

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

Efeito do micoplasma e do agente removedor de micoplasma
(MRA) sobre a medida da atividade de hidrolases
lisossômicas, em culturas de fibroblastos humanos

Tese de Doutorado

Fernanda Timm Seabra Souza

Porto Alegre, 2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

Efeito do micoplasma e do agente removedor de micoplasma
(MRA) sobre a medida da atividade de hidrolases
lisossômicas, em culturas de fibroblastos humanos

Fernanda Timm Seabra Souza

Orientadora: Prof^a Janice Carneiro Coelho

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande
do Sul – como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Bioquímica.

Dedicatória

Ao meu grande amor Ewerton

AGRADECIMENTOS

À Janice que durante todos estes anos foi mais que uma orientadora e esteve presente em todos os meus bons e maus momentos sempre com uma palavra de esperança e incentivo.

À Rejane que compartilhou comigo mais que a sua sala, mas principalmente sua amizade e seus ensinamentos. Que sempre se disponibilizou a me auxiliar em muitas das minhas dúvidas. A ti amiga, vai além do agradecimento, vai a minha admiração.

Às minhas bolsistas (filhas do coração) Roberta, Luana e Karen, porque sem elas eu não teria desenvolvido esta tese.

À Carla que muito contribuiu nesta etapa final com grande dedicação.

À Roberta que trilhou outros caminhos, a minha saudade e a certeza de que brilharás muito na vida por este teu espírito de equipe e senso de responsabilidade.

À Luana que chegou de mansinho e tomou conta de seu espaço, todo o meu respeito pela profissional competente, interessada e esforçada.

À Karen que dentro de toda a sua quietude sempre contribuiu para o andamento de minha tese e de todos os nossos projetos.

Ao Alexandre, por eu admirar todo o seu esforço, meu muito obrigado pelo incentivo.

Ao nosso grupo da cultura que juntos tornamos a vida mais alegre e mais prazerosa. A nuvem, uma hora se dissipa!

À Kristiane que sempre me auxiliou e sempre teve uma palavra de carinho. Toda a minha admiração pela sua competência e perseverança e por ter-me dado à honra de ser madrinha de nosso querido Henrique.

A todo o pessoal do Laboratório dos Erros Inatos, que sempre me acolheram com muito carinho e possibilitaram que nós da cultura, fôssemos uma extensão de sua família.

Ao Juarez por toda a sua alegria, praticidade e espírito de equipe.

À Marilda por todo o suporte técnico, agradeço a colaboração.

À Jurema e Marli pelo auxílio nas dosagens, meu especial agradecimento.

Ao colega Sharbel que cedeu o microscópio de fluorescência da Citogenética para as inúmeras observações

À Maria Burin por ter cedido o espaço do Laboratório de Erros hatos, contribuindo para o fechamento deste trabalho.

Ao Dr. Roberto Giugliani por acreditar em meu trabalho, toda a minha admiração.

Ao pessoal da secretaria, limpeza e demais setores do Serviço de Genética Médica o meu obrigado pela excelente convivência.

Às queridas colegas Norminha e Lúcia pelo eterno incentivo e compreensão.

Às queridas colegas de escola técnica (Shirlei, Angela e Rose) e Aninha, pelo prazeroso convívio.

À professora Maria Aparecida Couto pela sua compreensão e por acreditar em meu trabalho.

Ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica, por oportunizar-me o crescimento profissional.

A todos que colaboraram com a realização desta tese de doutorado.

Quero agradecer em especial aos meus familiares e meus amigos porque sempre, de uma maneira ou outra, trilharam comigo caminhos tão importantes como este que estou vivendo.

A minha mãe por todo o seu esforço de continuar conosco e pelo enorme amor que sinto. Espero que Deus permita que estejas comigo por muito tempo.

A minha irmã que é uma grande guerreira e que sempre fez da vida uma eterna alegria, que dribla de maneira espetacular seus obstáculos, e não se abate, e tem sempre uma boa piada para esta vida-bandida, toda a minha admiração.

Aos meus amigos, compadres, comadres que fazem da nossa “velha” convivência uma enorme alegria. Saudades!

A minha sogra Maria Elena e meu sogro Odacir, por estarem presentes em todas as nossas horas e por terem cuidado de meus filhos com tanto carinho para que eu pudesse trabalhar mais intensamente nesta etapa final, todo o meu agradecimento.

E finalmente para aqueles que deram um sentido maior para minha vida, que são o meu sul e o meu norte (Ewerton, Mariana e Eduardo).

Ao meu marido Ewerton que já percorreu boa parte de sua vida comigo, só tenho a agradecer o carinho, o respeito, a cumplicidade e o verdadeiro amor.

A minha filha Mariana que é meu mar (não mais de azeite), mas ainda tão bela quando ele, o meu imenso amor.

Ao meu filho Eduardo que é meu grande amor e minha fonte de perseverança, que me ensina a cada dia que ser diferente nos torna pessoas especiais, mais felizes, mais sinceras e mais amadas. Querido filho, ainda levantarei muitas e muitas vezes para te aplaudir e dizer a todos que, com muito orgulho, sou tua mãe!

Ao meu querido Lair (meu pai emprestado) que tornou minha vida tão mais doce durante 32 anos de convivência, que sempre me aceitou e me amou como eu sou sem nada me cobrar, que sempre foi compreensivo, afetuoso, alegre e brincalhão. Quisera eu que ele estivesse comigo nesta hora tão importante, mas infelizmente ele nos deixou no finalzinho do segundo tempo. Enfim, a vida é assim mesmo e sei que de onde ele estiver estará torcendo por todos nós. Para ti Lair, todo o meu grande e eterno amor!

EPÍGRAFE

Para meu querido Lair

*Que enigma esta amizade
Fostes pai? Fostes amigo?
Sei lá! Não sei decifrar!
Só sei que estando contigo
Tudo foi bom de compartilhar*

*Nossas Idéias, gostos, manias.
Eram todas parecidas
Tua renúncia, afeto, respeito.
Ajudaram a lapidar meus defeitos*

*Estivesses presente em todas as minhas horas
Sendo elas boas ou não
Sempre tinhas teus braços abertos
Para me envolver de emoção*

*Partisses na hora errada
Na hora da minha vitória
Deixasses um vazio em meu peito...*

*Ainda assim, vou continuar...
Por mim, por ti e por nós
Seja lá onde estiveres, sei que comigo estarás!*

*A Deus eu sempre agradeço
Pelos anos de convívio
Foi um grande privilégio tê-lo tido como amigo!*

Fernanda Timm

SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Epígrafe	VIII
Lista de Abreviatura e Siglas	XI
Lista de Figuras	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
I. Introdução	
I.1. Cultivo Celular	01
I.1.1. Histórico	01
I.2. Micoplasma	07
I.2.1. Histórico	07
I.2.2. Classificação dos micoplasmas	08
I.2.3. Características	09
I.2.4. Estrutura Genômica	10
I.2.5. Micoplasma nas culturas celulares	10
I.2.5.1. Efeito da contaminação nas culturas celulares	12
I.2.5.2. Métodos de detecção	13
I.2.5.3. Tratamento com antimicrobiano nas culturas	16

I.2.5.4. O uso do antimicrobiano agente removedor de micoplasma	17
I.3. Erros Inatos do Metabolismo	18
I.3.1. Enzimas Lisossômicas	18
I.3.2. Doenças Lisossômicas de Depósito.....	20
I.3.2.1. Diagnóstico Laboratorial de Doenças Lisossômicas	24
II. Justificativa	26
III. Objetivos	
III.1. Objetivo Geral	28
III.2. Objetivos Específicos	28
IV. Capítulo 1 - Artigo 1	29
V. Capítulo 2 - Artigo 2	35
VI. Discussão	47
VII. Conclusões	59
VIII. Referências.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASB	Arilsulfatase B
DL	Doenças lisossômicas de depósito
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
GAGS	Glicosaminoglicanos
GM1	Monosialogangliosídeo 1
GM2	Monosialogangliosídeo 2
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
LDM	Leucodistrofia metacromática
MPS	Mucopolissacaridoses
MRA	Agente removedor de micoplasma
OLS	Oligossacarídeos
SAP3	Saposina 3
SBF	Soro bovino fetal
SOLS	Sialiloligossacarídeos

LISTA DE FIGURAS

Figuras

Figura 1 - Fibroblastos em Cultivo	02
Figura 2 – Contaminação Bacteriana	03
Figura 3A – Equipamentos de proteção Individual	05
Figura 3B - Lavagem das mãos com solução degermante	06
Figura 3C - Estufas com e sem injeção de CO₂	06
Figura 3D - Microscópio invertido, garrafas de cultivo estéril	07
Figura 4A - Cultura isenta de micoplasmas	15
Figura 4B - Cultura contaminada	15
Figura 5 - Lisossomos contendo hidrolases ácidas	19
Figura 6 - Alargamento dos vacúolos em uma DL	21

RESUMO

A contaminação por micoplasma em culturas celulares pode causar consideráveis interferências no metabolismo celular, acarretando em um sério problema para os laboratórios de cultura de células. Com o objetivo de avaliar o efeito da contaminação por micoplasma e do tratamento com o antibiótico removedor de micoplasma (MRA), sobre a medida da atividade de hidrolases lisossômicas, foram cultivadas culturas de fibroblastos de indivíduos normais para realização destas medidas. Para tanto, foram selecionadas enzimas de referência do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do HCPA sendo elas: β -galactosidase, β -glicosidase, arilsulfatase A, β -glicuronidase e hexosaminidase (Total e A). Mediu-se a atividade em fibroblastos contaminados com micoplasma, antes e após adição do MRA. Os resultados foram comparados com a atividade enzimática em fibroblastos controles (sem contaminação) e fibroblastos controles tratados com MRA. Somente a enzima β -glicosidase não alterou significativamente sua atividade na presença do micoplasma e nem do MRA. A hexosaminidase Total e a β -galactosidase sofreram interferência significativa na presença do micoplasma e do MRA. A hexosaminidase A e a arilsulfatase A sofreram interferência significativa somente na presença do MRA. A β -glicuronidase sofreu alteração de sua atividade somente na presença do micoplasma. Estes resultados mostraram que as enzimas testadas comportaram-se de maneira diferente frente à presença do MRA e/ou do micoplasma, levando-nos a avaliar, em um segundo momento, se estes agentes (micoplasma e antibiótico), poderiam alterar a medida da atividade enzimática em cultura de fibroblastos de pacientes com doenças lisossômicas (DL). Para tanto foi realizada a medida da atividade das enzimas: β -galactosidase, arilsulfatase B (ASB), hexosaminidase A e α -glicosidase. A atividade destas foram medidas em culturas de fibroblastos contaminadas por micoplasma, antes e após adição do MRA. Os resultados destas atividades foram comparados com as atividades enzimáticas em culturas cultivadas na ausência de contaminação. Somente a ASB alterou significativamente sua atividade tanto na presença do micoplasma quanto do MRA. As demais enzimas não sofreram interferência significativa na presença de ambos. Os resultados obtidos nos permitem concluir que em cultura de fibroblastos, tanto a contaminação por micoplasma quanto o uso de um tipo de antibiótico (MRA), podem ser fator de interferência para medida da atividade de algumas hidrolases lisossômicas. Sendo assim, sugerimos que haja a prevenção da contaminação através da detecção do micoplasma bem como o uso de técnicas assépticas e para aquelas culturas que não podem ser descartadas, faça-se o uso criterioso de antibióticos capazes de remover o micoplasma, como o analisado neste estudo. Dessa maneira, trabalharíamos com um grau de confiabilidade maior nos resultados laboratoriais.

ABSTRACT

Contamination of cellular cultures by mycoplasma can cause considerable interference with the cellular metabolism and result in serious problems for cell culture laboratories. To evaluate the effects of mycoplasma contamination and treatment with the mycoplasma removal antibiotic agent (MRA) on the measurement of the activity of lysosomal hydrolyses; fibroblast cultures from normal individuals were cultivated specifically to realize these measurements. To do this, we selected reference enzymes from the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism maintained by the Service of Genetic Medicine at the HCPA in Porto Alegre, Brazil as follows: β -galactosidase, β -glucosidase, arilsulfatase A, β -glucuronidase and hexosaminidase (Total and A). The activity of the fibroblasts contaminated by mycoplasma was measured before and after the addition of the MRA. The results were compared with the enzymatic activity in controls both of non-contaminated fibroblasts and others treated with MRA. The β -glucosidase enzyme was the only enzyme that demonstrated no significant activity alterations in the presence of either the mycoplasma or the MRA. All the others showed significant changes - the total hexosaminidase and the β -galactosidase from the presence of the both the mycoplasma and the MRA ; the hexosaminidase A and the arilsulfatase A from the presence of the MRA only; while the presence of the mycoplasma on its own significantly altered the β -glucuronidase activity. These results prove that the enzymes we tested behave differently when exposed to MRA and/or the mycoplasma. This raises the question as to whether these agents (mycoplasma and antibiotic) could alter the measurement of enzymatic activity in fibroblast cultures from patients with lysosomatic diseases (DL). To resolve this question, the activities of the β -galactosidase, arilsulfatase B (ASB), hexosaminidase A and α -glucosidase enzymes were measured in cultures of fibroblasts contaminated with mycoplasma, before and after the addition of MRA. The results obtained were compared with the enzymatic activities of un-contaminated cultures. Significant alteration of activity in the presence of MRA and the mycoplasma was observed only in the ASB. The other enzymes demonstrated no significant alteration in the presence of either. The results obtained permit us to conclude that, in a fibroblast culture, both contamination by mycoplasma and the effects of the use of a type of antibiotic (MRA) can interfere in the results of the measurement of the activity of some lysosomatic hydrolyses. Therefore, we suggest that measures be taken to prevent contamination by the detection of the mycoplasma and the employment of aseptic techniques, and, in those cases where the cultures cannot be disposed of, antibiotics capable of removing the mycoplasma should be utilized as analyzed in this study. In this way, greater confidence in the respective laboratory results can be assured.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Cultivo Celular

I.1.1 Histórico

A origem do cultivo celular teve início quando passou-se a estudar, com certos detalhes, tecidos de organismos em frascos de vidro. As primeiras culturas desenvolveram-se a partir de técnicas de embriologia usadas ainda no século XIX. Jolly em 1903 realizou o cultivo de leucócitos de salamandra, em 1907 Harrison trabalhou com tecido de rã. Já em 1912, ocorreu a confirmação do crescimento de células animais *in vitro* através de experimentos de Carrel e Burrows (Harrison e Rae, 1997).

