human lymphocytes.

Mitotic inhibitions, either total or partial were produced by serotypes II, III and X of Ureaplasma urealyticum, independently of the concentration of microorganisms used.

Otherwise, the kind of clastogenic effect of Ureaplasma urealyticum of serotypes I, VII and XII, Mycoplasma hominis strain 23144 and Mycoplasma pneumoniae varied with the different concentrations of these mycoplasmas used in the test.

Mitotic alterations were observed in Ureaplasma urealyticum of serotypes VII, IX and X. Chromatidic gaps and chromatidic rupture were the most frequent kind of alterations evidenced.

The results obtained in the present in vitro experiment revealed that the occurrence of different kind of clastogenic effect depends on the serotypes of Ureaplasma urealyticum and on the strains of Mycoplasma sp. The variability of the effect obtained will contribute to the better comprehension of the effects of colonization of these microorganisms in humans and stimulate future in vivo investigation.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

- 1.ALLISON. A.C. & PATON, G.R. - Chromosomal abnormalities in human diploid cells infected with mycoplasma and their possible relevance to the etiology of Down's Syndrome (mongolism). Lancet, London, 2(475): 1229-1230, 1966.
- 2.ALUOTTO, B.B.; WITTLER, R.G.; WILLIAMS, C.O.; FABER, J.E. - Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species. Int.J.Syst.Bacteriol., Washington, 20: 35-58, 1970
- 3.ARCEO, J.R.; PORRAZ, L.T.; FLORES, J.N.; CASTANEDA, G. - Identificación de Mycoplasma hominis y Ureaplasma urealyticum en pacientes con esterilidad de causa tubaria. Ginecol.Obstet.Méx., Mexico, 59: 252-254, 1991.
- 4.AULA, P. & NICHOLE, W. - The cytogenetic effect of mycoplasma in human leukocyte cultures. J.Cell.Physiol., New York, 70: 281-290, 1967.
- 5.BARILE, M.F. - DNA homologies and sorologic relationships among ureaplasmas from various hosts.

(*) De acordo com a norma NB66/78 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source. INDEX (CASSI) 1990.

Pediatr.Infect.Dis., Baltimore, 5(6): 296-299, 1986.

- 6.BARILE, M.F. - Mycoplasma-tissue cell interactions. In:
TULLY, J.G.; WHITCOMB, R.F. eds. - The mycoplasmas vol.2.
New York, Academic Press, 1979: p.425-74
- 7.BARILE, M.F.; GRABUWSKI, W.; TULLY, J.G. - Mycoplasma
hominis - Tissue cell interactions: A review with new
observations on phenotypic and genotypic properties.
Sex.Transm.Dis., Philadelphia, 10(4): 345-354, 1983.
- 8.BEBEAR, C.; BARBEYRAC, B.; BERNET, C.; RENAUDIN, H. -
Méthodes d'exploration des infections à mycoplasmes.
Ann.Biol.Clin., Paris, 47: 415-420, 1989.
- 9.BEECHAN, H.J.; LO, C.S.; LEWIS, D.E.; COMER S.W.; RILEY,
K.J.; OLDFIELD, E.C. - Recovery from fulminant infection
with Mycoplasma fermentans (incognitus strain) in non-
immunocompromised host. Lancet, London, 338(19): 1014-
1015, 1991.
- 10.BEEK, B. & OBE, G. - The human leukocyte test system II.
Different sensitivities of sub-populations to a chemical
mutagen. Mut.Res., Amsterdam, 24: 395-398, 1974.
- 11.BERMAN, S.M.; HARRISON, R.; DPHILL, M.P.H.; BOYEC, T.;
HAFFNER, W.J.J.; LEWIS, M.; ARTHUR, J.B. - Low birth

- weight, prematurity and postpartum endometritis - association with prenatal cervical Mycoplasma hominis and Chlamydia trachomatis infections. J.Am.Med.Assoc., Chicago, 256(9): 1189-1194, 1987.
- 12.BOWIE, W.R. - Etiology of nongonococcal urethritis evidence for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum. J.Clin.Invest., New York, 59: 735-42, 1977.
- 13.BRACCO, G.; SANSONO, G.; MOLINARO, C.G. - Ruolo del Mycoplasma hominis nelle infezioni acute dell'apparato genitale femminile. Minerva Ginecol., Turin, 42: 59-63, 1990.
- 14.BRUNNER, H.; WEIDNER, W.; SCHIEFER, H.G. - Studies on the role of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in prostatitis. J.Infect.Dis., Chicago, 147(5): 807-13, 1983.
- 15.BRUS, F.; WAARDE, W.M.; SCHOOTS, C.; OETOMO, B.S. - Fatal ureaplasma pneumonia and sepsis in a newborn infant. Eur.J.Pediatr., Berlin, 150: 782-783, 1991.
- 16.BUCKTON, K.E. & PIKE, M.C. - Time in culture and important variable in studying "in vivo" radiation-induced chromosome damage in man. Int.J.Radiat.Biol., London, 8: 439-452, 1964.

