

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de
***Mycoplasma* spp. em culturas celulares**

Mayra Dorigan de Macedo

Ribeirão Preto

2014

RESUMO

MACEDO, M. D. **Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares.** 2014. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O cultivo de células humanas para fins experimentais e terapêuticos se firmou como um dos pilares da biologia celular e tem se tornado uma prática laboratorial cada vez mais disseminada. Associada a esse processo está a contaminação por microrganismos, dentre os quais se destacam as bactérias do gênero *Mycoplasma* spp., os quais são os contaminantes detectados com maior frequência *in vitro*. Um dos pontos críticos no processo de garantia da qualidade, pureza e segurança para uso destas células é a adoção de uma metodologia analítica, para detecção de *Mycoplasma* spp., que seja simples e de rápida execução, com sensibilidade e especificidade adequada e economicamente viável. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma plataforma molecular (PCR em tempo real) para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares. Para tanto, foram testados diversos conjuntos de *primers* (gene 16S rDNA) dentre os quais um foi selecionado para a plataforma molecular. Foram utilizadas amostras de DNA obtidas a partir do sobrenadante de cultura. A PCR em tempo real *in house* foi padronizada utilizando o intercalante fluorescente de DNA dupla fita *BRYT Green*[®] e produziu um fragmento de 270 pares de bases. A temperatura de *melting* para as amostras positivas foi definida no intervalo de 81 a 84°C. A plataforma molecular foi validada por meio dos parâmetros sensibilidade analítica e diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez. O limite de detecção do teste (LOD) foi de 5 cópias/5 µL. Para a especificidade, foi observada reação cruzada com bactérias de relação filogenética próxima e com DNA de célula humana. A sensibilidade diagnóstica foi de 100%. Não houve contaminação por arraste. O coeficiente de variação encontrado no parâmetro precisão foi de 0,64% e 1,80% para a avaliação intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente. O coeficiente de variação da análise robustez foi de 5,42%. Ao comparar a plataforma molecular com o teste comercial, observou-se que 29,85% (n=40) das amostras apresentaram resultados falso-negativos pelo teste comercial. Determinou-se ainda que a PCR em tempo real *in house* foi mais sensível do que o teste comercial. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de estruturas sugestivas de espécies de *Mycoplasma* spp. na superfície das células. A análise filogenética permitiu a classificação das espécies encontradas. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram propor o algoritmo para aplicação de um método de detecção simples e rápido para *Mycoplasma* spp.; e fazer deste uma ferramenta para o controle de qualidade das células cultivadas, garantindo a eficiência destas células para uso em pesquisa e maior segurança para uso em terapia celular.

Palavras-Chave: *Mycoplasma* spp., PCR em tempo real, Cultura Celular.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama Atual da Aplicação do Cultivo de Células

O cultivo de células na pesquisa científica é uma tecnologia amplamente empregada para elucidar desde os mecanismos básicos da célula até processos mais complexos como sinalização, funcionamento e comportamento de tecidos humano, animal ou vegetal. Com o passar do tempo, aliada à evolução da engenharia celular e genética, esta ferramenta deixou de se limitar a fins experimentais e ampliou as perspectivas para o seu uso, possibilitando o escalonamento do cultivo de diversos tipos celulares com fins biotecnológicos e farmacêuticos (ARATHOON; BIRCH, 1986). As empresas deste setor investem na produção de biofármacos e bioderivados, como proteínas recombinantes (eritropoietina humana, fator VIII da cascata de coagulação), anticorpos monoclonais para imunoenaios e vacinas. Paralelamente, as células cultivadas também passaram a ser alvo da medicina regenerativa, que vem despontando como uma modalidade terapêutica e promissora. O cultivo celular se estabeleceu como ferramenta para obtenção de células para tratamento e reconstrução de tecidos lesados. Deste modo, o cultivo de células se firmou como um dos pilares para a biologia celular e molecular, fazendo desta, uma prática laboratorial disseminada e rotineira.

1.2 Terapia Celular

A terapia celular consiste na substituição de células não funcionais por células sadias, objetivando tratar uma variedade de doenças degenerativas para as quais não há tratamentos específicos e efetivos. A capacidade de auto-renovação por meio de divisão assimétrica, de diferenciação em múltiplas linhagens celulares e de proporcionar a reconstituição, *in vivo*, de tecidos lesados fez com que o uso de células-tronco se firmasse como um dos métodos mais bem estabelecidos nessa linha terapêutica (Verfaillie, 2002). Apesar de as células-tronco mesenquimais (CTM) não apresentarem todas as propriedades de células-tronco, elas também tem sido exploradas para esse fim, por serem multipotentes e capazes de se diferenciar em várias outras células quando sob condições específicas (PITTENGER et al., 1999; CAPLAN; BRUDER, 2001; YOUNG; BLACK Jr., 2004; LE BLANC; PITTENGER, 2005).

O isolamento das células-tronco mesenquimais de medula óssea frequentemente é realizado por meio da capacidade que estas células possuem de se aderir ao plástico (FRIEDENSTEIN; GORSKAJA; KULAGINA, 1976). Inicialmente, uma punção da medula é

realizada para obtenção da amostra. Após o processamento deste material por meio de um gradiente de centrifugação, as células com menor densidade são coletadas e plaqueadas em recipientes e meios apropriados. Posteriormente à adesão celular, as células não-aderentes são removidas no momento da troca do meio de cultivo, permanecendo as células de interesse, neste caso as CTM. Estas células apresentam morfologia fibroblastóide alongada, fusiforme, pontiaguda, com núcleo eucromático, oval, grande e central, e com citoplasma abundante (TAGAMI et al., 2003).

Na terapia celular, as células-tronco mesenquimais podem ser transplantadas tanto por infusão local no alvo como por infusão sistêmica. Por meio de infusão local as CTM promovem um reparo no tecido lesado. Já as células infundidas por via endovenosa migram especificamente para o sítio de lesão (BARRY; MURPHY, 2004) e desempenham um papel ativo no reparo tissular (MINGUELL; CONGET; ERICES, 2000). Contudo, a capacidade migratória é diminuída no decorrer de seu cultivo *ex vivo*, o que influencia negativamente o uso terapêutico destas células (BARRY; MURPHY, 2004).