Embora no início do século XIX tenha havido a confirmação do crescimento celular, a manutenção das culturas, por períodos mais prolongados, foi difícil durante muitos anos. Porém, com a identificação e preparação de meios de cultura adequados contendo aminoácidos essenciais, vitaminas, peptídeos e fatores de crescimento adicionados às culturas através do soro bovino, permitiu-se a manipulação e o crescimento de vários tipos celulares (Bruce et al., 2002).

A habilidade de estudar o crescimento celular dependeu, principalmente, da manipulação das culturas no laboratório. Em se tratando de bactérias e fungos, o processo de crescimento foi bem mais simplificado do que o crescimento e manutenção de células animais. Mais complexo ainda foi para aquelas culturas que necessitam ser mantidas por um tempo maior.

Culturas de células animais são iniciadas a partir da dispersão de uma parte de um tecido que é adicionado a um frasco de cultura contendo meios adequados com nutrientes específicos para o crescimento celular. A maioria das células

animais tais como os fibroblastos, crescem aderidas nas superfícies de frascos usados especificamente para o cultivo celular (Cooper e Hausman, 2006).

Dos tipos celulares mais apropriados para o cultivo temos como principal representante, os fibroblastos (figura 1). Estas células são utilizadas para as mais diversas finalidades, dentre elas podemos destacar sua utilização para confirmação diagnóstica de erros inatos do metabolismo. Nestas doenças, enzimas encontram-se com suas atividades deficientes e a confirmação desta deficiência pode ser realizada através da medida da atividade enzimática nos fibroblastos. Outra vantagem destas células é a possibilidade de serem mantidas em nitrogênio líquido por longos períodos, possibilitando estudos posteriores sem perda da atividade enzimática.

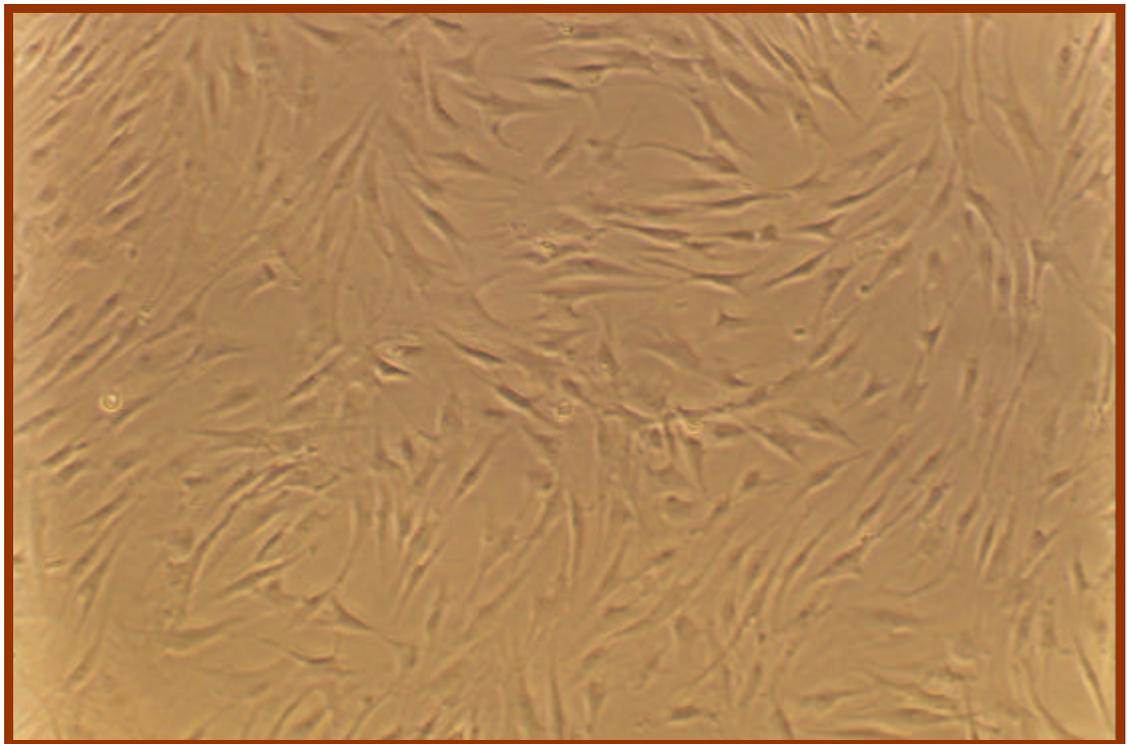


Figura 1. Fibroblastos em cultivo.

Assim como as culturas de fibroblastos, todas as demais culturas consistem em um sistema biológico sensível a agentes físicos, químicos e infecciosos, devendo apresentarse íntegras, de modo a não prejudicarem ensaios laboratoriais.

O monitoramento das mesmas deve ser permanente já que a contaminação em laboratórios de cultivo é um problema recorrente. Contaminações por bactérias, fungos ou leveduras são mais freqüentemente encontradas. Geralmente, estas contaminações são detectadas pelo operador através da turvação do meio ou pela variação no pH. A confirmação das mesmas, no entanto, faz-se através de métodos de detecção que vão desde a cultura de microorganismos até a direta observação através da coloração pelo método de Gram. Na figura 2 podemos observar uma contaminação bacteriana, através da turvação do meio de cultura.



Figura 2. Contaminação Bacteriana .

Para descontaminação de culturas celulares contaminadas por fungos ou bactérias, utiliza-se uma gama de antimicrobianos. Para contaminações sistêmicas graves, causadas por fungos, utiliza-se a anfotericina B e/ou a nistatina. Quando se trata de contaminação bacteriana, há uma grande variedade de antimicrobianos capazes de agir sobre esta contaminação. Em se tratando de bactérias Gram negativas, antimicrobianos como a amicacina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina etc, são largamente recomendados. Se a contaminação for por bactérias Gram positivas, outros antimicrobianos são indicados como a penicilina, clindamicina, eritromicina dentre outros (Harrison e Rae, 1997; Lambert, 1998).

Outro microorganismo freqüentemente encontrado nos laboratórios de cultivo celular é o micoplasma. Este microorganismo, por seu tamanho diminuto, é difícil de ser detectado (não pode ser observado através da microscopia comum), causando nas culturas celulares, diversas alterações citogenéticas que vão desde alterações no metabolismo celular, diminuição nas taxas de divisão celular pela interferência de DNA, RNA e proteínas, aberrações cromossômicas até a morte com desprendimento da monocamada (Timenetsky, 2006). Com a produção, permuta e comercialização de culturas celulares, inicialmente isentas de micoplasmas, nem sempre é possível assegurar que estas continuem ausentes, pois, com a sucessão de repiques, a transposição do microorganismo para as culturas, às vezes, é inevitável (Timenetsky et al., 1992).

Uma maneira de manter um controle intensivo deste tipo de contaminante é a testagem das culturas em intervalos regulares, realizada através de métodos específicos e sensíveis (Uphoff e Drexler, 2005).

Para segurança do cultivo celular é importante estabelecer regras de assepsia e técnicas de cultivo adequadas que farão parte de uma combinação de procedimentos que, intencionalmente, terão por finalidade diminuir ou eliminar por completo prováveis contaminantes. Como exemplos de procedimentos assépticos, podemos citar os visualizados na figura 3: (A) Equipamentos de proteção individual; (B) Lavagem das mãos com solução degermante; (C, D) Aparelhagens adequadas para o cultivo.



Figura 3. (A) Equipamentos de proteção individual.



Figura 3. (B) Lavagem das mãos com solução degermante.



Figura 3. (C) Estufas com e sem injeção de CO₂.

* Solução degermante: Produto a base de Polivinil Pirrolidona Iodo, utilizado para prevenção e tratamento de infecções cutâneas. Ativo contra todas as formas de bactérias, fungos e vírus.



Figura 3. (D) Microscópio invertido, garrafas de cultivo estéril.

I.2. Micoplasma

I.2.1. Histórico

Os micoplasmas são conhecidos desde o final do século XIX. Estes microorganismos foram relatados, pela primeira vez, há aproximadamente 100 anos e, atualmente, mais de 190 espécies já foram descritas (Rottem, 2003).

O primeiro isolamento de um *Mollicute* foi obtido por pesquisadores na França em 1898, a partir de material pulmonar bovino durante um surto de pleuropneumonia contagiosa. Microorganismos semelhantes foram descobertos posteriormente por outros pesquisadores em outros hospedeiros e foram, em sua grande maioria, por várias décadas, denominados genericamente de PPLO (PleuroPneumonia-Like Organisms), (Timenetsky, 2006).

Os micoplasmas estão amplamente distribuídos pela natureza, sendo capazes de habitar plantas, insetos e animais. Muitos habitam a flora normal de seus hospedeiros, no entanto alguns são patógenos oportunistas ou comensais (Timenetsky et al., 2006).

I.2.2. Classificação dos micoplasmas

A taxonomia destes microorganismos é periodicamente ajustada. A falta da parede celular é usada para distinguir estes microorganismos como pertencentes ao reino *Archobactérias* (bactérias primitivas), divisão *Tenericutes* e classe *Mollicutes* (do latim, molli, suave; cutes, cútis ou derme), (Rottem, 2003).

Esta classe é composta por cinco ordens: *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis*, possui seis famílias: *Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae* e quatorze gêneros: *Mycoplasma*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania*, *Solobacterium*. Devido ao estudo comparativo de genomas microbianos, os gêneros *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Bulleidia*, *Holdemania*, *Solobacterium* foram incluídos aos *Mollicutes* (Razin e Hermann, 2002).

Filogeneticamente, os *Mollicutes* descendem das bactérias Gram-positivas, entretanto, adquirem a coloração Gram-negativa pela ausência de parede celular (Rottem, 2003).

I.2.3. Características

Por pertencerem à classe *Mollicutes*, apresentam como principal característica a ausência da parede celular e da molécula de peptidoglicano, sendo o citoplasma envolvido somente por uma membrana trilaminar que contendo esterol na sua constituição (Weisburg et al., 1989). Apresentam também, características bem peculiares à classe tais como: tamanho diminuto (em torno de 125-250 nm) e alto pleomorfismo (Brooks et al., 2004).

Estes microorganismos possuem uma grande limitação para sintetizar componentes para seu metabolismo e por isso necessitam de componentes da célula hospedeira para sua replicação e sobrevivência (Rottem, 2003).

Os micoplasmas multiplicam-se por fissão binária, produzindo em meios sólidos, colônias em forma de “ovo frito”. Seu mecanismo de multiplicação é lento, levando aproximadamente 7 a 21 dias para crescerem *in vitro*.

Podem ser divididos em fermentadores e não fermentadores de carboidrato (glicose). *In vitro*, os fermentadores acidificam os caldos e os não fermentadores oxidam ácidos graxos e álcoois, não diminuindo significativamente o pH do meio de cultura.

Quando a arginina é utilizada pelos dois grupos, há produção de ATP, CO₂ e NH₃, alcalinizando o caldo. Usualmente, o pH ótimo para o crescimento fica em torno de $7,8 \pm 0,2$. Os *Ureaplasmas* hidrolisam a uréia e requerem pH entre 5,8 e 6,5. Algumas espécies do gênero *Acholeplasma* não requerem a presença de soro animal nos meios de cultura, como a grande maioria dos *Mollicutes*.

I.2.4. Estrutura Genômica

O genoma circular de fita dupla dos *Mollicutes* pode ser até dez vezes menor do que em *Escherichia coli* e possuem baixo teor de Guanina + Citosina (24 a 43%).

Dados a respeito destes microorganismos mostram que o tamanho de seu genoma pode variar de 600 até 2.200 Kb, podendo ser divididos em dois grupos: o primeiro, composto por espécies dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (considerados os *Mollicutes* mais recentes), com aproximadamente 600 a 1350 Kb e o segundo, abrangendo espécies do gênero *Acholeplasma* e *Spiroplasma* (considerados os *Mollicutes* mais primitivos), com aproximadamente 790 a 2200 Kb (Razin, et al., 1998). Possuem também, de uma a duas cópias de RNA 16S, podendo conter fagos, plasmídios e alguns possuem o códon UAG para triptofano.

De acordo com os resultados convencionais da biologia molecular, os micoplasmas são considerados os representantes do menor sistema de vida, desde que a sua capacidade de codificação limita-se à aproximadamente 700 proteínas essenciais codificadas por não mais do que 500 genes (Timenetsky, 2006). Em função do genoma reduzido, apresentam metabolismo e vias biossintéticas limitadas. Desta maneira, o seu cultivo exige meios bastante enriquecidos, contendo: soro animal, precursores para a biossíntese de ácido nucléico, proteínas e lipídios (Razin et al., 1998).