17. CASSELL, G.H. - The pathogenic potential of Mycoplasmas: Mycoplasma pulmonis as a model - Rev.Infect.Dis., Chicago, 4(5-6), 1982.

18. CASSELL, G.H.; CROUSE, D.T.; CANUP, K.C.; WAITES, K.B.; RUDD, P.T.; STAGNO, S. - Association Ureaplasma urealyticum infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very low birth weight infants. Lancet, London, 30: 240-244, 1988.

19. CASSELL, G.H.; CROUSE, D.T.; WAITES, K.B.; RUDD, P.T.; DAVIS, J.K. - Does Ureaplasma urealyticum cause respiratory disease in newborns? Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 2: 535-541, 1988.

20. CASSELL, G.H.; DAVIS, R.O.; WAITES, K.B. - Isolation of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation: potential effect on outcome of pregnancy. Sex.Trans.Dis., Philadelphia, 10: 294-302, 1983.

21. CLOUGH, W.; CASSELL, H.G.; DUFFY, B.L.; RINALDI, R.Z.; BLUESTONE, R.; MORGAN, M.A.; MEYER, R.D. - Septic arthritis and bacteremia due to Mycoplasma resistant to antimicrobial therapy in a patient with Systemic Lupus Erythematosus. Clin.Infect.Dis., Chicago, 15: 402-7, 1992.

22. CLYDE, W.A. & MCCORMACK, W.M. - Collection and transport of specimens In: RAZIN, S. & TULLY, J.G. eds. Methods in mycoplasmaology, New York, Academic Press., 1983. v.1, p. 103-7.
23. COOPERMAN, R. & MORTON, H.E. - Reversible inhibition of mitosis in lymphocyte cultures by non-viable mycoplasma. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., New York, 123: 790-795, 1966.
24. COPIN, E. & LEBRUN, L. - Infections à mycoplasmes urogénitaux. Feuill.Biol., Paris, 32: 9-15, 1991.
25. CRACEA, E.; BOTEZ, D.; CONSTANTINESCU, S.; BRAILA, M.G. - Ureaplasma urealyticum serotypes isolated from cases of female sterility. Yale J.Biol., New Haven, 57: 895, 1984.
26. CROUSE, D.T.; CASSELL, G.H.; WAITES, K.B.; FOSTER, J.M.; CASSADY, G. - Hyperoxia potentiates Ureaplasma urealyticum pneumonia in newborn mice. Infect.Immun., Washington, 58: 3487-3493, 1990.
27. CUNHA, R.A.F.; TAKIMOTO, S.; TAKEI, K. - Mycoplasmas: isolamento e identificação em material cervical de gestantes. Rev.Microbiol., São Paulo, 19(4): 379-384, 1988.

- 28.CUNNINGHAM, C. - The role of the Genital Mycoplasmas in Neonatal Disease. Clin. Microb.Newsllett, New York, 12 (19): 147-149 1990.
- 29.DIENES, L. & EDSALL, G. - Observation on the L - organism of Klieneberger. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., New York, 35: 740-4, 1937.
- 30.DINSMOOR, M.J.; RAMAMURTHY, R.S.; GIBBS, R.S.- Transmission of genital mycoplasmas from mother to neonate in women with prolonged membrane rupture - Pedriatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 8(8): 483-487, 1989.
- 31.DISCHE, M.R.; QUINN, P.A.; CZEGLÉDY-NAGY, E.; STURGESS, J.M. - Genital Mycoplasma Infection-Intrauterine infection: Pathologic study of the fetus and placenta. Am.J.Clin.Pathol., Philadelphia, 72: 167-74, 1979.
- 32.DONALD, H.M.; O'LOUGHLIN, J.A.; JOLLEY, P.; VIGNESWARAN, R.; MC DONALD, P.J. - Prenatal microbiological risk factors associated with preterm birth. Br. J.Obstet.Gynaecol., London, 99: 190-196, 1992.
- 33.DUDIN, G.; BEEK, B.; OBE, G. - The human leukocyte test system I.DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures. Mutat. Res., Amsterdam, 23: 279-281, 1974.