Uma das principais linhas de estudos sobre as CTM é a capacidade imunorregulatória destas células. Estudos pré-clínicos e clínicos evidenciam o efeito imunorregulador destas células em protocolos para controle da doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD – do inglês, *graft-versus-host-disease*); lúpus eritematoso sistêmico; esclerose múltipla e diabetes tipo 1 (FIORINA; VOLTARELLI; ZAVAZAVA, 2011). Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade imunossupressoras das CTM não estarem elucidados por completo, sabe-se que a interação CTM-linfócitos é responsável pelos efeitos imunológicos destas células.

O preparo de amostras para o uso na terapia celular envolve a manipulação humana das células, desde o momento da coleta até a infusão das mesmas no paciente. A obtenção do número adequado de células para a infusão (2×10^6 células/kg de massa corporal do paciente) só é possível após a realização de vários repiques (passagens). Essa manipulação intensa das células é realizada em sistema aberto, o que aumenta o risco de contaminação do produto, mesmo que sejam respeitadas as boas práticas recomendadas para acultura celular.

Um produto celular expandido *ex vivo* deve ter qualidade e segurança para ser transplantado. A contaminação bacteriana é um dos principais riscos associados com transfusão de produtos sanguíneos e causa severas infecções relacionadas ao transplante (RIBAUT et al., 2005). A infusão de um produto celular contaminado pode comprometer a resposta terapêutica, aumentar os custos hospitalares, a comorbidade e mortalidade associadas à terapia empregada. O sistema de hemovigilância francês identificou que entre 1994 e 1998,

22% dos casos fatais pós-transplantes estavam associados com contaminação bacteriana do produto transplantado (ANDREU et al., 2002). Assim, implementar um controle para aumentar a qualidade e segurança no uso das células é fundamental, uma vez que este tipo de tratamento é frequentemente realizado em pacientes debilitados e imunossuprimidos.

1.3 *Mycoplasmas* spp.: contaminantes em culturas celulares

A expansão de células *ex vivo* por um longo período aumenta o risco de contaminações por agentes microbianos que afetam a qualidade e segurança do produto (GUO et al., 2011). Qualquer descuido durante a manipulação pode resultar em contaminação das células (GOLDMAN; SHER; BLAJCHMAN, 2000), isso porque o cultivo é realizado em sistema aberto e os meios de cultura são extremamente ricos em nutrientes. Os microrganismos contaminantes mais frequentemente encontrados são as bactérias e fungos, que em geral, estes apresentam uma elevada taxa de crescimento, o que permite rápida identificação da contaminação. Contudo, a presença de alguns contaminantes, como os *Mycoplasma* spp., passa despercebida devido ao pequeno tamanho, o que dificulta a sua visualização no microscópio óptico e contribui para a não detecção da contaminação. Além disso, o uso contínuo de antibióticos durante o cultivo mantém os microrganismos em níveis basais, estabelecendo contaminações crônicas e cepas resistentes.

1.3.1 Características Gerais dos *Mycoplasma* spp.

O primeiro relato de detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas de células foi apresentado em 1956 por Robinson e colaboradores, quando estes microrganismos ainda eram nomeados como *Pleuropneumonia-likeorganisms* (PPLO). Esses microrganismos são filogeneticamente originários de bactérias Gram-positivas. No entanto, apresentam como característica a perda da parede celular rígida, o que contribui para a ineficácia de antibióticos que atuam sobre esta estrutura ou na sua síntese. Em função dessas diferenças e para que elas pudessem ser agrupadas com os demais procariontes, foi criada a classe *Mollicutes*. O gênero *Mycoplasma* corresponde a um dos quatorze gêneros com maior número de espécies dessa nova classe. No entanto, as nomenclaturas *Mycoplasma* e *Mollicutes* são utilizadas trivialmente como sinônimos.

Os *Mycoplasma* spp. são considerados os menores organismos (0,2 a 0,8 μm de diâmetro) de vida livre, com capacidade de se auto-replicar em meio de cultura, independente de célula.

Apesar de serem de vida livre, a maioria das espécies habita mucosa respiratória e urogenital devido à facilidade para obter nutrientes. Quando presentes, o seu tamanho reduzido e a sua flexibilidade, devido à ausência de parede celular, contribuem respectivamente para a não turvação dos meios de culturas e por passarem através de filtros bacteriológicos (0,45 µm de diâmetro). Envolto somente por uma membrana celular, composta basicamente por colesterol e proteínas, apresenta principalmente morfologia esférica, podendo também ser observadas células em forma de pêra, de filamentos helicoidais e filamentos com diversos tamanhos (RAZIN; YOGEN; NAOT, 1998). A manutenção destas formas na ausência de uma parede celular rígida evidencia a presença de um citoesqueleto (RAZIN, 1978).

Este microrganismo se multiplica por divisão binária, mas sem sincronia entre replicação do genoma e divisão do citoplasma. Isto significa que pode ocorrer replicação do DNA mais rápida do que a divisão citoplasmática, resultando na formação de filamentos multinucleados (RAZIN, 1978). Ao contrário de outras bactérias, os *Mycoplasma* spp. crescem muito lentamente, mesmo sob condições apropriadas. O tempo de geração de uma célula geralmente é de uma a três horas, podendo alcançar até nove horas (DREXLER; UPHOFF, 2002). Isso implica no longo tempo necessário para a realização do teste microbiológico (padrão ouro), no qual o tempo para visualização de colônias em ágar pode chegar até 28 dias (VOLOKHOV; GRAHAM; BRORSON; CHIZHIKOV, 2011).

Assim, um dos principais obstáculos para a pesquisa e o diagnóstico laboratorial de infecções é o cultivo *in vitro* dos *Mycoplasma* spp.. Somente uma minoria das espécies existentes na natureza foi cultivada até o momento. Algumas espécies são de difícil cultivo mesmo nos mais adequados meios disponíveis (RAZIN, 1994). A ausência de genes envolvidos em vias de biossíntese foi demonstrada por Fraser et al. (1995) e Himmelreich et al. (1996) para as espécies *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, o que faz destes microrganismos dependentes de aminoácidos exógenos e explica a dificuldade de cultivo.