I.2.5. Micoplasma nas culturas celulares

O primeiro isolamento do micoplasma em culturas celulares foi discutido em 1956. Até o presente, aproximadamente 20 espécies já foram isoladas, sendo

que as espécies *A. laidlawii*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. hyorhinae* e *M. fermentans*, foram detectadas em aproximadamente 95% das culturas acidentalmente infectadas com estes microorganismos. As duas primeiras espécies são de origem humana e as três últimas de origem animal (Timenetsky et al., 2006).

Robinson e colaboradores (1956) demonstraram, pela primeira vez, a contaminação por micoplasma em fibroblastos humanos. Estudos nas décadas de 60 e 80, nos Estados Unidos, demonstraram que as culturas celulares apresentavam uma prevalência de 15% de contaminação por micoplasma e que estas ocorriam, não só em culturas de longa duração, como também em culturas de curta duração. Estudos em outros países mostraram uma prevalência de contaminação igual ou similar. Para outros investigadores esta taxa poderia alcançar até 80% nas instituições que teriam por prática o intercâmbio de linhagens celulares (Razin et al., 1998), uma das grandes causas das contaminações (Timenetsky et al., 2006).

Em muitos casos, as fontes de contaminação podem ser originárias do soro animal, da tripsina e dos meios de cultura. Além disso, a manipulação do operador é capaz de produzir aerossóis que contribuem para a disseminação dos micoplasmas.

Uma outra fonte de contaminação pode ser o nitrogênio líquido, onde as células são armazenadas. Foi demonstrado que os micoplasmas podem sobreviver no nitrogênio líquido e que, embora não possam proliferar, podem persistir igualmente por longos períodos. Dessa maneira, voltam a contaminar as culturas celulares quando degeladas para re-cultivo (Razin, et al., 1998).

Muito provavelmente, este número de fontes diferentes é responsável pelas contaminações por micoplasma, porque a maioria das espécies em cultura de células está associada, geralmente, com humanos, bovinos ou suínos. As espécies *M. orale*, *M. fermentans* e *M. hominis* são responsáveis por mais da metade de todas as infecções e são encontrados na cavidade orofaríngea de humanos. O *M. orale* prevalece entre 20 a 40% do total das infecções, indicando que estes são transmitidos às culturas através do operador (Razin, et al., 1998).

Um outro grupo de micoplasma freqüentemente encontrado nas culturas origina-se dos Bovídeos: *M. arginini* e *A. laidlawii*. As fontes para estas espécies são os soros bovinos que são coletados em matadouros para serem misturados aos meios de cultura. Hoje em dia os lotes de soro, na grande maioria, são testados para micoplasma (Timenetsky et al., 2006).

Os micoplasmas usualmente infectam hospedeiros específicos, porém em culturas de células podemos encontrar tanto espécies de origem humana como espécies de origem animal.

I.2.5.1. Efeito da contaminação nas culturas celulares

A contaminação por micoplasma nas culturas celulares pode acarretar em diferentes efeitos citogenéticos que vão desde a interrupção do metabolismo celular, modificação da morfologia da célula, interferência na replicação, modificações cromossômicas até a transformação celular (Timenetsky et al., 2006).

O efeito mais indesejável é a perda de toda a cultura celular devido ao crescimento reprimido pela contaminação. Os efeitos das contaminações podem

ser completamente variáveis e podem interferir nas culturas de maneira e graus diferentes. Esta variabilidade vai depender das espécies contaminantes, do tipo de célula e das condições da cultura (Razin et al., 1998).

Um dos principais efeitos tóxicos nas culturas contaminadas está relacionado com o consumo de nutrientes e de componentes básicos do metabolismo celular, tais como: precursores dos ácidos nucléicos, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, colesterol etc. Devido a suas potencialidades metabólicas muito baixas, do seu ganho insuficiente de energia e ao número elevado de micoplasmas na cultura de células, estes compostos podem ser usados muito rapidamente. A degradação não oxidativa destes compostos conduz, também, a uma alteração do valor de pH no meio de cultura. Este pH pode diminuir devido à formação de ácidos pelos micoplasmas. Em contrapartida, espécies como *M. hominis* e *M. arginini* podem aumentar o valor de pH devido à produção da amônia, que é também um inibidor do crescimento celular e é um agente altamente tóxico (Gong et al., 1999; Ben-Menachem et al., 2001)

Uma vez identificadas as culturas contaminadas, o mais indicado seria que estas fossem descartadas e substituídas por outras livres de contaminação, já que o manuseio das contaminadas geralmente acarreta na disseminação para as demais culturas (Miyaki et al., 1989).

I.2.5.2. Métodos de detecção

A detecção da contaminação por micoplasma consiste em uma parte do controle contra este microorganismo, que deveria ser estabelecida em todos os laboratórios de cultivo celular (Uphoff e Drexler, 2005).

Diversos métodos para detecção do micoplasma em cultura de células têm sido utilizados. Dentre eles, podemos destacar: o corante fluorescente Hoescht 33258, o cultivo em meio Agar, os métodos bioquímicos e as técnicas de hibridização ou PCR (Harrison e Rae, 1997).

Segundo Timenetsky e colaboradores (2006), os métodos mais recomendados para minimizar falsos resultados são os obtidos por PCR em combinação com as culturas em Ágar. Para Uphoff e Drexler (2005), o método de detecção por PCR permite não somente diagnosticar a infecção, como também, identificar a espécie. Já para Jung e colaboradores (2003) as técnicas por PCR em combinação com a corante fluorescente Hoescht, parecem ser eficazes na detecção da contaminação em laboratórios de cultura.

O método utilizado por nosso laboratório consistiu na detecção pelo corante fluorescente Hoechst (figura 4 A e B), (Chen, 1977). Segundo Blanchard e Browing (2005), ele embora não identifique as espécies contaminantes, detecta a totalidade da contaminação, oferecendo uma sensibilidade próxima dos 99%. Este método consiste na afinidade do corante reativo fluorescente DAPI (4-6-damidina-2-fenilhidroclorido) ou Hoechst nº 33258 (Bisbenzamida) com o DNA do micoplasma, formando um complexo fluorescente DNA-DAPI. Dessa maneira, os micoplasmas presentes no citoplasma das células aparecem com alto grau de fluorescência (Battaglia et al., 1994).

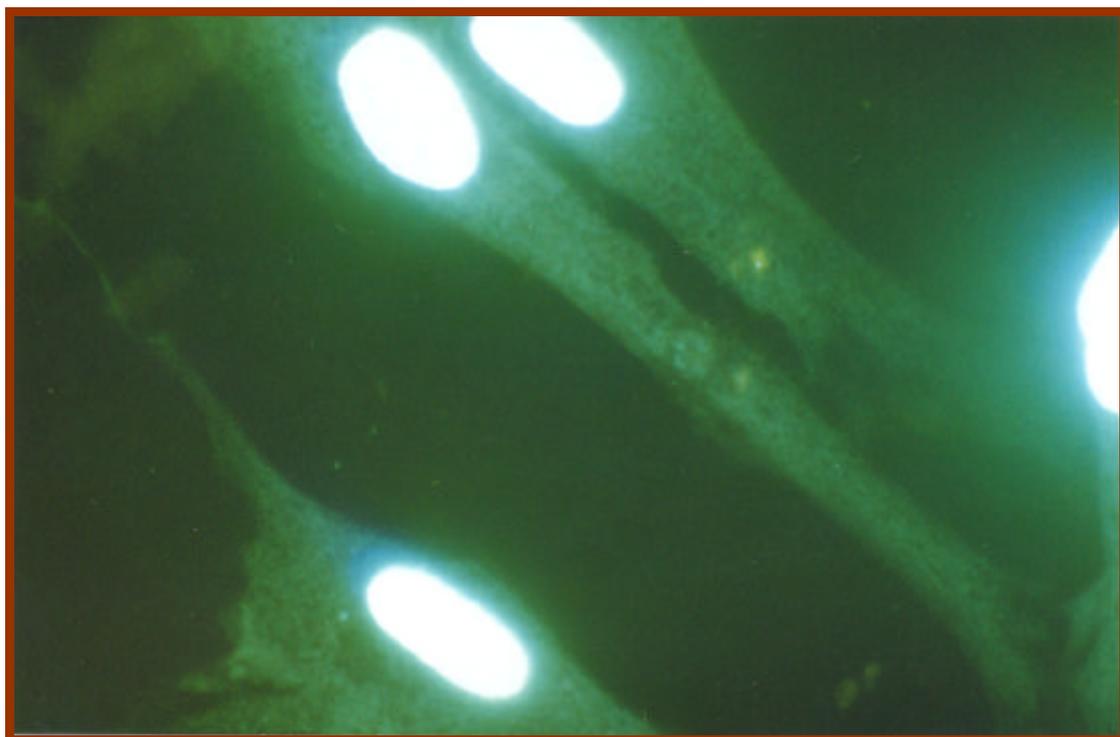


Figura 4. (A) Cultura isenta de micoplasmas.

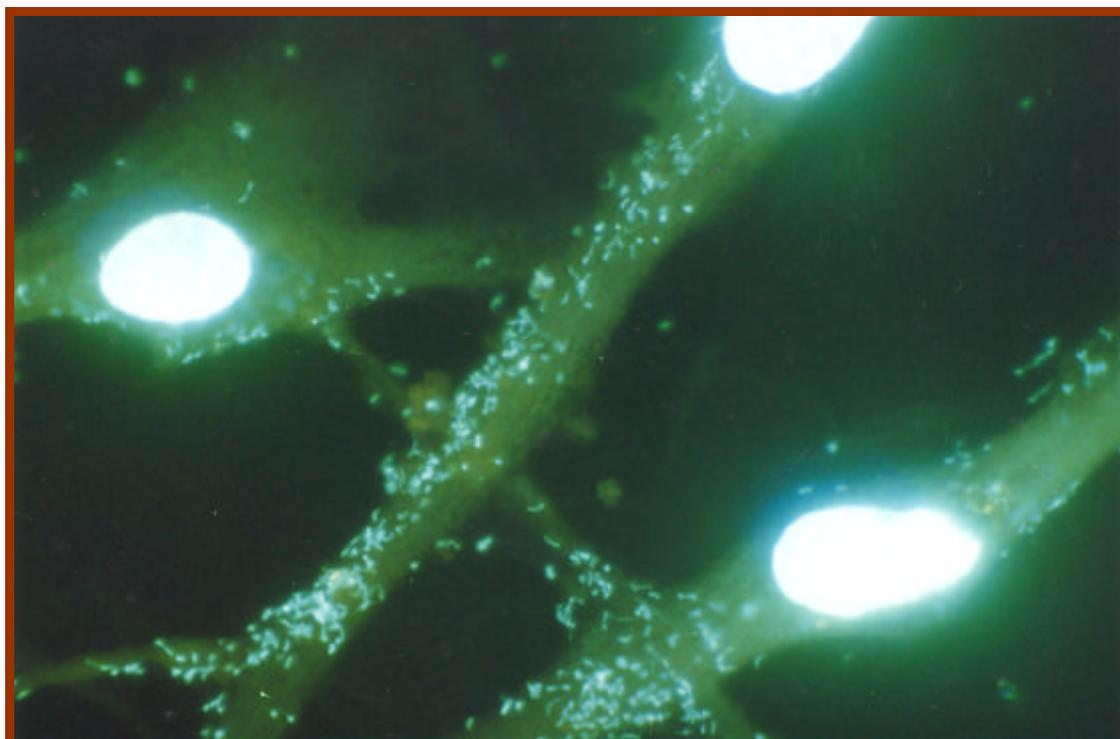


Figura 4. (B) Cultura contaminada com micoplasma.

I.2.5.3. Tratamento com antimicrobianos nas culturas

Durante anos, um variado número de métodos de eliminação foi desenvolvido para as culturas celulares, meios de culturas, suplementos etc. Estes tratamentos envolveram o calor, a centrifugação, a exposição a detergentes, o tratamento com antimicrobianos, dentre outros (Drexler e Uphoff, 2000).

O uso indiscriminado de antimicrobianos nas culturas celulares, não é considerado uma prática recomendada, de modo a evitar a resistência bacteriana. Porém, muitas vezes, esta prática pode ser inevitável para aquelas culturas de longa duração que sofrem muitas manipulações.

O antimicrobiano mais comumente usado em laboratórios de cultivo celular é a penicilina que é acrescentada aos meios de cultura. Na necessidade, outros antimicrobianos podem ser acrescentados ao meio. Sabe-se, porém, que o micoplasma, por não apresentar a camada de peptidoglicano torna-se resistente à penicilina (Harrison e Rae, 1997).

Até agora, três grupos de agentes antimicrobianos foram considerados altamente ativos contra a contaminação por micoplasmas. São eles: macrolídeos, tetraciclina e quinolonas. Estes antimicrobianos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação (Uphoff e Drexler, 2002). Os mesmos autores comprovaram a eficiência na eliminação da contaminação em uma variação de 66 e 85%, dependendo do tipo de antimicrobiano usado. Entretanto, estes números refletem, algumas vezes, não somente a morte dos micoplasmas, mas também a perda da cultura, devido à inibição do crescimento das células eucarióticas. A perda das culturas ocorre mais freqüentemente quando as células estão muito infectadas e já

em uma condição muito ruim (3-11% de culturas tratadas, dependendo do antimicrobiano).

I.2.5.4. O uso do antimicrobiano agente removedor de micoplasma

No início da década de 60, desenvolveu-se uma droga sintética chamada de ácido nalidíxico, o primeiro antimicrobiano do grupo das quinolonas. Esta droga exerce a inibição seletiva de uma enzima (DNA girase) necessária para replicação do DNA. A partir da década de 80, um grupo de novos antimicrobianos foi acrescido, a chamada fluorquinolona. Esta droga apresenta um amplo espectro de atividade e penetra muito bem no tecido (Tórtora et al., 2000).