34. EDWARD, D.G.F.F. - The pleuropneumonia group of organisms: a review, together with some new observation. J.Gen.Microbiol., Colchester, 10: 27-64, 1954.
35. EVANS, H.J. & O'RIORDAN, M.L. - Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Mutat. Res., Amsterdam, 31:135-148, 1975.
36. FOGH, J. & FOGH, H. - Karyotypic changes in Mycoplasma modified lines of fl human amnion cells (33464). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 129: 944-950, 1968.
37. GABRIDGE, M.G.; CHANDLER, D.K.F.; DANIELS, M.J. - Pathogenicity factors in Mycoplasmas and Spiroplasmas. In: RAZIN, S. & BARILE, M.F., eds. The Mycoplasma. New York, Academic Press, 1985. v.4, p.313-351.
38. GALLILY, R.; SALMAN, M.; TARSHIS, M.; ROTTEM, S. - Mycoplasma fermentans (incognitus strain) induces TNF .. and IL-1 production by human monocytes and murine macrophages. Immunol. Lett., Amsterdam, 34, 27-30, 1992.
39. GINSBURG, H. & NICOLET, J. - Extensive transformation of lymphocytes by a Mycoplasma Organism. Nature. New. Biol., London, 246: 143-146, 1973.
40. GUIBERT, M.; LEBRUN, L.; MAGNY, J.F.; COPINE, M.M. DE; VIAL

- M. - Intérêt et limites de la recherche de Mycoplasma hominis et Ureaplasma urealyticum dans le liquide gastrique des nouveau-nés. Pathol.Biol., Paris, 39(4), 287-289, 1991.
- 41.GUNDY, S. & VARGA, L.P. - Chromosomal aberrations in healthy persons. Mutat. Res., Amsterdam, 120:187-191, 1983.
- 42.HARWICK, H.J.; PURCELL, R.H.; IUPPA, J.B.; FEKETTY, F.R. - Mycoplasma hominis and abortion. J.Infect.Dis, Chicago, 121: 260-8, 1960.
- 43.HARWICK, H.J.; PURCELL, R.H.; IUPPA, J.B.; FEKETTY, F.R.- Mycoplasma hominis and postpartum febrile complications Obstet.Gynecol., New York, 37: 765-8, 1971.
- 44.HAYFLICK, L. & CHANOCK, R. - Mycoplasmas species of man. Bacteriol.Rev., Washington, 29 (2): 185-221, 1965.
- 45.HOROWITZ, S.; LANDAU, D.; SHINWELL, E.S.; ZMORA, E.; DAGAN, R. - Respiratory tract colonization with Ureaplasma urealyticum and bronchopulmonary dysplasia in neonates in southern Israel. Pediatr. Infect. Dis.J., Baltimore, 11: 847-51, 1992.
- 46.HOROWITZ, S.; GAL, H. - Isolation and purification of viable Ureaplasma urealyticum cells free from medium components.

J.Gen.Microbiol., Colchester, 137: 10877-1092, 1991.

- 47.HOWARD, C.J.; PALOCK, D.H.; GOURLAY, R.N. - Comparison by polyacrylamide gel eletrophoresis, of the polypeptides from ureaplasmas isolated from cattle and man. Int.J.Syst.Bacteriol., Washington 31: 128-130, 1981.
- 48.JACOBS, F.; STADT, J.V.; GELIN, M.; NONHOFF, C.; GAY, F.; ADLER, M.; THY, J.P. - Mycoplasma hominis infection of perihepatic hematomas in a liver transplant recipient. Surgery, St.Louis, 111, (98) : 100, 1992.
- 49.JOHANSEN, J. - DNA synthesis and distribution of first and second divisions in 72 h - cultures of human leukocytes. Experientia, Basel, 28: 416-417, 1972
- 50.KAHANE, I.; BANAI, M.; RAZIN, S.; FELDNER, J. - Attachment of mycoplasma to host cell membranes. Rev.Infect.Dis., Chicago, 4:(5-6): 5185-5192, 1982.
- 51.KOTANI,H. & McGARRITY, G.J. - Ureaplasma infection of cell cultures. Infet. Immun., Washington, 52 : 437-444,1986.
- 52.KUNDSIN, R.B.; AMPOLA, M.; STREETER, S.; NEURATH, P. - Aberrations induced by T strain mycoplasma. J.Med.Genet., London, 8: 181-87, 1971

- 53.KUNDSIN, R.B.; DRISCOLL, S.G.; MING, P.M.L. - Strain of mycoplasma associated with human reproductive failure. Science, Washington, 157: 1573-4, 1967.
- 54.LEE, G.Y. & KENNY, G.E. - Humoral immune response to polypeptides of Ureaplasma urealyticum in women with postpartum fever. J.Clin.Microb., Washington, 25: 1841-1844, 1987.
- 55.LÉONARD, A.; FABRY, L.; DEKNUDT, G.; DECAT, G. - Chromosome aberrations as a measure of mutagenesis:cytogenetic extrapolation from animal to man. Cytogenet. Cell Genet., Basel, 33:107-113, 1982.
- 56.LIEPMANN, M.F.; WATTRE, P.; DEWILDE, A.; PAPIEROK, G.; DELECOUR, M. - Detection of antibodies to Ureaplasma urealyticum in pregnant women by enzyme-linked immunosorbent assay using membrana antigen and investigation of the significance of the antibodies. J.Clin.Microbiol., Washington, 26: 2157-2160, 1988.
- 57.LINGWOOD, C.A.; QUINN, P.A.; NUTIKKA, W.A.; RUHNKE, H.L.; MILLER, R.B. - Common sulfoglycolipid receptor for Mycoplasmas involved in animal and human infertility. Biol.Reprod., Champaing, 43: 694-697, 1990.