Outra característica importante é que estes mollicutes apresentam genoma pequeno (580 kb a 1380 kb), com baixo conteúdo GC, e poucos mecanismos de reparo de DNA, o que possibilita a ocorrência de mutações e variações antigênicas e, conseqüentemente a geração de cepas resistentes a antibióticos. Medvedeva et al. (2014) descreveram em *Acholeplasma laidlawii* o transporte do antibiótico (ciprofloxacina) para fora do núcleo promovido por vesículas extracelular, bem como o surgimento de uma mutação no gene alvo. Além da capacidade de adaptação aos agentes microbianos, os *Mycoplasmas* spp. possuem mecanismos de modulação e evasão a resposta imunológica do hospedeiro, realizam trocas antigênicas com as células parasitadas e invadem as mesmas podendo causar apoptose celular.

Estes microrganismos, os quais são capazes de estabelecer infecções latentes e crônicas, podem se comportar como bactérias oportunistas. *M. fermentans* (BOLSKE, 1988) foi descrito como um co-fator no HIV e *M. pirum*, uma espécie inicialmente detectada apenas em culturas de células, foi isolado de sangue de pacientes com HIV (GRAU; KOVACIC; GRIFFAIS; MONTAGNIER, 1993).

As espécies de *Mycoplasma* spp. estão amplamente distribuídos na natureza como parasitas de humanos, mamíferos, aves, répteis, peixes, artrópodes e plantas (RAZIN, 1992). Os principais habitats nos humanos e animais são as superfícies mucosas do trato respiratório e urogenital, olhos, tubo digestivo, glândulas mamárias e articulações. Geralmente exibem especificidade de tecido e hospedeiro, mas há inúmeros exemplos da presença de *Mycoplasma* spp. em hospedeiros e tecidos diferentes de seus habitats normais (RAZIN, 1992). Apesar de convencionalmente o *M. pneumoniae* ser encontrado preferencialmente no trato respiratório e o *M. genitalium* no trato urogenital, Goulet et al. (1995) isolou *M. pneumoniae* a partir do trato urogenital humano. Além disso, acreditava-se que a localização de *Mycoplasma* spp. em células eucarióticas fosse somente à superfície extracelular aderidos à membrana por citoaderência. Contudo, estudos recentes demonstraram a localização intracelular de algumas espécies (*M. fermentans*, *M. genitalium* e *M. pneumoniae*) não apenas após a fagocitose por granulócitos e monócitos, mas também em células epiteliais não fagocíticas. Lo et al. (1992) descreveram uma nova espécie do gênero *Mycoplasma* (*M. penetrans*), capaz de penetrar em uma variedade de células humanas *in vivo* e *in vitro*. Assim, a localização intracelular, mesmo que por um curto período, sequestra os *Mycoplasma* spp. e pode proteger-los efetivamente das terapias micoplasmicidas.

1.3.2 *Mycoplasma* spp. nas Culturas Celulares

Desde que as ocorrências de contaminações bacterianas e fúngicas foram minimizadas com a introdução de antibióticos nos meios de cultivo de células, o *Mycoplasma* spp. passou a ser o contaminante mais frequentemente detectado em células de mamíferos cultivadas *in vitro* (MIYAKI; PRAL; GALLINA; RIZZO, 1989). A vasta literatura sobre o assunto reflete os graves problemas criados pela persistente contaminação das culturas. Relatórios de vários países mostram que 10 a 87% de culturas de células são infectados por *Mycoplasmas* (BARILE; ROTTEM, 1993; BOLSKE, 1988; MCGARRITY; KOTANI; BUTLER, 1992). Drexler et al. (2002) relataram que de 440 amostras de linhagens celulares de linfoma, apenas 64% foram identificadas como negativas para a presença de *Mycoplasma*. As espécies mais

frequentes permaneceram essencialmente as mesmas ao longo dos anos, com destaque para *M. hyorhinae*, *M. orale*, *M. arginini*, e *A. laidlawii*. Culturas de células primárias e com poucas passagens têm sido descritas com menor incidência de contaminação quando comparadas com linhagens e células com mais passagens. Uma célula de *Mycoplasma* spp. em uma cultura infectada pode produzir 10^6 unidades formadoras de colônia por mL em três a cinco dias. Uma cultura infectada apresenta em média de 10^6 a 10^8 organismos por mL. Assim, é estimado que haja de 100 a 1000 *Mycoplasmas* aderidos em cada célula de uma cultura infectada (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Diversas podem ser as fontes de origem das contaminações em células de cultura. Aparentemente, os tecidos usados para iniciar a cultura celular não representam a principal fonte de contaminação, uma vez que a frequência de contaminação em culturas de células primárias descrita na literatura é de 1% (BARILE; ROTTEM, 1993; MCGARRITY; VANAMAN; SARAMA, 1985). Há algumas décadas, a principal fonte desse tipo de contaminação era o soro fetal bovino (25-40% dos lotes de soro contaminados) utilizado (BARILE; ROTTEM, 1993). Esta contaminação diminuiu significativamente nos últimos anos devido aos esforços dos fabricantes em relação à prevenção e ao controle de qualidade (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Como a maior porcentagem dos *Mycoplasma* spp. encontrados em cultura celular é de origem humana e as espécies são sempre as mesmas, supõe-se que a principal fonte de contaminação seja o próprio homem (MCGARRITY; KOTANI; BUTLER, 1992), uma vez que espécies não patogênicas (para pessoas imunocompetentes) fazem parte da flora microbiana humana. Além disso, linhagens celulares contaminadas por *Mycoplasma* spp. são importantes fontes de difusão da contaminação, uma vez que aerossóis são formados com facilidade durante a manipulação das células; que há uma alta concentração de *Mycoplasma* spp. em culturas contaminadas e que os mesmos apresentam sobrevivência prolongada mesmo em superfícies secas (DREXLER; UPHOFF, 2002).