O agente removedor de micoplasma (MRA, do inglês “Mycoplasma Removal Agent”) é um antimicrobiano derivado do ácido oxo-quinolona-3-carboxílico, que tem por finalidade inibir a DNA girase (Uphoff et al., 1992).

Segundo Uphoff e Drexler (2005), as contaminações por micoplasma apresentam múltiplos efeitos em linhagens celulares, podendo influenciar os resultados de experiências na medicina humana. Dessa maneira, a eliminação das contaminações por micoplasma em culturas de células transformou-se numa alternativa prática de maneira a restabelecer linhagens importantes ou insubstituíveis. Conforme os autores, o antimicrobiano MRA, não apresentou nenhuma alteração consistente e/ou permanente às células eucarióticas durante ou depois do tratamento.

I.3. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM), uma importante área da genética, são definidos como doenças causadas por bloqueio em uma ou mais vias metabólicas, afetando seu funcionamento normal. As alterações ocorrem ao nível molecular, causando a ausência de síntese de uma enzima ou proteína funcionalmente deficiente, ou ainda, a destruição de uma enzima ou proteína normalmente sintetizada. Estes apresentam uma grande variabilidade clínica e, ocasionalmente, heterogeneidade genética, ou seja, deficiência de diferentes enzimas determinando o mesmo quadro clínico (Pollitt et al., 1997; Gimenez-Sanchez et al., 2000).

De acordo com Wapper (1993), os EIM são em sua maioria, de herança autossômica recessiva, com risco de 25% a cada gestação de pais heterozigotos. Existem alguns casos de herança ligada ao cromossomo X, sendo o risco de recorrência de 50% a cada gestação para o sexo masculino e 50% para filhas portadoras.

A incidência dos EIM é rara, mas quando em conjunto, pode chegar a 1 caso para cada 1000 nascidos vivos (Giugliani, 1997). Entre os vários grupos de EIM, nos deteremos, neste trabalho, no grupo das doenças lisossômicas de depósito.

I.3.1. Enzimas Lisossômicas

Lisossomos são organelas citoplasmáticas delimitadas por membrana, que podem apresentar tamanhos e formas variadas, freqüentemente medindo de 0,5 a

0,3 μm de diâmetro. Apresentam no seu interior, diversas enzimas hidrolíticas que são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (Junqueira e Carneiro, 2000).

Estas organelas apresentam um papel fundamental no metabolismo celular, fornecendo um ambiente de pH baixo (aproximadamente 5,0), para numerosas hidrolases ácidas (figura 5). Cada enzima lisossômica é responsável por um mecanismo complexo de quebra de macromoléculas em componentes menores que serão reutilizados pelas células ou eliminados pelo organismo. A ausência ou deficiência de uma enzima provocará um bloqueio no mecanismo catabólico, levando ao acúmulo progressivo de produtos metabólicos dentro do lisossomo.

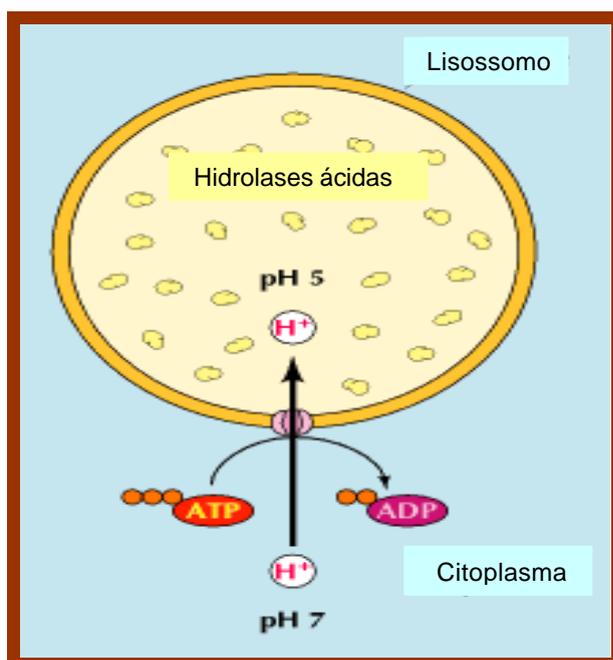


Figura 5. Lisossomos contendo hidrolases ácidas (figura adaptada)

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eureka

São conhecidas aproximadamente 50 diferentes enzimas lisossômicas que podem hidrolisar proteínas, DNA, RNA, polissacarídeos e lipídeos. A maioria

delas atua na porção terminal de um substrato complexo, funcionando de maneira seqüencial para liberar unidades monoméricas que podem difundir para fora do lisossomo ou servir de substrato para uma próxima reação em cascata.

As enzimas lisossômicas passam por uma série de modificações pós-traducionais durante o processo de maturação para alcançar uma forma enzimática funcional ativa dentro dos lisossomos (Kornfeld et al., 1989; Hasilik e Neufeld, 1980). Estudos destas modificações têm contribuído para a elucidação dos defeitos nas desordens lisossômicas.

I.3.2. Doenças Lisossômicas de Depósito

Enzimas lisossômicas deficientes levam ao catabolismo incompleto de seu substrato e, conseqüentemente, ao acúmulo de um metabólito insolúvel parcialmente degradado dentro dos lisossomos (figura 6). Estas organelas cheias de macromoléculas incompletamente digeridas, tornam-se grandes e numerosas, suficientemente capazes de intervirem sobre as funções celulares normais, dando origem aos distúrbios de armazenamento lisossômico ou doenças lisossômicas de depósito (DL) (Glew et al., 1985).

Este conceito foi proposto por Wallace (1965) após ter descoberto uma deficiência enzimática na degradação do glicogênio que causava a doença de Pompe (Wallace et al, 1990).

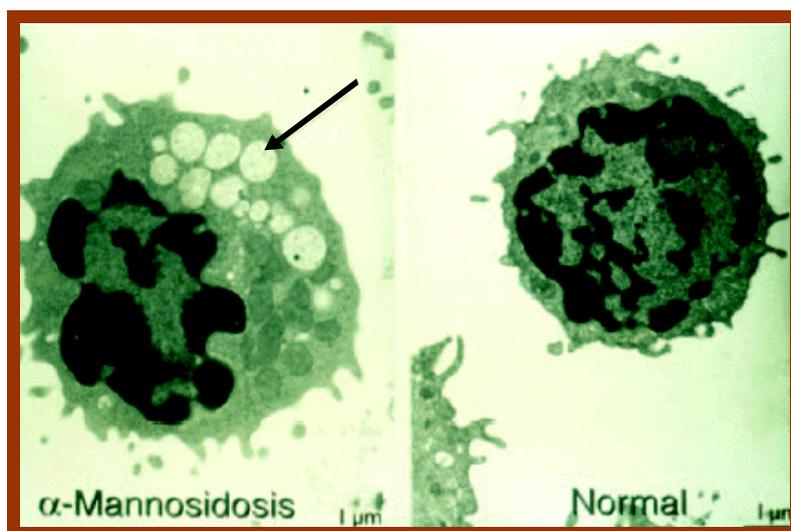


Figura 6. Alargamento dos vacúolos em uma DL

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eureka

Atualmente, aproximadamente 50 doenças fazem parte das DL (Wraith, 2002; Wilcox, 2004), que são classificadas de acordo com a rota metabólica afetada e o metabólito acumulado nos tecidos.

Todos estes distúrbios são de herança autossômica recessiva, com exceção da doença de Fabry e da Síndrome de Hunter que são doenças recessivas ligadas ao cromossomo X.

As DL podem ser classificadas de acordo com o substrato acumulado em: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteinoses, e mucopolisacaridoses (Watts, 2003).

O quadro clínico destas doenças vai depender do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nas células dos tecidos envolvidos e das conseqüências patológicas desta alteração (Danks, 1981).

Das enzimas testadas no presente trabalho, quatro encontram-se deficientes nas esfingolipidoses (β -galactosidase, β -glicosidase, arilsulfatase A,

hexosaminidase - total e A), duas nas mucopolissacaridoses (arilsulfatase B e β -glicuronidase) e a enzima β -glicosidase faz parte das DL que envolvem o metabolismo do glicogênio.

A deficiência da enzima β galactosidase leva ao acúmulo de metabólitos glicoconjugados, principalmente o acúmulo do gangliosídeo GM1 (Severini et al., 1999). Esta é uma doença autossômica recessiva que apresenta três formas clássicas. A forma clássica tipo I caracteriza-se por retardo mental ao nascimento, a tipo II, conhecida como forma juvenil, é semelhante ao tipo I. O tipo III (forma adulta) que ocorre entre os 15 e 30 anos caracteriza-se por manifestações parkinsonianas.

Quando há a deficiência da enzima arilsulfatase A, ocorre o acúmulo de sulfatídeos causando a doença conhecida como leucodistrofia metacromática (LDM). Sua incidência é de 3-5 casos por 100.000 nascimentos (Amaral et al., 1997). Este erro inato caracteriza-se por retardo mental, desmielinização, paralisia e demência progressiva.

Em se tratando da deficiência da enzima β -glicosidase, há o acúmulo do glicocerebrosídeo, causando a doença de Gaucher. Esta doença é considerada uma das esfingolipidoses mais comuns. Clinicamente, também apresenta três formas principais que se distinguem, principalmente pela presença ou não de sintomas neurológicos (Karam et al., 2001).

Já as gangliosidoses GM2 correspondem a um grupo de doenças causadas pelo acúmulo de gangliosídeo GM2 e glicolípídios afins. Dividem-se em três tipos principais, todos com ocorrência nas fases infantil, juvenil e adulta. Na

gangliosidose GM2 tipo B ou doença de Tay-Sachs existe deficiência de hexosaminidase A; na gangliosidose tipo O ou doença de Sandhoff, existe deficiência das hexosaminidases A e B (hexosaminidase total) e na gangliosidose GM2 tipo AB existe deficiência do ativador SAP3. Na doença de Tay-Sachs os indivíduos podem apresentar retardo mental, fraqueza muscular e cegueira. Já na doença de Sandhoff, o quadro neurológico é acompanhado por hepatoesplenomegalia e alterações ósseas.

As enzimas arilsulfatase B (ASB) e β -glicuronidase classificadas como mucopolissacaridoses (MPS) fazem parte de grupo de doenças lisossômicas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGS). São conhecidos sete tipos de MPS, sendo que a ASB está deficiente na MPS VI e a β -glicuronidase na MPS VII. A deficiência da ASB causa a doença conhecida como Maroteaux-Lamy considerada uma MPS de magnitude sintomatológica variável, de grave a leve. Quando ocorre a deficiência da enzima β -glicuronidase, encontramos a doença de Sly que além de ter sintomas de grave a leve, pode incluir a hidropisia fetal.

Em se tratando de doenças de depósito do glicogênio, estas se caracterizam por desordens hereditárias que afetam o metabolismo deste composto. Praticamente todas as proteínas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio e sua regulação causam algum tipo de doença de depósito. Há diferentes formas de doenças de depósito do glicogênio, identificadas de acordo com a ordem cronológica na medida que os defeitos enzimáticos foram sendo descobertos e descritos.

O glicogênio encontrado nestas desordens é anormal em quantidade e/ou qualidade. A característica clínica predominante neste tipo de doença consiste em repentinas contraturas musculares (cãimbra), intolerância ao exercício, suscetibilidade a fadiga e fraqueza muscular.

Dentro deste grupo de doenças, a glicogenose tipo II, também conhecida como doença de Pompe é causada pela deficiência da enzima α -glicosidase (Hirschhorn e Reuser, 2001).

Todas as DL foram descobertas através dos diagnósticos clínico e laboratorial. A partir de então, foram proporcionados aos pacientes, somente tratamentos paliativos e sintomáticos. Como medidas preventivas há o aconselhamento genético, a detecção de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal. Atualmente, um tratamento mais eficaz é feito através da reposição da enzima deficiente por uma enzima modificada biotecnologicamente. Este tratamento já está disponível para as doenças de Gaucher, MPS VI e Pompe (Wraith 2006; Koeberl et al., 2007).

I.3.2.1. Diagnóstico Laboratorial de Doenças lisossômicas

A investigação laboratorial de EIM deve ser realizada em indivíduos considerados de alto risco, isto é, indivíduos que apresentam um ou mais sinais ou sintomas que sugiram em um desses distúrbios (Coelho et al., 2001).

Sempre que houver suspeita de EIM é aconselhável a realização de testes de triagem e a cromatografia de aminoácidos. Para DL necessita-se de protocolos especiais que incluem o teste de azul de toluidina (para mucopolissacaridoses), as

cromatografias de oligossacarídeos (OLS) e sialiloligosacarídeos (SOLS) e a medida da atividade plasmática de algumas enzimas.

Uma vez detectada a DL através da triagem na urina ou pelo protocolo especial, parte-se para a confirmação diagnóstica específica que é realizada através da medida da atividade da enzima deficiente. Esta medida pode ser realizada em plasma, leucócitos ou fibroblastos cultivados.

Algumas DL não são detectadas nem pela triagem na urina e nem pelo protocolo especial, podendo ser detectadas diretamente através da medida da atividade enzimática realizada em plasma, leucócitos ou fibroblastos (Coelho et al., 2001).