58. LITTLEFIELD, G.L. & GOH, K.O. - Cytogenetic studies in control men and women. Cytogenet. Cell Genet., Basel, 12:17-34, 1973.
59. LO, S.; CHING, D.; AWSON, M.S.; WONG, D.M.; NEWTON II, P.B.; SONODA, M.A.; ENGLER, W.F.; WANG, R.; YUAN, H.U.; SHIH, J.; WAI-KUO; HARVEY, J.A.; WEAR., D.J. - Identification of Mycoplasma incognitus infection in patients with AIDS: An immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. Am.J.Trop.Med.Hyg., Baltimore, 41(5):601-616, 1989.
60. LO, S.C.; SHIH, J.W.K.; NEWTON III, P.B.; WONG, D.M.; HAYES, M.M.; BENISH, J.R.; WEAR, D.J.; WANG, R.Y.H. - Virus-like infections agent (VLIA) is a novel pathogenic Mycoplasma: Mycoplasma incognitus. Am.J.Trop.Med.Hyg., Baltimore, 41(5): 586-600, 1989.
61. LUBS, H.A. & SAMUELSON, J. - Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects. Cytogenetics, Basel, 6: 402-411, 1967.
62. MASOVER, G.K.; NAMBA, M.; HAYFLICK, L. - Cytotoxic effect of a T-strain Mycoplasma (Ureaplasma urealyticum) on cultured normal human cells (WI-38). Exp. Cell Res., New York, 99: 363-374, 1976.

- 63.MATTEI, M.G.; AYME, S.; MATTEI, J.F.; AURRAN, Y.; GIRAUD, F. - Distribution of spontaneous chromosome breaks in man. Cytogenet. Cell Genet., Basel, 23: 95-102, 1979.
- 64.MATTER, B.E. - Problems of testing drugs for potential mutagenicity. Mut.Res., Amsterdam, 38:243-258, 1976.
- 65.McGARRITY, G.J.; VANAMAN, V.; SARAMA, J. - Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. In Vitro, Rockville, 20(1): 1-18, 1984.
- 66.McGARRITY,G.J.; PHILLIPS,D.M.; VAIDYA, A.B.- Mycoplasmal infection of lymphocyte cell cultures : Infection with Mycoplasma salivarium. In Vitro, Rockville 16: 346-356,1980.
- 67.McMAHON, D.K.; DUMMER, J.S.; PASCULLE, A.W. -Extragenital Mycoplasma hominis infections in adults. Am.J.Med., New York, 89: 275-281, 1990.
- 68.MIETTINEN, A.; HEINONEN, K.P.; TEISALA, K.; HAKKARAINEN, K.; PUNNONE, N.R. - Serologic evidence the role of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma hominis in the etiology of tubal factor infertility and ectopic pregnancy. Sex Trans.Dis., Philadelphia, 17: 10-14, 1990.

69. MIETTINEN, A.; PAAVONEN, J.; JANSSEN, E.; LEINIKKI, P. - Enzyme immunoassay for serum antibody to Mycoplasma hominis in women with acute pelvic inflammatory disease. Sex.Trans.Dis., Philadelphia, 10: 289-93, 1983.
70. MOORHEAD, P.S.; NOWEEL, P.C.; MELMANN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. - Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp.Cell Res., New York, 20:613-616, 1960.
71. MOUCHES, C.; TAYLOR-ROBINSON, D.; STIPKOVITS, L.; BOVÉ, J.M. - Comparison of human and animal ureaplasmas by one and two-dimensional protein analysis on polyacrylamide slab gel. Ann.Microbiol., Paris, 132B: 171-196, 1981.
72. MUHLRADT, P.F.; QUENTMEIER, H.; SCHMITT, E. - Involvement of Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in Generation of Cytolytic T Cells from Thymocytes Stimulated by a Mycoplasma fermentans - Derived Product - Infect. Immun., Washington, 59(11): 3962-3968, 1991.
73. NAESSENS, A.; FOULON, W.; BREYNAERT, J.; LAUWERS, S. - Serotypes of Ureaplasma urealyticum isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complications. J.Clin.Microbiol., Washington, 26: 319-322, 1988.