A contaminação por *Mycoplasma* spp. pode ter inúmeros efeitos sobre as células contaminadas. Diferenças qualitativas e quantitativas em um mesmo parâmetro podem ocorrer dependendo da espécie infectante, das condições de cultura, do tipo de célula infectada, da intensidade e da duração da infecção. Alguns dos mais importantes efeitos que uma contaminação por *Mycoplasma* spp. pode causar nas células são: alteração na composição celular (antígeno de superfície e expressão do receptor); alteração nos níveis de proteínas, RNA e síntese de DNA; alteração da morfologia celular; alteração do metabolismo celular; indução de aberrações cromossômicas (alterações numéricas e estruturais); indução ou

supressão de expressão de citocinas; aumento ou redução de propagação de vírus; indução ou inibição de ativação de linfócitos; influência sobre o sinal de transdução; interferência com ensaios bioquímicos e biológicos; promoção de transformação celular; alteração das características de proliferação (viabilidade, crescimento) e total degeneração da cultura (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Desde que a contaminação por *Mycoplasma* spp. em culturas de células foi relatada pela primeira vez, teve início uma busca por métodos para eliminar este agente contaminante. Para evitar problemas futuros de disseminação da contaminação, as culturas comprometidas devem preferencialmente ser descartadas e autoclavadas (HAY; MACY; CHEN, 1989). Dessa forma, a tentativa de recuperar o material por meio da eliminação da contaminação deve ser realizada como um último recurso, nos casos específicos em que os riscos do método justifiquem o benefício da técnica empregada.

O uso de antibióticos em se firmado como o principal método para esse fim. No entanto, a falta de parede celular e a incapacidade de sintetizar peptidoglicanos apresentados pelos *Mycoplasmas* spp. parecem ser fatores fundamentais para a pouca efetividade desse tipo de tratamento, já que estão relacionados com a baixa sensibilidade desses microrganismos aos produtos disponíveis no mercado. Aqueles medicamentos que se mostram eficazes na erradicação do contaminante, geralmente precisam ser utilizados em altas concentrações, essa condição traz efeitos prejudiciais sobre as células e pode gerar cepas resistentes. Além disso, alguns antibióticos apenas inibem o seu crescimento, mas não o eliminam, mascarando a sua presença. Assim, as condições do tratamento antimicoplasma disponíveis na atualidade tem se mostrado estressantes para as células, que podem deixar de apresentar as propriedades desejadas (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Como em qualquer tipo de contaminação, seja em humanos ou culturas celulares, a prevenção é a medida que deve ser priorizada. As boas práticas de culturas de células devem ser estabelecidas por meio de *facility* (infra-estrutura adequada), procedimento operacional (testes de rotina para contaminação microbiana) e operador capacitado. A obtenção de células cultivadas livres de *Mycoplasma* spp. é relevante para as pesquisas experimentais, mas tem importância primordial na obtenção de células funcionais e seguras para o uso em terapias celulares.

1.4 Métodos de Detecção para *Mycoplasma* spp.

Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido desenvolvidas a fim de identificar a presença de *Mycoplasma* spp. nas culturas celulares. A maioria dos métodos demanda tempo

relativamente longo, envolve avaliações subjetivas e usa medidas complexas (DREXLER; UPHOFF, 2002). Os métodos de detecção são divididos em direto e indireto (VOLOKHOV et al., 2011). Enquanto o método direto consiste na detecção do microrganismo, a detecção indireta inclui procedimentos que medem um produto de um gene associado ao *Mycoplasma* spp.. Um método de detecção ideal deve ser sensível (detecção de verdadeiros positivos), específico (detecção de verdadeiros negativos), preciso, com valor preditivo alto (probabilidade de resultado correto), reprodutível, além de simples, rápido, eficiente e com custo-benefício viável. Há vários métodos de detecção utilizados, porém os mesmos apresentam baixa sensibilidade, detecção de um número restrito de espécies, são de difícil interpretação, apresentam técnicas longas além do alto custo. Na tabela 1, encontram-se os principais métodos de detecção utilizados com suas respectivas sensibilidades e as principais vantagens e desvantagens de cada método.

Tabela 1 – Principais métodos utilizados para detecção de *Mycoplasma* spp..

MÉTODO	SENSIBILIDADE	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Coloração Direta do DNA	Baixa	Rápido, Barato	Pode ser de difícil interpretação.
Coloração Indireta do DNA	Alta	Fácil de interpretar por causa da amplificação do contaminante.	Indireta, por isso mais demorada.
Cultura Microbiológica	Alta	Sensível	Demorado (28 dias) e requer interpretação especializada.
PCR	Alta	Rápido	Requer otimização.
Nested PCR	Alta	Rápido	Mais sensível que PCR, porém com mais resultado falso-positivo.
ELISA	Moderada	Rápido	Detecção limitada das espécies.
Autoradiografia	Moderada	Rápido	Pode ser difícil interpretar quando há baixo nível de contaminantes.
Marcação Imunológica	Moderada	Rápido	Pode ser difícil interpretar quando há baixo nível de contaminantes.

Abreviaturas: PCR: reação em cadeia da polimerase, ELISA: ensaio imunoenzimático.
Adaptado de Young et al. (2010).

Dentre os métodos indiretos, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*, PCR) que consiste na detecção de produtos de DNA (*amplicons*) obtidos após a reação de amplificação; os testes imunológicos (sorológicos) e os testes bioquímicos. Entretanto, os testes imunológicos são destinados ao diagnóstico da infecção em humanos e animais e, portanto, possuem aplicação limitada na detecção em cultura celular devido à falta de anticorpos comerciais capazes de reconhecer diferentes espécies. Já os testes bioquímicos (*MycoAlert*[®]), que avaliam a atividade de enzimas específicas de *Mycoplasma* spp., não identificam a espécie do agente contaminante. Além disso, a enzima-alvo deve estar presente em quantidades significativas e ter meia-vida longa para uma sensibilidade adequada (UPHOFF; GIGNAC; DREXLER, 1992).