As medidas das atividades das enzimas deste trabalho foram realizadas em fibroblastos cultivados a partir de biópsia de pele de indivíduos normais e, também, pelo re-cultivo de fibroblastos de indivíduos afetados, mantidos no banco de congelamento do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

II. JUSTIFICATIVA

II. Justificativa do Estudo

Laboratórios que realizam o diagnóstico para EIM utilizam, como primeira escolha, a medida da atividade enzimática em leucócitos por ser um método de coleta mais fácil, menos invasivo e por apresentar resultados em curto espaço de tempo. Entretanto, muitas vezes há a necessidade do cultivo de fibroblastos para confirmação diagnóstica. Embora a coleta da biópsia de pele seja um método mais invasivo e, o cultivo dos fibroblastos culmine em um resultado mais demorado, estas células possuem a vantagem de se manterem viáveis por longos períodos em nitrogênio líquido para estudos posteriores.

O laboratório de Cultura de Células do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre realiza o cultivo de fibroblastos com esta finalidade.

Para manter a integridade das culturas todos os procedimentos são realizados dentro da mais rigorosa assepsia. Além disso, faz-se, periodicamente, a detecção do micoplasma pelo método do corante fluorescente Hoechst (Chen, 1977). Em caso de contaminação, este laboratório utiliza o agente removedor de micoplasma (MRA) para eliminação do mesmo.

Nosso laboratório de cultivo celular, por estar localizado em um hospital-escola que presta atividades assistenciais e de pesquisa, talvez apresente uma maior probabilidade de contaminação por micoplasma, principalmente pelo fato de que a grande maioria do material recebido para cultivo é proveniente de vários locais do País. Em caso de detecção da contaminação, muitas vezes, é impossível descartar a cultura por tratar-se de material de paciente gravemente enfermo ou

que já foi a óbito. Estas razões nos fizeram investir na detecção e eliminação do micoplasma.

Existem dados na literatura referentes ao efeito tóxico da contaminação por diversas espécies de micoplasma em cultura de células animais, sobre a medida da atividade de algumas enzimas envolvidas em organelas como lisossomos, mitocôndrias e peroxissomas (McGarrity et al., 1984a; Clark et al., 1978; Almagor et al., 1983).

Dessa maneira, resolveu-se investigar o efeito do micoplasma e do antimicrobiano MRA sobre a medida da atividade das principais enzimas de referência, cuja atividade é medida no laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica, sendo elas: β -galactosidase, arilsulfatase A, β -glicosidase, β -glicuronidase, hexosaminidase (Total e A), arilsulfatase B e ?-glicosidase.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da contaminação por micoplasma, sem definição da espécie, em culturas de fibroblastos humanos de indivíduos normais e indivíduos com doenças lisossômicas (DL), sobre a medida da atividade das principais hidrolases lisossômicas realizadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Sendo elas: β -galactosidase; arilsulfatase A; β -glicosidase; hexosaminidase (Total e A); β -glicuronidase; arilsulfatase B; ?-glicosidase.

III.2. Objetivos específicos

1. Comparar a medida da atividade destas hidrolases em culturas de fibroblastos contaminadas por micoplasma, com culturas contaminadas, porém tratadas com o antimicrobiano agente removedor de micoplasma (MRA).
2. No caso do antibiótico ser um fator de interferência na medida da atividade, verificar o efeito deste, sobre estas medidas em culturas de fibroblastos isentas de contaminação.
3. Avaliar se a medida da atividade destas hidrolases nas três situações estudadas (culturas contaminadas, culturas contaminadas e tratadas com MRA e cultura isentas de contaminação acrescidas de MRA) comportar-se-á de maneira diferente daquela encontrada nas culturas isentas de contaminação, definidas, portanto, como grupo controle.
4. Uma vez investigado o comportamento destas hidrolases na presença do micoplasma e do MRA, em culturas de indivíduos normais, investigar qual seria o comportamento das mesmas em culturas de fibroblastos de indivíduos afetados para doenças lisossômicas de depósito.

IV. CAPÍTULO 1

Artigo 1

O artigo resultante deste capítulo foi aceito para publicação na revista *Clinical Biochemistry*, em 18 de janeiro de 2007.

**Comparison of the measurement of lysosomal hidrolase activity in
mycoplasma-contaminated and non-contaminated human fibroblast cultures
treated with mycoplasma removal agent**

Fernanda Timm Seabra Souza^{1,2}, Luana Souza Sostruznik^{1,2}, Roberta Casagrande
Scolari^{1,2} Karen Joana Maciel de Castro^{1,2}, Roberto Giugliani^{2,3}, Janice Carneiro
Coelho^{1,2*}

¹ Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

² Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Departamento de Genética, IB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Comparison of the measurement of lysosomal hydrolase activity in mycoplasma-contaminated and non-contaminated human fibroblast cultures treated with mycoplasma removal agent

Fernanda Timm Seabra Souza^{a,b}, Luana Souza Sostruznik^{a,b}, Roberta Casagrande Scolari^{a,b},
Karen Joana Maciel de Castro^{a,b}, Roberto Giugliani^{b,c}, Janice Carneiro Coelho^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Genética, IB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 1 February 2006; received in revised form 16 October 2006; accepted 18 January 2007

Available online 3 February 2007

Abstract

Objectives: To investigate the effect of both mycoplasma contamination and of its remover (MRA), through human fibroblasts culture over the activity of some lysosomal hydrolases.

Design and methods: Activity was measured in contaminated fibroblasts before and after the addition of MRA. Results were compared with the enzymatic activity in control fibroblasts with and without MRA.

Results: Only β -glucosidase showed no significant alteration in the presence of either mycoplasma or MRA. Total hexosaminidase and β -galactosidase underwent significant interference in the presence of the mycoplasma and the MRA. The % of hexosaminidase A and arylsulphatase A altered their activity only in the presence of MRA. β -Glucuronidase changed its activity only in the presence of mycoplasma.

Conclusions: The fibroblast enzymes behaved differently in the presence of MRA and/or mycoplasma, demonstrating the sensitivity of these hydrolases. Our work suggests that mycoplasma and MRA alter the activity of some lysosomal hydrolases.

© 2007 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Mycoplasma; Lysosomal hydrolase; Lysosomal storage diseases; Fibroblast cultures

Introduction

Mycoplasma contamination in cell culture laboratories represents a worldwide problem, especially when the cells are incubated in incubators and handled by more than one operator [1]. The absence of a cellular wall, which is the main characteristic of mycoplasma, and their size (about 300 nm in diameter) facilitate their passage through bacteriological filters [2,3].

Mycoplasma can infect primary cultivated cells or entire cell lines. These organisms cause diverse effects in cell cultures, causing alterations in the cellular metabolism, reduction in the

rate of cell division due to interference in the DNA, RNA and proteins, chromosomal aberrations and cellular death with detachment of the monolayer [4].

Infection rates in cell cultures vary in accordance with the interference factors in the manipulation existing in each laboratory [4]. Approximately 30% of cell cultures, with a variation of 15 to 80% present mycoplasma contamination [5]. While data in the literature show that many species of mycoplasma have been found in cell cultures, the species *A. laidlawii*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. hyorhina* and *M. fermentans* are the most frequently found, the first two being of human origin and the other three of animal origin. The contamination source may vary from foetal calf serum, trypsin, culture medium, operator handling and even laboratory cleaning procedures. The exchange of cellular lines between laboratories is considered a significant cause of contamination [4].

* Corresponding author. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre–RS, 90035-903, Brazil. Fax: +55 51 21018010.

E-mail address: jcoelho@hcpa.ufrgs.br (J.C. Coelho).

In laboratories that perform biochemical diagnosis for lysosomal diseases (LDs) by measuring enzymatic activity, the cultivation of fibroblasts is often necessary for diagnostic confirmation. In cases where such fibroblasts are contaminated by mycoplasma, it is important to know whether the contamination has or has not altered the measured activity.

The aim of this study was to test the activity of six lysosomal hydrolases: β -glucosidase, β -galactosidase, arylsulphatase A, total hexosaminidase (hexosaminidase A+hexosaminidase B), % of hexosaminidase A and β -glucuronidase, in 4 different conditions: mycoplasma contamination-free cultures, contamination-free cultures treated with the 4-oxo-quinolone-3-carboxylic acid antibacterial preparation, known as mycoplasma removal agent (MRA), untreated mycoplasma-contaminated cultures and contaminated cultures treated with MRA.

The hydrolases selected in the present work are those most frequently requested from our department by those treating lysosomal diseases.

Methods and materials

Samples

We used 39 fibroblast cultures. Twenty-three mycoplasma-free fibroblast cultures and sixteen cultures spontaneously contaminated with mycoplasma were used. These cells were obtained from skin fragments, cultured and stored in liquid nitrogen in the Genetic Medical Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The fibroblasts came from normal individuals who signed an informed consent term which was approved by the Ethics and Scientific Committee of HCPA.

These samples were divided into four groups:

- Mycoplasma-free cultures ($n=23$): cultures with complete absence of mycoplasma were denominated the cont 0 group.
- Mycoplasma-free cultures with MRA ($n=23$): part of the mycoplasma-free cultures used in cont 0 group were maintained in culture and treated with MRA. This group was denominated cont 1.
- Mycoplasma-contaminated cultures ($n=16$): these were infected spontaneously, by undefined species of mycoplasma, and detected with the use of a Mycoplasma Stain Kit from Sigma. This group was denominated test 0.
- Contaminated cultures treated with MRA ($n=16$): part of the contaminated cultures was maintained in culture and treated. This group was constituted test group 1 (test 1).

Cells were harvested while at near confluence and similar amount of proteins.

The cultures underwent physical isolation during handling in the laminar flow chamber and kept in incubators.

Human cell culture

Fibroblasts were cultured in tissue culture flasks (25 cm²; Corning Incorporated Corning, NY) containing 3 mL of nutrient

HAM-F10 (Cultilab Mat. Cult. Cel Ltda, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 20% foetal calf serum (GIBCO laboratories, Grand Island, NY). The cultures were kept in an incubator at 37 °C [6]. All tasks were performed in class II biosafety cabinets. This procedure was repeated until we obtained a sufficient number of cells for the enzyme assay.

Mycoplasma detection

Mycoplasma was detected with the use of a Mycoplasma Stain Kit from Sigma. The fibroblasts were stained with a "Hoechst Stain" solution [7,8]. Stained cells were observed with fluorescence microscopy with G365 excitation filters, an LP 420 barrier filter and an FT 395 chromatic beam splitter.

Decontamination of infected cells with MRA

The mycoplasma was removed in the test group by adding 100 μ L of MRA (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, C.A.) for each 10 mL of medium Ham-F10 with 10% foetal calf serum. After MRA addition, the cultures were maintained without handling for 10 days in an incubator at 37 °C. After this period, the cells were collected and the enzyme activities were measured. In order to confirm decontamination, the mycoplasma detection test was performed a second time in this group, prior to the collection of the fibroblasts.

Collection of cells for enzymatic analysis

The fibroblasts were then removed from the flask with trypsin–EDTA solution (Cultilab Mat. Cult. Cel Ltda, Campinas, SP, Brazil) and washed three times with PBS buffer. After centrifugation at 2000 \times g for 10 min at 4 °C (Hitachi, Himac CR 21E), the pellet containing the cells was kept frozen at –80 °C until protein content determination and enzyme activity assay.

Protein determination

Protein was determined with the method described by Lowry et al. [9].

Enzyme assay

Lysosomal enzyme activity in the cultured cells was assayed as previously described, using the respective appropriate substrates. Arylsulphatase A (4-nitrocathecol sulphate, potassium salt); β -glucosidase (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside); β -galactosidase (4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside); hexosaminidase A and total hexosaminidase (4-methylumbelliferyl- β -D-acetylglucosamine-6-sulphate) and β -glucuronidase (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) [10–15].

Statistical analysis

The results are reported as means \pm standard deviation. Mean variables were compared by ANOVA for repeated

measures. Statistical analysis was carried out using the SPSS/PC+statistical package, with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results

Comparison of lysosomal hydrolase activity measured in the presence or absence of mycoplasma

In the presence of mycoplasma the activity of arylsulphatase A, % of hexosaminidase A and β -glucosidase (Table 1) did not change.

The same was not true for β -galactosidase ($p < 0.001$), total hexosaminidase ($p < 0.012$) and β -glucuronidase ($p < 0.008$) (Table 1). These enzymes increased their activities significantly in the presence of mycoplasma when we compared with the cont 0 group.

Comparison of lysosomal hydrolase activity measured in contamination-free cultures in the presence or absence of MRA

The effect of MRA in mycoplasma-free fibroblast cultures was also tested. As can be seen in Table 1, MRA altered the activity of the enzymes arylsulphatase A, β -galactosidase, hexosaminidase total and % of hexosaminidase A.

The mycoplasma removal agent significantly increased enzymatic activity when added to mycoplasma-free cultures (cont 1): arylsulphatase A= $p < 0.001$; β -galactosidase= $p < 0.027$; total hexosaminidase= $p < 0.026$; % of hexosaminidase A= $p < 0.009$.

For the other tested enzymes (β -glucosidase and β -glucuronidase), no significant effect of MRA was observed on the enzymatic activity of contamination-free fibroblast cultures (Table 1).

Table 1

Lysosomal hydrolases activity (nmol/h/mg of protein) in fibroblast cultures without mycoplasma contamination (cont 0), without contamination and with MRA (cont 1), with mycoplasma contamination (test 0) and with contamination and MRA (test 1)^a

Groups	Cont 0 (n=23)	Cont 1 (n=23)	Test 0 (n=16)	Test 1 (n=16)
ASA	69.5±25.9	111.2±36.0 ^b	71.3±21.2	75.3±19.2
β -glico	404.3±153.9	477.8±130.2	476.8±126.7	452.1±124.5
β -gal	748.4±226.2	950.7±186.4 ^c	1188±347.2 ^b	1255±340.2
Total Hex	5770±2204	11,650±3 996 ^c	13,955±6831 ^d	13,888±6492
% Hex A	47.3±9.06	58.7±8.01 ^c	54.6±9.68	54.9±9.35
β -glicuro	125.2±58.4	87.9±31.6	170.3±107.9 ^f	184.7±64.7

ASA=arylsulphatase A, β -glico= β -glucosidase, β -gal= β -galactosidase, Total Hex=total hexosaminidase, % Hex A=% of hexosaminidase A and β -glicuro= β -glucuronidase.