74. NAESSENS, A.; FOULON, W.; BRYNAERT, J.; LAUWERS, S. - Postpartum bacteremia and placental colonization with genital mycoplasmas and pregnancy outcome - Am.J.Obstet Gynecol., St. Louis, 160(3): 647-650, 1989.
75. NAOT, Y. & GINSBURG, H. - Activation of B.lymphocytes by micoplasma mitogen. Immunology, Oxford, 34: 715-720, 1978.
76. NAOT, Y. - In vitro studies on the mitogenic activity of mycoplasmal species toward lymphocytes. Rev.Infect.Dis., Chicago, 4: 205-209, 1982.
77. OLSON, L.D.; RENSHAW, C.A.; SHANE, S.W.; BARILE, M.F. - Successive synovial Mycoplasma hominis isolates exhibit apparent antigenic variation. Infect.Immun., Washington, 59, 3327-3329, 1991.
78. PATON, G.R.; JACOBS, J.P.; PERKINS, F.T. - Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with Mycoplasma. Nature, London, 207: 943-945, 1965.
79. PEASE, P.; ROGERS, K.B.; COLE, B.C. - A cytopathogenic strain of Mycoplasma hominis type 1 isolated from the lung of a stillborn infant. J.Pathol.Bacteriol., Edinburgh, 94: 460-462, 1967.

80. PICKERING, W.J.; BIRCH, D.F.; SMITH, K.P. - Biochemical and histologic findings in experimental pyelonephritis due to Ureaplasma urealyticum, Infect. Immun., Washington, 58: 3401-3406, 1990.
81. POLK, B.F.; BERLIN, L.; KANCHANARAKSA, S.; MUNOZ, A.; KRAMER, F.; SPENCE, M.; QUINN, T.; HOFFMAN, G.; WIN, K.; REPKE, J. ET ALL - Association of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis with intrauterine growth retardation and preterm delivery. Am.J.Epidemiol., Baltimore, 129: 1247- 1256, 1989.
82. POUEDRAS, P.; LECLERCQ, R.; DONNIO, P.Y.; SIRE, J.M.; MESNARD, R.; AVRIL, J.L. - Fatal intrauterine infection associated with Mycoplasma hominis . Clin. Infect. Dis., Washington, 15: 753-4, 1992.
83. QUINN, P.A.; ARSHOFF, L.V.; LI, H.C.S. - Serotyping of Ureaplasma urealyticum by imunoperoxidase assay. J.Clin.Microbiol., Washington, 13: 670-676, 1981.
84. QUINN, P.A.; GILLAN, J.E.; MARKESTAD, T. - Intrauterine infection with Ureaplasma urealyticum as a cause of fatal neonatal pneumonia. Pediatr.Infect.Dis., Baltimore, 4: 538-543, 1985.

85. QUINN, P.A.; RUBIN, S.; NOCILLA, D.M. - Serological evidence of Ureaplasma urealyticum infection in neonatal respiratory disease. Yale J.Biol.Med., New Haven, 56: 565-72, 1983.
86. RAZIN, S. & FREUNDT, E.A. - The mycoplasma. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.740-93.
87. RAZIN, S. & TULLY, J.G. - Cholesterol requirement of mycoplasma. J.Bacteriol., Baltimore, 102(2): 306-310, 1970.
88. RAZIN, S. & YOGU, D. - Genetic relatedness among Ureaplasma urealyticum (serovars). Pediatr.Infect.Dis., Baltimore, 5: 300-304, 1986.
89. RAZIN, S. - Mycoplasma adherence. In: RAZIN, S. & BARILE, M. F., eds. The mycoplasmas. London, Academic Press, 1985. v.4, p.161-198.
90. RAZIN, S. - The mycoplasmas. Microbiol.Rev., Washington, 42: 414-470, 1978.
91. RAZIN, S. - Mycoplasmas: The smallest pathogenic procaryotes Isr.J.Med.Sci., Jerusalem, 17(7): 510-5, 1981.

- 92.RENSBURG. J.V.; ODENDAAL, H.J. - The prevalence of potential pathogenic micro-organisms in the endocervix of pregnant women at Tygerberg hospital. S.Afr.Med.J., Cape Town, 81(3): 156-7, 1992.
- 93.RICHARDSON, C.R.; HOWARD, C.A.; SHELDON, T.; WILDGOOSE, J.; THOMAS, M.G. - The human lymphocyte "in vitro" cytogenetic assay: positive and negative control observations on aproximate 30.000 cells. Mut. Res., Amsterdam, 141: 59-64, 1.984.
- 94.ROBERTS, D.; MURRAY, A.E.; PRATT, B.C.; MEIGH, R.E. - Mycoplasma hominis as a respiratory pathogen in X-linked hypogammaglobulinaemia. J.Infect., London, 18, 175-177, 1989.
- 95.ROBERTSON, J.A.; HONORÉ, L.H.; KAKULPHIMIP, J.; HILL, G.B.; JENKINS, H.J. - Association of Ureaplasma urealyticum with spontaneous abortion. In: INUMS CONGRESS BACTERIOLOGY & MYCOLOGY. Osaka, 1990. Resumos, 1990. p.156.
- 96.ROBERTSON, J.A.; HONORÉ, L.H.; STEMKE, G.W. - Serotypes of Ureaplasma urealyticum in spontaneous abortion. Pediatr.Infect.Dis., Baltimore, 5: 270-272, 1986.