1.5 Teste Molecular para *Mycoplasma* spp.

Os testes moleculares têm-se mostrado como uma ferramenta poderosa para a detecção de agentes infecciosos, principalmente aqueles de difícil cultivo. Com a expansão do uso desta metodologia pelos laboratórios clínicos, surgiu a necessidade de incluir ensaios qualitativos e quantitativos para verificar e validar o método, o que gerou a aprovação de alguns testes moleculares pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Um dos principais objetivos das agências regulatórias é garantir a precisão, confiabilidade e adequação dos resultados produzidos pelos testes diagnósticos. Para isto, estas agências definem os padrões mínimos que os testes clínicos devem desempenhar (BURD, 2010).

O processo de desenvolvimento de um teste molecular para uso em diagnóstico é complexo e envolve vários níveis de avaliação e validação. Estes níveis incluem a validação analítica, validação clínica, a utilidade clínica e as implicações éticas, legais e sociais do teste. Em geral, a implementação de um novo teste diagnóstico, possui duas fases: a de desenvolvimento e a laboratorial. A fase de desenvolvimento envolve a avaliação da utilização do diagnóstico e a técnica do processo, assegurando que as medidas obtidas sejam relevantes para fins de diagnóstico. A fase laboratorial visa determinar se o desempenho do ensaio (sensibilidade analítica, sensibilidade diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez) satisfaz os padrões necessários para um diagnóstico correto (MATTOCKS et al., 2010).

1.5.1 Gene alvo 16S rDNA e desenho de *primers*

Os genomas das espécies de *Mycoplasma* spp. são relativamente pequenos, variando de 580 kilobases (kb) (*M. genitalium*) a 1380 kb (*M. mycoides subsp. Mycoides*). As espécies de *Acholeplasma* spp. e *Spiroplasma* spp. possuem genomas de tamanhos maiores junto à classe *Mollicutes*, assim os outros gêneros por um processo evolutivo degenerativo e com perdas significativas de sequências genômicas possuem um genoma menor. Estes microrganismos apresentam como característica um baixo conteúdo de guanina e citosina (GC) com distribuição desigual ao longo do genoma. Esta variação em regiões codificantes do genoma tem relevância filogenética, uma vez que indica a natureza altamente conservada dos genes que codificam para os RNA ribossomal e transportador (WOESE, 1987).

A determinação da sequência do gene 16S rDNA forneceu as bases para uma análise filogenética sistemática de mollicutes (WEISBURG et al., 1989) e fez deste gene o marcador genético padrão ouro para taxonomia bacteriana. Alinhamentos computacionais revelaram a combinação de regiões altamente conservadas entre todas as bactérias, com regiões variáveis que permitem a diferenciação em níveis de espécies e gêneros (GRAY; SANKOFF; CEDERGREN, 1984). Os mollicutes apresentam de uma a duas cópias do gene 16S rDNA por genoma, o que faz deste um alvo de interesse para o desenvolvimento de testes moleculares. Contudo, o uso do gene 16S rDNA como alvo para detecção de espécies de *Mycoplasmas* spp. tem limitações. Os gêneros de bactérias muito próximos filogeneticamente das espécies de *Mycoplasma* spp., como por exemplo, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, podem ser detectados por *primers* desenvolvidos para espécies de *Mycoplasma* spp.. Diante disto, a Farmacopéia Européia preconiza que métodos de amplificação de ácidos nucleicos (do inglês, *Nucleic Acid Testing-NAT*) devem ser validados quanto à especificidade e que, se observado um comprometimento deste parâmetro, uma estratégia apropriada deve ser delineada para os resultados positivos.

A estratégia de desenho de *primers* e sondas para detecção de *Mycoplasma* spp. é efetuada utilizando programas específicos para desenho dos *primers*/sondas, banco de dados e sequências de genes alvo publicados para detecção de *Mycoplasma* spp.. Deve ser considerado para os ensaios NAT, o tamanho do produto amplificado, o tamanho dos *primers*, o conteúdo de G-C nos *primers* e o potencial de formação de dímeros de *primers*. Ainda, por meio de banco de dados, é possível verificar *in silico* o potencial de hibridação dos *primers* e sondas com as sequências de ácidos nucleicos de espécies de *Mycoplasma* spp. ou outras bactérias. O teste molecular deve ser avaliado quanto à eficiência dos *primers* selecionados e

deve-se assegurar a amplificação do material genético alvo. Isto feito, é necessário validar o método por meio da verificação de sua especificidade, sensibilidade, precisão e robustez.

1.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A identificação da replicação de *Mycoplasma* spp. e a formação de colônias são os métodos mais tradicionalmente utilizados para detecção destes microrganismos. Métodos alternativos ao teste microbiológico são baseados na detecção de elementos estruturais, como por exemplo, o DNA e o RNA. Dentre esses métodos, a amplificação de ácidos nucleicos (NAT) emprega a PCR convencional (*end-point*) e a PCR em tempo real. Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a PCR consiste em amplificar enzimaticamente *in vitro* uma região específica do DNA, no caso de *Mycoplasma* spp. a região do gene 16S rDNA. A localização da sequência alvo se dá pelos iniciadores (*primers*), oligonucleotídeos com 20-24 bases nitrogenadas, que interagem seletivamente com a fita molde do DNA por complementaridade entre bases (A-T; C-G). Nesta técnica, ocorre um aumento exponencial no número de fragmentos amplificados, uma vez que cada nova fita de DNA gerada serve como molde para a síntese de uma nova fita.

A PCR possui como etapas de amplificação do material genético a linha basal, na qual a quantidade de produto amplificado é insuficiente para detecção; a fase log, na qual a quantidade de produto dobra a cada ciclo; e a fase platô, na qual não ocorre mais o aumento no número de produtos devido ao esgotamento dos reagentes. A PCR convencional (*end-point*) é um método qualitativo, que consiste em separar o produto amplificado em gel por eletroforese e evidenciá-lo em luz ultravioleta por meio de corante fluorescente. Por sua vez, a PCR em tempo real é um método qualitativo e quantitativo, que pode ser realizada por meio de dois métodos básicos que são a detecção não específica, por meio de intercalantes fluorescentes de DNA dupla fita, ou por meio de sondas altamente específicas à sequência alvo. O ciclo de amplificação (do inglês, *threshold cycle*, Ct) no qual o sinal fluorescente é detectado pela primeira vez, é inversamente proporcional ao número de cópias (logaritmo) de ácidos nucleicos do alvo, isto é, quanto menor o Ct maior a concentração do alvo na amostra.