^a The results are expressed as mean±standard deviation.

^b Statistically different from cont 0, $p < 0.001$.

^c Statistically different from cont 0, $p < 0.02$.

^d Statistically different from cont 0, $p < 0.012$.

^e Statistically different from cont 0, $p < 0.009$.

^f Statistically different from cont 0, $p < 0.008$.

Comparison of lysosomal hydrolase activity measured in cultures contaminated before and after the removal of mycoplasma by MRA

Once infected, the cultures were treated with MRA and the mycoplasma was removed. The enzymatic activity was measured before (test 0) and after MRA addition (test 1) and no alteration in values was noted.

For arylsulphatase A the enzymatic activity varied from 71.3±21.2 (test 0) to 75.3±19.2 nmol/h/mg of protein (test 1), for β -galactosidase from 1188±347.2 to 1255±340.2 nmol/h/mg of protein, for total hexosaminidase from 13,955±6831 to 13,888±6492 nmol/h/mg of protein, for β -glucuronidase from 170.3±107.9 to 184.7±64.7 nmol/h/mg of protein, for % of hexosaminidase A from 54.6±9.68 to 54.9±9.35% and for β -glucosidase from 476.8±126.7 to 452.1±124.5 nmol/h/mg of protein (Table 1).

Discussion

It is known that the effects produced by mycoplasma in cell cultures vary in intensity, from apparent absence of interference to reduction in the number of chromosomes in cells [16–18]. In the present study, we suggest that mycoplasma contamination (non-defined species) in human fibroblast cultures can lead to errors being made in the interpretation of results of enzymatic activity of 3 of the 6 lysosomal hydrolases studied: β -galactosidase, total hexosaminidase and β -glucuronidase.

Yet, in the measurement of the activity of the enzymes, arylsulphatase A, β -glucosidase and % of hexosaminidase A, there was no alteration when mycoplasma was present in the cell culture. In 1983, Almagor et al. [19] in order to demonstrate that *M. pneumoniae* had the capacity to interfere in the catalase activity compared to the activity of this enzyme with that of some lysosomal hydrolases including the β -glucosidase. Their results showed that, although activity of the catalase was significantly inhibited by the presence of this of mycoplasma, the activity of the β -glucosidase did not change, exactly as we found in the present study. These authors did not verify the effect of mycoplasma removal antibiotics on the enzymatic activity.

Contamination with *M. hyorhinae* is common in fibroblast cultures in which foetal calf serum is used. Though this may interfere with cellular growth and multiplication, it does not influence the enzymatic activity of the respiratory chain. Consequently, it is irrelevant for those cell culture laboratories where mitochondrial defect detection is carried out [20].

On the other hand, there are reports in other studies that suggest the interference of *M. pneumoniae* increasing the activity of non-lysosomal enzymes, such as pyruvate dehydrogenase, present in the mitochondria [21].

This same species may inhibit catalase activity in peroxisomes [19]. There are also reports of the effects of non-defined species of mycoplasma, on the activity of pyruvate dehydrogenase and its complex in fibroblast cultures [22].

In another study, the effects of *M. fermentans* contamination in mice tissue on lysosomal enzymes were assessed, and an increase in the β -glucuronidase activity was demonstrated [23].

The mechanism, by which the mycoplasma interferes in the host cell and alters some lysosomal hydrolase activity, is not well understood. The increase in enzymatic activity could be explained by a probable increase in the number of lysosomes, representing an attempt to perform phagocytosis of the mycoplasma. Previous studies have reported increased numbers of secondary lysosomes in fibroblast cultures from felines, representing an attempt by hydrolytic enzymes to degrade the mycoplasma [24].

Research needs to be carried out to establish whether such observed increases in enzymatic activity are simply due to an increase in the number of lysosomes or whether it represents the sum of the measure of hydrolase activity of the host cell with that of the hydrolase from the mycoplasma. The presence of glycosidase activities in mycoplasma species was reported yet by Kahane et al. [25].

We do not know whether the presence of mycoplasma can alter the activity of these enzymes to the degree of inducing a false-negative result. This hypothesis can only be tested with the study of contaminated fibroblasts from individuals affected by lysosomal diseases in which these enzymes are deficient.

When we used an antibacterial agent (MRA), in no contaminated cultures, it can be noted that this agent increased the enzymatic activity of four enzymes analysed. It suggests that, in the same way as the mycoplasma, this could be also an interference factor in the measurement of enzymatic activity. Probably, this quinolone-type antibacterial agent is responsible for the alteration in the measurement of the activity of these enzymes.

In another study, carried out by our group, an alteration was observed in the activity of the β -glucosidase enzyme in fibroblast cultures in the presence of the antibacterial agent amikacin, an aminoglycoside [26].

Exposing cultures to antibacterial treatment may lead to several problems, such as (a) bacterial resistance to the antibacterial agent [3,27]; (b) decreased cell growth and reduction in lifespan of the cells in culture [28]; (c) inhibition of protein synthesis in primary cultures [29]; and (d) increase in the number of lysosomes in the fibroblasts [30]. In this study, we observed that MRA did not affect the cellular viability when we used the trypan blue method (data not shown).

However, the above problems do not invalidate the use of MRA with the objective of mycoplasma elimination in cultures that could not be discarded.

Rules of asepsis like physical isolation of samples that arrive at the laboratory and mycoplasma detection still are the best protection of the laboratory environment [31]. This represents the ideal protocol for achieving reliable laboratory diagnoses.

Various procedures for maintaining and monitoring cell cultures are included in the cell culture routine. The cell types used in this experiment were fibroblasts which originated in skin biopsies maintained in liquid nitrogen. Although the recovered fibroblast cultures (both contaminated and contam-

ination-free) had been manipulated simultaneously, the fact that they came from different individuals meant that they had different cell growth and proliferation cycles. Consequently these factors, not controlled in the experiment, also could have been a reason for the variation in the results of the enzymatic activities.

The results obtained in this work suggested that the fibroblast enzymes behaved differently in the presence of MRA and/or mycoplasma, demonstrating the sensitivity of these hydrolases. Considering the variations observed for some of the lysosomal hydrolases tested, contamination prevention employing aseptic techniques needs to be further studied as it may have a clinical impact.

Acknowledgments

We would like to thank to FAPERGS and GPPG-HCPA.

References

- [1] Cumino AC, Córdoba P, Zapata TM. Presence of *Mycoplasma* in laboratory cell cultures from Córdoba, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 1998;30:147–53.
- [2] Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* 1989;171:6455–67.
- [3] Taylor-Robinson D, Bébéar C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasma and treatment of mycoplasmal infections. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:622–30.
- [4] Timenestky J, Miyaki C, Mendes IF, Rizzo E. Identification of mycoplasma samples isolated from cell cultures by the growth inhibition test. *Rev Saúde Públ* 1992;26:17–20.
- [5] Jung H, Wang SY, Yang IW, et al. Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. *Chang Gung Med J* 2003;26:250–8.
- [6] Coelho JC, Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Gen Mol Biol* 2000;23:269–71.
- [7] Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977;104:255–62.
- [8] Mc Garrity GJ. Prevention and control of mycoplasmal infection of cell culture. In: Razin S, Tully JG, editors. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press; 1983. p. 203–10.
- [9] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [10] Lee-Vaupeul M, Conzelmann E. A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin Chim Acta* 1987;164:171–80.
- [11] Peters SP, Coyle P, Glew RH. Differentiation of beta glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys* 1976;175:559–62.
- [12] Suzuki K. Globoide cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. In: Glew RH, Peter SP, editors. *Practical enzymology of the sphingolipidoses*. New York: Alan R. Liss; 1977. p. 101–36.
- [13] Singer JD, Cotlier E, Krimmer R. Hexosaminidase A in tears and saliva for rapid identification of Tay–Sachs disease and its carriers. *Lancet* 1973;2:1116–9.
- [14] Bayleran J, Hechtman P, Saray W. Synthesis of 4 methylumbelliferyl-beta-D-N-acetylglucosamine-6-sulfate and its use in classification of GM2-gangliosidosis genotypes. *Clin Chim Acta* 1984;143:73–89.
- [15] Beudet AL, Diferrante NM, Ferry GD, Nichols BL, Mullins CE. Variations in the phenotypic expression of beta-glucuronidase deficiency. *J Ped* 1975;86:388–94.
- [16] Mc Garrity GJ, Kotani H. Cell culture mycoplasmas. In: Razin S, Tully JG, editors. *The mycoplasma*, vol. 4. New York: Academic Press; 1984. p. 353–86.
- [17] Sansone EB, Jonas LA. Assessment of environmental contamination

- associated with a mammalian cell transformation assay. *In vitro* 1981;17:810–5.
- [18] Mc Garrity GJ, Vanaman V, Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. *In vitro* 1984;20:1–18.
- [19] Almagor M, Yatziv S, Kahane I. Inhibition of host cell catalase by *Mycoplasma pneumoniae*: a possible mechanism for cell injury. *Infect Immun* 1983;41:251–6.
- [20] Darin N, Kadhon N, Birère JJ, et al. Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Mycoplasma hyorhinis*. *BMC Biochem* 2003, doi:10.1186/1471-2091-4-15 [online in manuscript form].
- [21] Clark AF, Farrell DF, Burke W, Scott CR. The effect of mycoplasma contamination on the in vitro assay of pyruvate dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. *Clin Chim Acta* 1978;82:119–24.
- [22] Mc Garrity GJ, Constantopoulos G, Barranger A. Effect of mycoplasma infection on pyruvate dehydrogenase complex activity of normal pyruvate dehydrogenase complex-deficient fibroblasts. *Exp Cell Res* 1984;151:557–62.
- [23] Gabridge MG, Yip D-M, Hedges K. Levels of lysosomal enzymes in tissues of mice infected with *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 1975;12:233–9.
- [24] Larsson E, Brunk UT. Tem and Sem findings in cat fibroblasts cultivated in vitro with and without mycoplasma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1981;89:0–15.
- [25] Kahane I, Reisch-Saada A, Almagor M, Abeliuck P, Yatziv S. Glycosidase activities of mycoplasmas. *Zentralbl Bakteriol* 1990;273(4):300–5.
- [26] Souza FTS, Mello AS, Michelin K, Coelho JC. Effect of amikacin, chepalothin, clindamycin and vancomycin on in vitro fibroblast growth. *Gen Mol Biol* 2004;27:454–9.
- [27] Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of sufactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *App Env Microbiol* 1977:44–9.
- [28] Goetz IE, Moglebust R, Warren CJ. Effects of some antibiotics on the growth of human diploid skin fibroblasts in cell culture. *In vitro* 1979;15:114–9.
- [29] Schwarze PE, Seglen PO. Effects of antibiotics on protein synthesis and degradation in primary cultures of rat hepatocytes. *In Vitro* 1981;17:71–6.
- [30] Aubert-Tulkens G, Van Hoof F, Tulkens MD. Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts. *Lab Invest* 1979;40:481–91.
- [31] Schmitt K, Däubener W, Bitter-Suermann D, Hadding U. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *J Immunol Methods* 1988;109:17–25.

V. CAPÍTULO 2

Artigo 2

O artigo resultante deste capítulo foi submetido na revista Clinical Biochemistry.

The effect produced by contamination with mycoplasma and the addition of the antimicrobial MRA in human fibroblast cultures on the measurement of acid hydrolases activity from patients with lysosomal diseases

Fernanda Timm Seabra Souza^{1,2}, Luana Souza Sostruznik^{1,2}, Roberta Casagrande Scolari^{1,2}, Karen Joana Maciel de Castro^{1,2}, Carla Vieira Andrade², Roberto Giugliani^{2,3}, Janice Carneiro Coelho^{1, 2*}

¹ Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

² Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³Departamento de Genética, IB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

The effect produced by contamination with *Mycoplasma* and the addition of the antimicrobial MRA in human fibroblast cultures on the measurement of acid hydrolases activity from patients with lysosomal storage diseases

Fernanda Timm Seabra Souza^{a,b}, Luana Souza Sostruznik^{a,b}, Roberta Casagrande Scolari^{ab}, Karen Joana Maciel de Castro^{a,b}, Carla Vieira Andrade^b, Roberto Giugliani^{b,3}, Janice Carneiro Coelho^{a,b}

^aDepartamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartamento de Genética, IB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: Mycoplasma and MRA – on the activity of lysosomal acid hydrolases.

Abstract

Background: This study was designed to evaluate the effect on acid hydrolases activity of contamination by mycoplasma and the action of MRA in cultures of human fibroblasts from individuals with Lysosomal Storage Diseases (LD). For this purpose, we measured the activity of the β -galactosidase, arilsulfatase B (ASB), hexosaminidase A and α -glucosidase enzymes.

Methods: The activity of the above-mentioned enzymes in fibroblasts contaminated by mycoplasma was measured before and after the addition of the MRA. The results were then compared to the enzymatic activity in contamination-free cultures.

Results: Only the arilsulfatase B enzyme demonstrated significant alteration in activity both in the presence of the mycoplasma and the mycoplasma removal agent (MRA). The remaining enzymes did not suffer significant interference from the presence of the two agents.