- 97.ROBERTSON, J.A.; STEMLER, M.E.; STEMKE, G.W. - Immunoglobulin A Protease activity of Ureaplasma urealyticum. J.Clin.Microbiol., Washington, 19: 255-258, 1984.
- 98.ROBERTSON. J.A. & STEMKE, G.W. - Expanded serotyping scheme for Ureaplasma urealyticum strains isolated from humans. J.Clin.Microbiol., Washington, 15: 873-878, 1982.
- 99.ROMERO, M.R.J.; AVILA, C.; FOSTER, J.T.; EDWIN, S.S. - Prostaglandins production by amnion and decidual cells in response to bacterial products. Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids., Edinburg, 42(3): 167-9, 1991.
- 100.ROMERO, R.; HAGAY, Z.; NORES, J.; SEPULVEDA, W.; MAZOR, M. - Eradication of Ureaplasma urealyticum from the amniotic fluid with transplacental antibiotic treatment. Am.J.Obstet.Gynecol., St. Louis, 166, 618-620, 1992.
- 101.ROMERO, R.; MAZOR, M.; MORROTI, R.; ÁVILA, C.; OYARZUM, E.; INSUNZA, A.; PARRA, M.; BEHNKE, E.; MONTIEL, F.; CASSELL, G.H. - Infection and Labor. VII Microbial invasion of the amniotic cavity in spontaneous rupture of membranes at term. Am.J.Obstet.Gynecol., St. Louis, 166: 129-133, 1992.

102. RUDD, R.T.; CASSEL, G.H.; WAITES, K.B.; DAVIS, J.K.; DUFFY, L.B. - Ureaplasma urealyticum pneumonia: experimental production and demonstration of age-related Suseptibility. Infect.Immun., Washington, 57: 918-25, 1989.
103. RUUTH, E. & PRAZ, F. - Interactions between Mycoplasmas and the Immune System. Immunol.Rev., Copenhagen, 112: 133-60, 1989.
104. SAADA, A.B.; TERESPOLSKI, Y.; ADONI, A.; KAHANE, I. - Adherence of Ureaplasma urealyticum to human erythrocytes. Infect.Immun., Washington, 59: 467-469, 1991.
105. SABIN, A.B. - The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group. Bacteriol.Rev., Washington, 5(1): 1-66, 1941.
106. SANCHEZ, P. J. & REGAN, J.A. - Vertical transmission of Ureaplasma urelyticum in full term infants. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 6: 825-28, 1987.
107. SANCHEZ, P.J. & REGAN, J.A. - Ureaplasma urealyticum colonization and chronic lung disease in low birth weight infants. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 7: 542-546, 1988.

- 108.SANCHEZ, P.J. & REGAN, J.A. - Vertical transmission of Ureaplasma Urealyticum from mothers to preterm infants. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 9, 398-401, 1990.
- 109.SANYAL, D.; THURSTON, C. - Mycoplasma hominis infection of a breast prothesis - J.Infect, London, 23: 210-1, 1991.
- 110.SASAKI, T.; SASAKI, Y.; KITA, M.; SUZUKI, K.; WATANABE, H.; HONDA, M. - Evidence that Lo's Mycoplasma (Mycoplasma fermentans incognitus) is not a unique strain among Mycoplasma fermentans strains. J.Clin.Microbiol., Washington, 30 (9): 2435-2440, 1992.
- 111.SAVAGE, J.R.K. - Classification and relationships of induced chromosomal strutural changes. J.Med.Genet., London, 12:103-122, 1975.
- 112.SCAPPATICCI, S.; CERIMELE, D.; TONDI, M.; VIVARELLI, R.; FOIS, A.; FRACCARO, M. - Chromosome abnormalities in tuberous sclerosis. Hum.Genet., Berlin, 79:151-156, 1988.
- 113.SCHENEIDER, E.L.; STANBRIGDE,E.J.;GOLBUS,C.J.E.- Mycoplasma contamination of cultured amniotic fluid cells: potential hazard to prenatal chromosomal diagnosis. Science, Washington, 184: 477-479,1974.

114. SCHEURLLEN, W.; FRAUVENDIENST, G.; SCHROD, L.; STOCKHAUSEN, H.B. - Polymerase chain reaction-amplification of urease genes: rapid screening for Ureaplasma urealyticum infection in endotracheal aspirates of ventilated newborns. Eur.J.Pediatr., Berlin, 151: 740-742, 1992.
115. SEGONDS, C.; FRANCOVAL, D.; ASSEMEKANG, B.; IOAN, A. - Mycoplasmas et grossesse-etude préliminaire - J.Gynecol.Obstet.Biol.Reprod., Paris, 21: 385-392, 1992.
116. SHEPARD, M.C. & LUNCEFORD, C.D. - Differential agar medium (A₇) for identification of Ureaplasma urealyticum (Human T Mycoplasma) in primary cultures of clinical material. J.Clin.Microbiol., Washington, 3(6): 631-25, 1976.
117. SHEPARD, M.C. - Standard fluid medium U₁₀ for cultivation and maintenance of Ureaplasma urealyticum. Int.J.Syst.Bacteriol., Washington, 24: 160-171, 1974.
118. SHURIN, P.A.; ALPERT, S.; ROSNER, B.; DRISCOLL, S.G.; LEE, Y.H.; MCCORMACK, W.M.; SANTAMARINA, B.A.G.; KASS, E.H. - Choriamnionitis and colonization to the newborn infant with genital mycoplasma, N.Enql.J.Med., Boston, 293 :5-8, 1975.
119. SILVA, N.A. & QUINN, P.A. - Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in Ureaplasma