A PCR em tempo real apresenta como vantagens uma reação que ocorre em um só passo, o que evita processos pós-PCR, reduzindo a possibilidade de contaminação; é um método quantitativo, uma vez que é possível realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo; é mais rápido, mais sensível e permite adequar a especificidade do teste.

1.5.3 Validação da Metodologia

O processo de validação de um método diagnóstico engloba a verificação de parâmetros analíticos para demonstrar que o mesmo atende, por meio de seu desempenho, os requisitos necessários para seu uso. O método NAT para detecção de *Mycoplasma* spp. é considerado como um teste de limite para impurezas, uma vez que visa determinar a presença ou ausência do microrganismo (contaminante) em uma determinada amostra.

Os principais parâmetros requeridos para a validação de um teste limite são limite de detecção e especificidade. A robustez, a precisão e o potencial de arraste são descrições complementares na validade do método.

A especificidade é a capacidade que um ensaio possui em diferenciar analitos intimamente relacionados. Para a PCR, isto pode ser realizado mostrando que os *primers* e sondas amplificam a sequência alvo, mas falham na amplificação de moldes muito semelhantes. O parâmetro especificidade engloba a especificidade analítica e a diagnóstica. A especificidade analítica é a capacidade do teste em identificar exclusivamente uma determinada substância alvo, sem que ocorra reação cruzada e conseqüentemente sem resultados falso-positivos. A especificidade diagnóstica avalia a capacidade do teste de detectar como negativo uma amostra verdadeiramente negativa.

Por sua vez, a capacidade do teste de detectar a menor concentração de uma dada substância em uma amostra biológica é caracterizada como sensibilidade analítica. É por meio deste parâmetro que o limite de detecção é definido. Deste modo, a sensibilidade diagnóstica é a capacidade do teste de detectar como positivo uma amostra verdadeiramente positiva.

Complementar a estes parâmetros, a precisão de um teste mensura a habilidade do método em oferecer resultados consistentes de uma amostra quando realizados sob as mesmas condições em sucessivas repetições. Este parâmetro deve ser avaliado por meio de intra-ensaio (repetibilidade) e de inter-ensaio. No intra-ensaio, uma determinada amostra deve ser avaliada repetidamente, exatamente sob as mesmas condições, em um único momento (mesma “corrida”). Para o inter-ensaio, a mesma amostra deve ser avaliada novamente sob as mesmas condições, porém em as repetições devem ocorrer em momentos diferentes (corridas diferentes). Diferentemente, a robustez avalia o quanto pequenas variações na realização de um procedimento analítico pode interferir nos resultados de um teste. Para tal, uma determinada amostra deve ser avaliada repetidas vezes, em momentos diferentes e sob condições diferentes, dentre as quais estão os equipamentos utilizados, lotes de reagentes e operadores. Assim, a utilidade da validação do método não se restringe em atender as

exigências dos órgãos regulamentares. A determinação dos parâmetros é uma ferramenta auxiliar que indica os ajustes necessários a serem realizados nos novos testes moleculares desenvolvidos.

1.5.4 Justificativa do Estudo

A detecção de *Mycoplasma* spp. pode ser considerada um dos pontos críticos do processo de garantia da qualidade das células destinadas à infusão em pacientes, uma vez que estes microrganismos são dificilmente isolados em cultura, bem como identificados por microscopia óptica. Não há teste rápido e de baixo custo para sua detecção. O cultivo em ágar (teste padrão ouro) pode durar até 28 dias, tempo este que representa um risco para as outras culturas. A contaminação por *Mycoplasma* spp. pode gerar alterações estruturais e funcionais nas células que serão utilizadas tanto em terapias quanto em ensaios experimentais. Essas alterações comprometem principalmente as células destinadas à infusão em pacientes. O preparo do doador e paciente, o procedimento desconfortável de coleta (na maioria das vezes por punção da medula óssea) e o processo de expansão e cultivo das mesmas, migram para um segundo plano diante da possibilidade de gerar uma infecção por *Mycoplasma* spp. em um paciente imunossuprimido.

Para infusão em pacientes submetidos à terapia celular, as células-tronco expandidas *in vitro*, devem passar pelas etapas de avaliação por diferentes metodologias analíticas para garantir a segurança, pureza, potência, eficácia e estabilidade das células. Devido ao baixo tempo de prateleira (*shelf-life*), estas células devem ser infundidas o mais breve possível após o término do processo de expansão. Para tal, as metodologias analíticas para controle de qualidade dessas células, dentre as quais se inclui a detecção de *Mycoplasmas* spp., devem ser de simples execução, gerar resultados rápidos e possuir custo efetivo.

Em 14 de Março de 2011, foi publicada a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular (CTC) de células humanas (células somáticas e germinativas; células-tronco adultas, embrionárias e pluripotentes induzidas) e seus derivados para fins de pesquisa clínica e terapia. De acordo com o artigo 60 desta resolução, “antes de liberar as células humanas e seus derivados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia, seja para uso autólogo ou alogênico, cultivadas ou não, a fresco ou criopreservadas, com ou sem manipulação extensa, o CTC deve garantir sua segurança e qualidade”. Para que esta situação seja uma realidade nos centros de terapia celular brasileiros, faz-se necessário o uso de métodos de detecção disponíveis.

Entretanto, um dos fatores limitantes para adoção de metodologias já existentes é o alto custo da análise adicionado ao tempo necessário para importação dos kits comerciais. O preço médio por amostra dos kits comerciais baseados tanto na detecção enzimática quanto na molecular situa-se na faixa de R\$20,00 a R\$40,00/amostra. Uma vez que a recomendação das agências regulatórias é efetuar a detecção de *Mycoplasma* spp. a cada passagem ou troca de meio realizada, o custo desta análise utilizando os kits comerciais se torna inviável economicamente.