Conclusions: Of the four enzymes tested, three did not suffer significant alterations from the presence of the mycoplasma nor from the MRA. However, the activity measured in the ABS enzyme increased significantly in the presence of the mycoplasma and the MRA and could lead to a doubtful diagnosis. Therefore, we suggest that contamination should be prevented using aseptic techniques as well as the MRA in those cultures of human fibroblasts that cannot be discarded because diagnostic confirmation is still pending.

Introduction

Mycoplasma contamination is a recurring problem in cell culture laboratories especially those that work with human cells [1] These microorganisms are free living prokaryotes characterized principally by the lack of cell walls and having a small genome presenting only one pair of G + C bases[2].

Reports from various countries show that from 10 to 87% of the cell cultures are infected by mycoplasma [3,4,5]. The degree of contamination depends directly on the contaminating species, the control practices utilized, the efficiency of the procedures and the type of test applied.

The predominant species found in the cell cultures are: *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma arginini*, *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma fermentans* [4].

Although it is known that changes in the morphology of the cell cultures occur when infected by mycoplasma, the specific consequences in relation to cellular metabolism are not well understood [1].

For biological and environmental reason it is important to eliminate these agents both from cell cultures used for research and those intended for laboratory diagnostics.

Treatment with antibiotics is still considered the most effective procedure for elimination or deactivation of mycoplasma in cell cultures [6,3,7]. However, anti-microbial therapy is not successful in timely de-contamination and undesirable cytotoxicity effects can result in cell death as well as developing bacteria resistant to the antibiotic [3,7].

In a recent study we made with fibroblast cultures from normal individuals, we found that the activity of some lysosomal hydrolases increase significantly in the presence of mycoplasma. When MRA was added to these cultures, the mycoplasma was eliminated but the enzymatic activity remained unaltered [8].

In the present study we investigate the behavior of four lysosomal hydrolases (β -galactosidase, arilsulfatase B, hexosaminidase A, and α -glucosidase) in cultures of fibroblasts of patients with LD where the cultures were contaminated with mycoplasma and subsequently treated with MRA.

2. Methods and Materials

2.1 Samples

Cultures of fibroblasts from patients with LD previously diagnosed were obtained from the cell bank maintained by the Medical Genetic Service of the HCPA (*Hospital de Clínicas de Porto Alegre*). The LD used in this study were: GM1 gangliosidosis (β -galactosidase deficiency), mucopolysaccharidosis type VI (arilsulfatase B deficiency), Tay-Sachs disease (hexosaminidase A deficiency) and Pompe's disease (α -glucosidase deficiency).

These samples were divided into three groups:

(a) *Mycoplasma-free Cultures (n=5)*: these cultures were denominated the **control group (cont 0)** and were maintained in culture for approximately 30 days in complete physical isolation.

(b) *Mycoplasma contaminated Cultures (n= 5)*: these were infected spontaneously, by undefined species of mycoplasma, and detected with the use of a Sigma Mycoplasma Stain Kit. This group was denominated **(test 0)**.

(c) *Contaminated cultures treated with MRA*: a portion of the contaminated cultures, obtained after several passages, was maintained in culture and treated with MRA thus constituting a separate group **(test 1)**.

2.2 Human cell culture

Cells were cultured in tissue culture flasks (25 cm²; Corning Incorporated Corning, N.Y.) containing 3 mL of nutrient HAM-F10 (Cultilab Mat. Cult. Cel Ltda, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 20% fetal calf serum (GIBCO laboratories, Grand Island, N.Y.). The cultures were kept in an incubator at 37°C [9]. All tasks were performed in class II biosafety cabinets. This procedure was repeated until we obtained a sufficient number of cells for the enzyme assay.

2.3 Mycoplasma detection

Mycoplasma was detected by the use of a mycoplasma Stain Kit from Sigma. The fibroblasts were stained with a "Hoechst Stain" solution" [10,11]. Stained cells were observed with fluorescence microscopy with G365 excitation filters, an LP 420 barrier filter and an FT 395 chromatic beam splitter. These cells were kept in culture until we obtained a sufficient number of cells for the enzyme assay.

2.4 Decontamination of infected cells with MRA

The mycoplasma was removed in the test group by adding 100 μ L of MRA (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, C.A.) for each 10 mL of medium Ham-F10 with 10% SBF. The cultures were maintained without handling for 10 days in an incubator at 37°C. In order to confirm decontamination, the mycoplasma detection test was performed a second time in this group, prior to the collection of the fibroblasts.

The cultures were held in physical isolation during handling in the laminar flow chamber and while kept in the incubators.

2.5 Collection of cells for enzymatic analysis

The fibroblasts were then removed from the flask with trypsin-EDTA solution (Cultilab Mat. Cult. Cel Ltda, Campinas, SP, Brazil) and washed three times with PBS buffer. After centrifugation at 2,000 X g for 10 minutes at 4°C (Hitachi, Himac CR 21E), the pellet containing the cells was kept frozen at -80° C until required for protein content determination and enzyme activity assay.

2.6 Protein determination

Protein was determined using the method described by Lowry [12].

2.7 Enzyme assay

Lysosomal enzyme activity in the cultured cells was assayed as previously described, using the appropriate substrates. arylsulphatase B (4-nitrocatecol sulfato); β -galactosidase (4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside); hexosaminidase

A- as a % of total hexosaminidase (4-methylumbelliferyl- β -D-acetylglucosamine-6-sulfate) and β -glucosidase (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) [13 - 17].

2.8 Statistical analysis

The results are reported as means \pm standard deviation. Mean variables were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and when significant, by the Tukey and Duncan test. Statistical analysis was carried out using the SPSS/PC + statistics package, with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results

Comparison between the lysosomal activities of the hydrolases of fibroblasts of LD patients in the presence and in the absence of mycoplasma.

In Table 1, we observed that, both in the **cont 0** and the **test 0** groups, (cultures of fibroblasts with and without mycoplasma contamination), the measurement of the level of activity of lysosomal hydrolases remained below the limit considered normal in our laboratory, which confirms that these cultures are in fact cultures of affected individuals.

When we compared the activity of the lysosomal enzymes in contamination-free fibroblast cultures (**cont 0**) with that of the same enzymes in contaminated cultures (**test 0**), we observed (Table1) that, in three of the four hydrolases studied, there were no significant differences between the groups. Only the enzyme

arylsulfatase B activity increased significantly in the **test 0** group in relation to the **cont 0** group [$F(2.10)=14.91$; $p<0.001$].

Activity of the Lysosomal hydrolases in the contaminated cultures before and after treatment with the micoplasm removal agent (MRA).

A portion of these mycoplasma-contaminated cultures was kept in cultivation for treatment with MRA. After treatment for ten days, the detection test proved that these cultures were free of mycoplasma. New measurements of activity were then realized on the four hydrolases.

We observed that there had been no alteration in the measurement of enzymatic activity before (**test 0**) and after the MRA addition (**test 1**) in any of the enzymes studied. These results are illustrated in Table 1.

Comparison between the activity of the lysosomal hydrolases in contamination-free cultures and in those treated with MRA.

The enzymatic activity in contamination-free cultures (**cont 0**) was compared with that of the MRA-treated cultures (**test 1**), the α -glucosidase, β -galactosidase and hexosaminidase A, maintained the same activity in the two groups analyzed (table 1). However, the level of activity of the arylsulfatase B enzyme (table 1), increased significantly in the presence of the MRA ($p<0.001$).

Discussion.

Lysosomes are organelles surrounded by a membrane and containing internally various hydrolytic enzymes. When these enzymes appear with deficient activity levels they lead to infirmities known as lysosomal diseases. These diseases by themselves can cause, by the accumulation of non-degradable substrates, a generalized disorganization of the cellular components [18,19].

Deficient enzymes appear less often in individuals with LD than in those of normal individuals. This pattern of behavior applies both to *in vivo* and *in vitro* models.

A number of studies of *in vitro* models demonstrate the various cytogenetic effects in fibroblasts of contamination by micoplasma. These effects can prejudicate studies in mutagenesis, carcinogenesis, genetics, and isoenzyme analysis as well as clinical diagnosis [20].

Our group had previously investigated the effect of the mycoplasma and the MRA in fibroblast cultures of normal individuals on the activity of the β -glycosidase, β -galactosidase, hexosaminidase (Total and A), arylsulphatase A and β -glucuronidase enzymes [8]. Only the activity of the β -glucosidase enzyme remained unaltered when the enzyme was exposed to the mycoplasma or the MRA. The activity of total hexosaminidase and the β -galactosidase was significantly altered both by the mycoplasma and by the MRA but the activity of hexosaminidase A and the arylsulphatase A was altered only by the mycoplasma removal agent. The β -glucuronidase enzyme, however, increased its level of activity in the presence of the mycoplasma. Therefore, these results suggest that

the lysosomal hydrolases behave differently when exposed to the mycoplasma and/or the MRA.

Starting with these results, we investigated the behavior of the hydrolases (arylsulfatase B, β -galactosidase, hexosaminidase A and α -glucosidase) in cells from patients with LD.

The measurement of the level of activity of these enzymes, realized after the collection of the fibroblasts, in the three groups tested (**cont 0**, **test 0** and **test 1**) remained below the range of normality thus confirming the LD diagnostic.

When we compared the results of the measurement of the enzymatic activity in cells contaminated by mycoplasma (**test 0**) with those from cells free of contaminations (**cont 0**) we observed that the level of activity increased significantly only in the case of the arylsulfatase B. In this enzyme, we observed also the increase of activity when the cultures were treated with MRA. We performed a curve (data not shown), using three concentrations of MRA added to the assay (50 μ L, 100 μ L and 150 μ L), and then we observed that this agent stimulates, in a dose response effect, the ASB activity.

As regards the contaminated cultures (test 0) we did not observe any significant alteration in the results of the measurement of the enzymatic activity when the MRA was added to the cultures (test 1) in the four hydrolases we studied.

It is possible that the increase in the level of activity of the ABS enzyme, both in the presence of the mycoplasma and of the MRA could be confused with the values found in individual heterozygotes for the mucopolysaccharidosis type VI. In this case, to establish a precise diagnosis, it would be necessary to correlate the measurement of the enzymatic activity with the concentration and pattern of

excreted urinary glycosaminoglycans as well as with the general characteristics of the patient.

The increase in the measured levels of the lysosomal hydrolases in the presence of the mycoplasma was described in the 70's by Gabridge et al [21]. These authors described an increase in the activity of the β -glucuronidase enzyme in fibroblast cultures of mice in the presence of *M. fermentans*.

Other documentation on animal models describe the toxic effect of contamination by *M. fermentans* in cultures leading to a significant increase of the acid lysosomal hydrolases [22,23].

The mechanism by which the contamination by mycoplasma causes the increase of the enzymatic activity in cellular cultures is not well understood. It is known that contamination by mycoplasma can lead to profound interference in lysosomal vacuoles. Studies on feline fibroblasts demonstrate that the mycoplasma is moved by phagocytosis to the insides of the lysosomal vacuoles, but, notwithstanding this, complete degradation of the mycoplasma does not occur. In the attempt to degrade the mycoplasma, many secondary lisosomes are accumulated [24]. This accumulation may be one of the causes of the increase of the enzymatic activity.

On the other hand, the enzymes themselves, which are present inside the mycoplasmas, might be contributing to the increase in this activity.

Reports are found in the literature that the mycoplasmas in cellular cultures contribute isoenzymes that may cloud the research and confuse the results of the biochemical diagnosis [20].

The reason why the arylsulfatase B enzyme behaves differently to the others is not clear to us. There are reports in the literature on the antagonistic behavior of the acid phosphatase and β -glucuronidase enzymes when exposed to the mycoplasma which suggest that this may be caused by the differences in half-life of these proteins [21]

We believe that, although all the enzymes studied are lysosomal hydrolases, the behavior pattern may be related to specific aspects of each hydrolases.

Conclusion

In the present study, the contamination by mycoplasmas, and the use of MRA in the fibroblast cultures, interfered in the measurement of the activity of one of the four hydrolases we studied. This result means that biochemical diagnostic should be treated with great care due to this element of doubt. Therefore, to avoid dubious results, it is essential that the detection of the mycoplasmas be part of the routine and that, in those cultures which might be contaminated, (but which cannot be discarded), the anti-microbial MRA should be used with care and criteria. In this way, the patient is assured of a faithful laboratorial diagnosis.

References

[1] Darin N, Kadhom N, Birère JJ. Chretien D, Bébéar CM, Rötig A, Munnich A, Rustin P: Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Mycoplasma hyorhinis*. BMC Biochem 2003, 10.1186/1471-2091-4-15 {For papers published online in manuscript form.}

- [2] Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel P, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Etten Van J, Maniloff J, Woese CR. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol* 1989;**171**: 6455 -67.
- [3] Barile MF, Yoshida H, Roth H. Rheumatoid arthritis: new findings on the failure to isolate or detect micoplasma by multiple cultivation or serologic procedures and review of literature. *Rev. Infect. Dis* 1991;**13**:51-82
- [4] Bolske G. Survey for micoplasma infection in cell cultures and a comparison of detection methods. In: *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1988;**269**:331-340.
- [5] McGarrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasma and tissue culture cells. In *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Edited by Maniloff J, McElhaney RN, Finch, LR, Baseman. Washington: American Society for Microbiology 1992;445-454.
- [6] Anaby V, and Naot, Y. The mitogenic components of *Mycoplasma penetrans*. *IOM Lett* 1996; **4**:67.
- [7] Baseggio N, Glew MD, Markham PF, Whithear KG, Browning GF. Size and genomic location of the pMGA multigene family of *Mycoplasma gallisepticum*. *Mycrobiology* 1996;**142**:1429-1435.
- [8] Souza FTS, Sostruznik LS, Scolari RC, Castro KJM, Giugliani R, Coelho JC. Comparison of the measurement of lysosomal hydrolase activity in micoplasma-contaminated and non-contaminated human fibroblast cultures treated with micoplasma removal agent. *Clinical Biochem* 2007;**40**:521-525.