- urealyticum. J.Clin.Microbiol., Washington, 29: 1498-1503, 1991.
- 120.SMITH, P.F. - Mass cultivation of ureaplasma and some applications. Ped.Inf.Dis., Baltimore, 5(6): 313-315, 1986.
- 121.SOUNIS, E. - Introdução à teoria da decisão estatística. In: SOUNIS, E. - Bioestatística. São Paulo, Atheneu, 1985. p.207-234.
- 122.STADTLANDER, C.T.K.H.; ZUHUA,C.; WATSON, H.L.; CASSELL, G.H. - Protein and antigen heterogeneity among strains of Mycoplasma fermentans. Infect. Immun, Washington, 59(9): 3319-3322, 1991.
- 123.STALHEIM,O.H.V.;PROCTOR,S.J.;GALLAGHER J.E. - Growth and effects of Ureaplasma urealyticum (T Mycoplasma) in bovine oviductal organ cultures. Infect.Immun., Washington, 13: 915-925,1976.
- 124.STANBRIGE, E.J. - Mycoplasma Lymphocyte interations and their possible role in immunopathologic manifestations of Mycoplasmal disease. Rev.Infect.Dis., Chicago, 4: 219-26, 1982.

125. SHURIN, P.A.; ALPERT, S.; ROSNER, B.; DRISCOLL, S.G.; LEE, Y.H.; McCORMAK, W.M.; SANTAMARINA, B.A.G.; KASS, E.H. - Chorioamnionitis and colonization to the newborn infant with genital mycoplasmas. N.Enql.J.Med., Boston, 293: 5-8, 1975.
126. SYROGIANNOPOULOS, G.A.; ZOUMBOS, K.K.; DECAVALAS, G.O.; MARKANTES, C.G.; KATSAROV, V.A.; BERATIS, N.G. - Ureaplasma urealyticum colonization of full term infants: perinatal acquisition and persistence during early infancy - Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 9: 236-240, 1990.
127. TAYLOR-ROBINSON, D.; CSONKA, G.W.; PRENTICE, M.J. - Human intra-uretral inoculation of ureaplasmas. Q.J.Med., Oxford, 46: 309-26, 1977.
128. TAYLOR-ROBINSON, D.; CARNEY, F.G. - Growth and effect of mycoplasmas in Fallopin tube organ cultures. Br.J.Vener.Dis., London, 50: 212-216, 1974.
129. TULLY, J.G.; TAYLOR-ROBINSON, D.; ROSE, D.L.; COLE, R.M.; BOVÉ, J.M. - Mycoplasma genitalium, a new species from the human urogenital tract. Int.J.Syst.Bacteriol., Washington, 33: 387-396, 1983.

130. TURLEAU, C.; CABANIS, M.O.; GIRAULT, D.; LEDEIST, F.; METTEY, R.; PUISSANT, H.; PRIEUR, M.; GROUCHT, J. - Multibranched chromosomes in the ICF Syndrome: Immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies. Am.J.Med.Genet., New York, 32:420-424, 1989.
131. WAITES, K.B.; DUFFY, L.B.; CROUSE, D.T.; DWORSKY, M.E.; STRANGE, M.J.; NELSON, K.G.; CASSELL, G.H. - Mycoplasmal infections of cerebrospinal fluid in newborn infants from a community hospital population. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 9: 241-245, 1990.
132. WALSH, W.F.; STANLEY, S.; LALLY, K.P.; STRIBLEY, R.E.; TREECE, D.P.; Mc CLESKEY, F.; NULL, D.M. - Ureaplasma urealyticum demonstrated by open lung biopsy in newborns with chronic lung disease. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 10: 823-7, 1991.
133. WANG, E.E.L.; FRAYHA, H.; WATTS, J; HAMMERBERG, O.; CHERNESKY, M.A.; MAHONY, J.B.; CASSELL, G.H. - Role of Ureaplasma urealyticum and other pathogens in the development of chronic lung disease of prematurity. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, 7: 547-551, 1988.
134. WATSON, H.L.; BLALOCK, D.K.; CASSEL, G.H. - Variable antigens of Ureaplasma urealyticum containing both serovar-specific and serovar-cross-reactive epitopes. Infect. Immun.,

Washington, 58: 3679-3688, 1990.