Assim, o desenvolvimento de um método diagnóstico para *Mycoplasma* spp. que seja rápido, mais sensível, específico, reprodutível e com custo reduzido é essencial para a atual realidade dos CTC. Este trabalho visa ao desenvolvimento de um teste molecular para detecção de espécies da classe *Mollicutes* de importância no controle de qualidade das culturas celulares. Essa estratégia permitirá a adoção de normas de qualidade na produção de células para fins de pesquisa e terapêuticos, somado a disponibilização de um insumo desenvolvido com tecnologia nacional. Além destes aspectos, os produtos biológicos serão fornecidos com adequada segurança e qualidade terapêutica para a comunidade.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A PCR convencional e a PCR em tempo real *in house* com o conjunto de *primer* selecionado detecta, *in silico*, as 18 espécies proposta neste trabalho.
- Foi construído o controle positivo plasmidial que possui 100% de identidade com a sequência de referência (*Acholeplasma laidlawii*).
- O sobrenadante das culturas celulares foi estabelecido como amostra desta plataforma.
- Os parâmetros de validação obtidos foram satisfatórios, com exceção da especificidade analítica, que evidenciou amplificação cruzada e consequentemente, resultados falso-positivos.
- A PCR em tempo real *in house* foi mais sensível do que o teste comercial *MycoAlert*® *Mycoplasma Detection Kit* (Lonza).
- As imagens da microscopia eletrônica de varredura deram suporte para os resultados obtidos pela PCR em tempo real *in house*.
- A análise filogenética permitiu identificar as espécies detectadas como *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini* e *Mycoplasma hyorhinis*.
- Foi proposto o algoritmo para aplicação da plataforma molecular na rotina dos laboratórios de cultura celulares.

_____ ***Referências Bibliográficas***

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU, G.; MOREL, P.; FORESTIER, F.; DEBEIR, J.; REBIBO, D.; JANVIER, G.; HERVÉ, P. Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. **Transfusion**, v. 42, p. 1356-1364, Oct. 2002.

ARATHOON, W. R.; BIRCH, J. R. Large-scale cell culture in biotechnology, *Science*. v. 232, p. 1390-1395, 1986.

BACZYNSKA, A.; SVENSTRUP, H. F.; FEDDER, J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 4-35, Sep. 2004.

BARILE, M. F.; ROTTEM, S. Mycoplasmas in cell culture. In: KAHANE, I.; ADONI, A. **Rapid diagnosis of mycoplasmas**. New York: Plenum Press, 1993. p. 155-189.

BOLSKE, G. Survey of mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. **Zentbl. Bakteriол. Mikrobiол. Hyg. Ser.**, v. 269, p. 331-340, Nov. 1988.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 4, p. 568-584, Apr. 2004.

BELL, C. A.; UHL, J. R.; HADFIELD, T. L.; DAVID, J. C.; MEYER, R. F.; SMITH, T. F.; COCKERILL, F. R. Detection of *Bacillus anthracis* DNA by Light Cycler PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2897-2902, 2002.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 550-576, Jul. 2010.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends Mol. Med.**, v. 7, n. 6, p. 259-264, Jun. 2001.

DABRAZHYNESKAYA, A.; FURTAK, V.; VOLOKHOV, D.; BECK, B.; CHIZHIKOV, V. Preparation of reference stocks suitable for evaluation of alternative NAT-based mycoplasma detection methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 100-108, Sep. 2013.

DEUTSCHMANN, S. M.; KAVERMANN, H.; KNACK, Y. Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia. **Biologicals**, v. 38, p. 238-248, Mar. 2010.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C.; DIRKS, W.G.; MACLEOD, R. A. F. Mix-ups and mycoplasma: The enemies within. **Leukemia Res.**, v. 26, p. 329–333, Apr. 2002.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology.**, v. 39, p. 75-90, Aug. 2002.

DUSSURGET, O.; ROULLAND-DUSSOIX, D. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 953–954, Mar. 1994.

FIORINA, P.; VOLTARELLI, J.; ZAVAZAVA, N. Immunological Applications of Stem Cells in Type 1 Diabetes. **Endocr. Rev.**, v. 32, n. 6, p. 725-754, Dec. 2011.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D. et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, p. 397–403, 1995.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp. Hematol.**, v. 4, n. 5, p. 267-274, Sep. 1976.

GARNER, C. M.; HUBBOLD, L. M.; CHAKRABORTI, P. R. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. **Br J Biomed Sci.** v. 57, p. 295–301, 2000.

GOLDMAN, M.; SHER, G.; BLAJCHMAN, M. Bacterial contamination of cellular blood products: the Canadian perspective. **Transfusion**, v. 23, p. 17-19, 2000.

GOULET, M.; Dular, R; Tully, J. G; Billowes, G; Kasatiya, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2823–2825, Nov. 1995.

GRAU, O.; KOVACIC, R.; GRIFFAIS, R.; MONTAGNIER, L. Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma pirum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 106, p. 327–334, Feb. 1993.

GRAY, M. W.; SANKOFF, D.; CEDERGREN, R. J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, p. 5837-5852, Jul. 1984.

GUO, C. J.; GAO, Y.; HOU, D.; SHI, D. Y.; TONG, X.M.; SHEN, D.; XI, Y. M.; WANG, J. F. Preclinical transplantation and safety of HS/PCs expanded from human umbilical cord blood. **World J Stem Cells**; v. 3, p. 43–52, 2011.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H.; NOZAWA, K.; NAKAGAWA T.; ASADA, K.; KATO, I. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer regions. **Res. Microbiol.**, v. 144, p. 489–493, Jul-Aug 1993.

HARDEGGER, D.; NADAL, D.; BOSSART, W.; ALTWEGG, M.; DUTLY, F. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods**, v. 41, p. 45–51, Jun. 2000.

HAY, R. J.; MACY, M. L.; CHEN, T. R. Mycoplasma infection of cultured cells. **Nature**, v. 339 (6224), p. 487–488, Jun. 1989.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B. C.; HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4420–4449, 1996.

HU, M.; BUCK, C.; JACOBS, D.; PAULINO, G.; KHOURI, H. Application of PCR for detection and identification of mycoplasma contamination in virus stocks. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 31A, p. 710–715, Jan. 1995.