135. WEIDNER, W.; KRAUSS, S.H.; JANTOS, C.; FRIEDRICH, H.J.;
ALTMANNBERGER, M. - Chronic phostatitis: A thorough
search for etiologically involved microorganisms in 1.461
patients. Infection, Munich, 19(3): 5119-5125, 1991.
136. WORD, M.B. & BALDRIGE, A. - Mycoplasma hominis pneumonia and
pleural effusion in a postpartum adolescent.
Pediatr. Infect. Dis. J., Baltimore, 9(4): 295-296, 1990.
137. YOUNG, J.M. & COX, A.R. - Near fatal puerperal fever due to
Mycoplasma hominis. Postgrad. Med. J., Oxford, 66: 147-149,
1990.
138. ZHENG, X.; WATSON, H.L.; WAITES, K.B.; CASSELL, G.H. -
Serotype diversity and antigen variation among invasive
isolates of Ureaplasma urealyticum from neonates.
Infect. Immun., Washington, 60: 3472-3474, 1992.
139. ZLATNIK, F. J.; BURMEISTER, L.F.; SWACK, N.S. - Chorionic
mycoplasmas and prematurity. J. Reprod. Med., Chicago, 31:
1106-08, 1986.

APÊNDICE

NUMERO DE NUCLEOS E NUMERO DE MITOSIS OBSERVADAS

CEPA	UAC/ML	NUMERO DE NUCLEOS	NUMERO DE MITOSIS
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO I	10^3	7380	147
	10^4	4273	146
	10^5	ZERO	ZERO
	CONTROLE	2919	79
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO II	10^3	6010	3
	10^4	9009	31
	10^5	6254	13
	CONTROLE	7062	326
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO III	10^3	13904	42
	10^4	15608	87
	10^5	10782	33
	CONTROLE	7029	306
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO V	10^3	21066	652
	10^4	11536	350
	10^5	12854	482
	CONTROLE	5900	231
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO VI	10^3	14758	421
	10^4	13427	412
	10^5	12907	284
	CONTROLE	21861	742
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO VII	10^3	1641	ZERO
	10^4	9474	92
	10^5	3600	ZERO
	CONTROLE	5493	230
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO VIII	10^3	5000	176
	10^4	7000	207
	10^5	12000	372
	CONTROLE I	17500	534
CONTROLE II	10^5	7000	27
	>10 ⁵	12500	500
<i>UREAPLASMA UREALYTICUM</i> SOROTIPO IX	10^3	6137	75
	10^4	6755	200
	10^5	5052	23
	CONTROLE	2919	79

NUMERO DE NUCLEOS E NUMERO DE MITOSIS OBSERVADAS

CEPA	UAC/ML	NUMERO DE NUCLEOS	NUMERO DE MITOSIS
	³ 10	6238	18
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO X	⁴ 10	6379	11
	⁵ 10	4189	2
CONTROLE		7062	326
	³ 10	16110	674
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO XI	⁴ 10	6476	122
	⁵ 10	14468	484
CONTROLE		27883	1823
	³ 10	6478	319
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO XII	⁴ 10	4340	38
	⁵ 10	2389	ZERO
CONTROLE		6690	296
SORRENADANTE	S	1876	4
	¹ S	882	2
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO II	² S	3296	164
CONTROLE			
SORRENADANTE	S	4880	59
	¹ S	4529	16
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO III	² S	4818	194
CONTROLE			
SORRENADANTE	S	1724	25
	¹ S	470	ZERO
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO VII	² S	5493	238
CONTROLE			
SORRENADANTE	S	3882	76
	¹ S	1758	47
UREAPLASMA UREALYTICUM SOROTIPO X	² S	3296	164
CONTROLE			
	³ 10	12633	28
MYCOPLASMA HOMINIS ATCC 23114	⁴ 10	9718	86
	⁵ 10	ZERO	ZERO
CONTROLE		5988	286
	⁴ 10	ZERO	ZERO
	⁵ 10	ZERO	ZERO
MYCOPLASMA HOMINIS ATCC 15056	⁵ 10	ZERO	ZERO
	⁵ >10	ZERO	ZERO
CONTROLE		19888	645

NUMERO DE NUCLEOS E NUMERO DE MITOSES OBSERVADAS

CEPAS	UAC/ML	NUMERO DE NUCLEOS	NUMERO DE MITOSES
<i>MYCOPLASMA FERMENTANS</i> ATCC 19689	³ 10	8489	12
	⁴ 10	4078	14
	⁵ 10	1901	ZERO
		1818	194
CONTROLE			
<i>MYCOPLASMA PNEUMONIAE</i> ATCC 15492	³ 10	8953	503
	⁴ 10	9622	128
	⁵ 10	9778	ZERO
		2919	79
CONTROLE			