ISHIKAWA, Y.; KOZAKAI, T.; MORITA, H.; SAIDA, K.; OKA, S.; MASUO, Y. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using Sybr Green-based real-time polymerase chain reaction. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 42, p. 63–69, Mar. 2006.

JAUREGUI, L. H.; HIGGINS, J.; ZARLENGA, D.; DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K. Development of real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2065–2071, Jun. 2001.

LE BLANC, K.; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy**, v. 7, n. 1, p. 36–45, Mar. 2005.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; WEAR, D. J.; NEWTON, P. B.; TULLY, J. G.; SHIH, J. W. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. **Mod. Pathol.**, v. 6, p. 276–280, May. 1993.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; TULLY, J. G.; WANG, R. Y. H.; KOTANI, H.; PIERCE, P. S.; ROSE, D. L.; SHIH, J. W. K. *Mycoplasma penetrans* sp. Nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. **Int J Sys Bact.**, v. 42, p. 357–364, Jul. 1992.

LO, S. C. Mycoplasmas in AIDS. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 525–545.

MATTOCKS, C. J.; MORRIS, M. A.; MATTHIJS, G.; SWINNEN, E.; CORVELEYN, A.; DEQUEKER, E. et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. **Nature**, v. 12, p. 1276-1288, Jul. 2010.

MCGARRITY, G. J.; KOTANI, H.; BUTLER, G. H. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 445–454.

MCGARRITY, G. J.; VANAMAN, V.; SARAMA, J. Cell culture techniques. **Am Soc Microbiol News**, v. 51, p. 170–183, 1985.

MEDVEDEVA, E. S.; BARANOVA, N. B.; MOUZYKANTOV, A. A.; GRIGORIEVA, T. Y.; DAVYDOVA, M. N.; TRUSHIN, M. V. et al. Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target. **Scientific World Journal**, Jan. 2014.

MILLER, G. G.; RAKOVSKAIA, I. V.; POKIDYSHEVA, L. N.; KORABLINA, E. V.; TITOVA, I. V. Mechanism of interaction between HIV and *Mycoplasma arginini* in vitro. **Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.** v. 4, p. 49-53, Jul.-Aug. 2009.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 8, p. 881-887, Aug. 2000.

MIYAKI, C.; PRAL, M. M.; GALLINA, N. M. F.; RIZZO, E. *Mycoplasma* como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. **Rev. Saúde públ.**, v. 23 (1), p. 39-44, 1989.

PEACOCK, S. Health Care: Bring microbial sequencing to hospitals. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 557-559, May 2014.

PEREDELTCOUK, M.; DAVID, S. A. W.; BHATTACHARYA, B.; VOLOKHOV, D. V.; CHIZHIKOV, V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 54-60, Aug. 2010.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr. 1999.

RAZIN, S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. **Mol. Cell. Probes.**, v. 8, p. 497–511, 1994.

RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 3–22.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 42, p. 414–470, 1978.

RAWADI, G.; DUSSURGET, O. Advances in PCR-based detection of micoplasmas contaminating cell cultures. **PCR Methods Appl.**, v. 4, p. 199–208, Feb. 1995.

Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9: BRASIL. Resolução nº 9, de 14 de Março de 2011. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Cap. III, Seção XIII, Art. 60.

RIBAUT, S.; FAUCON, A.; GRAVE, L.; NANNINI, P.; FAURE, I. B. Detection of bacteria in red blood cell concentrates by the Scansystem method. **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 2251-2255, May. 2005.

ROBINSON, L. B.; WICHELHAUSEN, R. H.; ROIZMAN, B. Contamination of Human Cell Cultures by Pleuropneumonia-like Organisms. **Science**. v. 124, p. 1147-1148 (1956).

SHCHEBLYAKOV, D. V.; DIU, L.; ZUBKOVA, O. V.; SHMAROV, M. M.; RAKOVSKAIA, I. V.; NARODITSKIĬ, B. S.; GINTSBURG, A. L.; GUDKOV, A. V. Mycoplasma M. arginini infection induces constitutive activation of NF-KappaB and inhibits apoptosis in cells expressing toll-like receptors TLR2/6. **Mol Gen Mikrobiol Virusol**. v. 4, p. 6-10, 2008.

SHIMIZU, T.; ARAI, S.; IMAI, H.; OISHI, T.; HIRAMA, M.; KOITO, A.; KIDA, Y.; KUWANO, K. Glycoglycerolipid from the membranes of *Acholeplasma laidlawii* binds to human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) and accelerates its entry into cells. **Curr Microbiol**. v. 48, p. 182, 2004.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M. et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 1, p. 31-40, Apr. 2003.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2766–2774, Jun. 2001.

TANG, J.; HU, M.; LEE, S.; ROBLIN, R. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. **J. Microbiol. Methods.**, v. 39, p. 121–126, Jan. 2000.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 38A, p. 79–85, Feb. 2002.

UPHOFF, C. C.; GIGNAC, S. M.; DREXLER, H. G. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. **J Immunol Methods**, v. 149, p. 43-53, Apr. 1992.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; JOHANSSON, K. E.; GALAMA, J. M. D.; KISSING, J.; BÖLSKE, G.; VAN DER LOGT, J. T. M.; MELCHERS, W. J. G. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 149–152, Jan. 1994.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.**, v. 12, n. 11, p. 502-508, Nov. 2002.

VOLOKHOV, D.V.; GRAHAM, L. J.; BRORSON, K.A.; CHIZHIKOV, V.E. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. **Mol Cell Probes**, v. 25 (2-3), p. 69-77, 2011.

WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, H.; YANG, D. et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 6455-6467, Dec. 1989.

WIRTH, M.; BERTHOLD, E.; GRASHOFF, M.; PFUTZNER, H.; SCHUBERT, U.; HAUSER, H. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. **Cytotechnology.**, v. 16, p. 67–77, 1994.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 221–271, 1987.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C., Jr. Adult stem cells. **Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.**, v. 276, n. 1, p. 75-102, Jan. 2004.

YOUNG, L.; SUNG, J.; STACEY, G.; MASTERS, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nature Protocols**, v. 5, p. 929-934, May. 2010.