- [9] Coelho JC, Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Gen Mol Biol* 2000;**23**:269-271.
- [10] Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977;**104**: 255-262.
- [11] McGarrity GJ. Prevention and control of mycoplasmal infection of cell culture. In *Methods in Mycoplasmaology. Volume 2*. Edited by Razin S, Tully JG. New York Academic Press 1983;203-210.
- [12] Lowry OH, Rosebrouch NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**193**: 265-275.
- [13] Kresse H, Von Figura K, Klein U, Glossi J, Paschke E, Pohlmann R. Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods Enzymology* 1982;**83**:553-559.
- [14] Suzuki K. Globoide cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. In *Practical enzymology of the sphingolipidoses*. Edited by R.H. Glew SP, Peter. New York Alan R. Liss 1977;101-136.
- [15] Singer JD, Cotlier E, Krimmer R. Hexosaminidase A in tears and saliva for rapid identification of Tay-Sachs disease and its carriers. *Lancet* 1973;**2**:1116-1119.
- [16] Bayleran J, Hechtman P, Saray W. Synthesis of 4 methylumbelliferyl- β -D-N-acetylglucosamine-6-sulfate and its use in classification of GM2-glangliosidosis genotypes. *Clin Chim Acta* 1984;**143**:73-89.

- [17] Butterworth J and Broadhead DM. Diagnosis of Pompe's disease in cultured skin fibroblasts and primary amniotic fluid cells using 4-methylumbelliferyl- α -glucopyranoside as substrate. *Clin Chim Acta* 1977;**78**:335-342.
- [18] Mueller RF, Young ID. Biochemical Genetics. In *Emery's Elements of Medical Genetics*. 9th edition. New York: Churchill Livingstone 1995.
- [19] Chon RM, Roth KS. Metabolic Diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1983.
- [20] McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. *In vitro* 1984;**20**:1-18.
- [21] Gabridge MG, Yip D-M, Hedges K. Levels of lysosomal enzymes in tissues of mice infected with *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 1975;**12**:233-239.
- [22] Janoff A, Weissmann G, Zweifach BW, Thomas L. Pathogenesis of experimental shock. IV. Studies on lysosomes in normal and tolerant animals subjected to lethal trauma and endotoxemia. *J. Exp. Med* 1962;**116**:451-466.
23. Weissmann G, Thomas L Studies on lysosomes. The Effects of endotoxin tolerance and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver. *J Cell Biol* 1964;**22**:115-126.
24. Larsson E, Brunk UT. TEM and SEM findings in cat fibroblasts cultivated in vitro with and without mycoplasma. *Acta Path Microbiol Scand* 1981;**89**:0-15.

Table 1. Lysosomal hydrolases activities in fibroblast cultures from patients with lysosomal diseases^a.

Group	β -gal (n =5)	ASB (n =5)	Hexo A (% Hex T) (n = 5)	α -gluco (n = 5)
Cont 0	8.80 \pm 7.35	31.25 \pm 10.04	7.02 \pm 0.52	1.58 \pm 1.91
Test 0	5.66 \pm 2.88	93.40 \pm 23.52*	6.23 \pm 1.41	0.56 \pm 0.68
Test 1	10.66 \pm 2.08	126.0 \pm 35.25*	6.39 \pm 1.40	0.26 \pm 0.58
Normal range	394 - 1440	327 - 430	46 - 81	21 -139

^a Lysosomal enzymes specific activity was determined as nanomoles of hydrolyzed substrate per hour per milligram of protein. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

* Significant difference in control group as evidenced by ANOVA, followed by Duncan and Tukey tests; $p < 0.001$.

VI. DISCUSSÃO

Micoplasmas são os menores procariontes encontrados difundidos nos endossomas das células animais. Devido ao seu reduzido genoma, estes organismos necessitam dos nutrientes das células hospedeiras para seu crescimento e sobrevivência. Através de uma íntima associação com a membrana celular do hospedeiro, adquirem substâncias como gordura, colesterol e precursores de ácido nucléico (Rottem, 2003).

Estes patógenos são infectantes do trato respiratório, urogenital, superfícies da mucosa oral e ocular dos animais e do homem. Além dos mamíferos, esses organismos são encontrados em peixes, aves, répteis, artrópodes e também no solo, na água e em algumas plantas. Por essa amplitude de distribuição, acabam por causar diversas doenças, cujos sinais clínicos podem se apresentar na forma aguda, porém, normalmente são de caráter crônico (Timenetsky, 2006).

Além da contaminação em animais, solo e plantas, os micoplasmas também são responsáveis por inoportunas e persistentes infecções em células de cultivo primário ou de linhagem.

Devido ao seu tamanho diminuto, acabam passando pelos filtros bacteriológicos e, conseqüentemente, acarretando em um problema mundial aos laboratórios de cultivo celular (Weisburg, 1989).

O primeiro relato de infecção por micoplasma em cultura celular data de 1956 por Robinson e colaboradores. Confirmou-se, posteriormente, por vários autores, o fato de que a presença do micoplasma em linhagens celulares era um evento extremamente comum (Miyaki et al., 1989).

As taxas de infecção por micoplasma em culturas celulares variam de acordo com fatores interferentes, que vão desde a manipulação até o modo de cultivo de cada laboratório.

Os micoplasmas embora sejam contaminantes muito freqüentes, passaram a ser melhor monitorados através de técnicas avançadas de detecção. Embora essas técnicas sejam facilmente executadas, a proteção e descontaminação das culturas demandam sérios desafios (Nir-Paz et al., 2002).

Trabalhos realizados *in vitro* mostram os diversos efeitos citogenéticos causados pela contaminação por micoplasmas em culturas de células. Estes efeitos podem comprometer estudos em mutagênese, carcinogênese, genética, análise de isoenzimas e diagnósticos clínicos (McGarrity et al., 1984b).

Pensando neste problema, os laboratórios de cultivo celular reforçam os cuidados na assepsia dos materiais e equipamentos, na atenção do operador e na prévia detecção do micoplasma nos meios de cultivo, contribuindo dessa maneira, para a redução na taxa de recorrência das contaminações. Além disso, a introdução do uso de antimicrobianos aos meios de cultivo celular minimizou os problemas de contaminações nestes laboratórios.

Embora os antimicrobianos tenham sido de grande valia na eliminação da contaminação, vale destacar que, quando usados indiscriminadamente, são capazes de ocasionar diversos problemas no cultivo celular que envolvem desde a resistência bacteriana até interferências no metabolismo celular (Taylor-Robinson e Bébéar, 1997; Goetz et al., 1979).

Quando o micoplasma é detectado em linhagens celulares, o primeiro passo consiste na eliminação destas culturas. Se estas não são passíveis de

descartes, passam a ser isoladas, fisicamente, das culturas saudáveis, para logo a seguir, receberem tratamento com antimicrobianos.

Os micoplasmas por não apresentarem parede celular, são resistentes a todos os antimicrobianos que agem sobre a mesma como é o caso dos β -lactâmicos. Entretanto, existem diversos outros antimicrobianos que sozinhos ou combinados apresentam eficácia na eliminação destes microorganismos.

Sendo assim, a proposta deste estudo foi investigar, em culturas de fibroblastos humanos, uma possível interferência do micoplasma sobre a medida da atividade de algumas hidrolases lisossômicas utilizadas para o diagnóstico de doenças lisossômicas (DL) no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do HCPA. E, em caso de contaminação, o tratamento com o antimicrobiano removedor de micoplasma (MRA), uma fluorquinolona, também poderia ser fator de interferência na medida destas hidrolases.

Uma vez investigados estes prováveis interferentes (micoplasma e MRA), passou-se a investigar se eles poderiam acarretar em um diagnóstico duvidoso para indivíduos com DL.

Na primeira parte da investigação trabalhamos com culturas de fibroblastos de indivíduos normais isentas de contaminação e culturas contaminadas espontaneamente por micoplasma. Tanto numa cultura como na outra, foi realizada a medida da atividade enzimática antes e após a adição do agente removedor de micoplasma (MRA).

As enzimas investigadas foram: β -galactosidase, β -glicosidase, arilsulfatase A, β -glicuronidase, hexosaminidase (total + A).

Os resultados desta primeira parte do experimento, revelaram ser o micoplasma fator de interferência em 3 das 6 hidrolases lisossômicas estudadas: β -galactosidase, hexosaminidase Total e β -glicuronidase.

Houve um aumento na média da atividade destas enzimas nas culturas contaminadas, em relação às culturas isentas de contaminação.

Diferentemente das enzimas acima, a β -glicosidase, a arilsulfatase A e a β -glicuronidase não sofreram alteração significativa na presença do micoplasma (Souza et al., 2007).

O comportamento antagônico de hidrolases lisossômicas, na presença do micoplasma, já foi descrito na literatura.

Existem estudos que comprovam a interferência do micoplasma sobre a medida da atividade de algumas enzimas, como em trabalhos de Clark e colaboradores (1978) e McGarrity e colaboradores (1984a) que relatam o efeito da contaminação por micoplasma na medida da atividade da enzima piruvato desidrogenase em culturas de fibroblastos. Também Gabridge e colaboradores (1975) referem um aumento da atividade da β -glicuronidase na presença do *M. fermentans* em tecidos de ratos. Outros trabalhos como de Weissmann e Thomas (1964) e Larsson e Brunk (1981) relatam, em modelos animais, o efeito tóxico da contaminação pelo *M. fermentans* em culturas, levando a um aumento significativo de hidrolases lisossômicas ácidas.

Em contrapartida, existem estudos que reforçam os resultados encontrados em nosso trabalho, para aquelas enzimas que não sofreram alteração na medida

de suas atividades na presença do micoplasma, como é o caso de Almagor e colaboradores (1983). Estes autores relatam a não interferência da contaminação do *M. pneumoniae* sobre a atividade das enzimas α -glicosidase, β -glicosidase, α -galactosidase e β -galactosidase em fibroblastos humanos, embora esta contaminação venha a alterar, consideravelmente, uma enzima peroxissomal (catalase).

A variação no comportamento destas hidrolases pode estar relacionada com diferentes respostas que dependem: da(s) espécie(s) contaminante(s), do grau de contaminação, da duração da contaminação e do tipo de enzima.

Além disso, em nossa pesquisa, as culturas com e sem contaminação, embora tratadas simultaneamente, apresentam diferentes ciclos de crescimento e proliferação celular. Conseqüentemente, estes fatores não controlados no experimento, poderiam ser, também, motivo para variação na medida das atividades enzimáticas.

Acreditamos na hipótese de que o micoplasma possa aumentar a atividade enzimática, ou pelo somatório da atividade de suas próprias enzimas com aquelas das células em cultivo ou pela ação dos lisossomos em fagocitar estes microorganismos o que aumentaria o número destas organelas e, conseqüentemente, o número de hidrolases.

Estas situações já foram descritas na literatura em trabalhos de McGarrity e colaboradores (1984b) que relataram que os micoplasmas, em cultura de células, podem contribuir com isoenzimas confundindo resultados de pesquisa e diagnóstico. Hamet e colaboradores (1980) estimam que 25% do total das

proteínas de culturas infectadas poderiam ser do próprio micoplasma. Dessa maneira, os micoplasmas produziram extensivas mudanças nas culturas celulares.

Larsson e Brunk (1981) demonstraram, em fibroblastos de felinos, que os micoplasmas são fagocitados dentro dos vacúolos lisossômicos e que, embora haja esta fagocitose, este fenômeno não promove a completa degradação destes microorganismos. Nesta tentativa de degradação dos mesmos, ocorreria um acúmulo de lisossomos secundários.

O mecanismo de patogênese do micoplasma nas células hospedeiras é um problema de difícil entendimento. De acordo com Upchurch e Gabridge (1983), há muitos fatores envolvendo esta dinâmica de interações que inclui o metabolismo da célula hospedeira, o metabolismo do próprio micoplasma e até mesmos fatores externos como o meio e o soro.

Na continuidade do experimento, quando foi acrescentado o antimicrobiano MRA nas culturas sem contaminação por micoplasma, observamos que este antimicrobiano não alterou a atividade das enzimas β -glicosidase e β -glicuronidase, porém interferiu, significativamente na medida da atividade da hexosaminidase total, hexosaminidase A, β -galactosidase e arilsulfatase A (Souza et al., 2007). Nestas culturas, a medida da atividade das hidrolases acima foi maior que nas culturas sem contaminação e sem tratamento. Embora este antimicrobiano não esteja atuando sobre o fator infectante (micoplasma), parece interferir no metabolismo celular de maneira a aumentar a atividade de algumas hidrolases lisossômicas.

A medida da hidrolase β -glicuronidase, embora não estatisticamente significativa, ficou diminuída na presença deste antimicrobiano. Vanderwalle (1996), descreveu um decréscimo significativo na atividade da enzima β -glicuronidase em células renais de camundongos na presença do antimicrobiano gentamicina, devido a alcalinização do pH nos lisossomos.

Diversos autores descrevem os efeitos de alguns antimicrobianos sobre o metabolismo celular. Bambeke e colaboradores (1998) descrevem, em cultura de fibroblastos de ratos, a ação do antimicrobiano azitromicina induzindo a diversas alterações morfológicas nos lisossomos. Regee e colaboradores (1989) relatam o efeito do antimicrobiano gentamicina sobre a morfologia dos lisossomos e de suas hidrolases. Outro trabalho, realizado por nosso grupo (Souza et al., 2004), relata o efeito do antimicrobiano amicacina sobre a atividade da enzima β -glicosidase.

Uma das hipóteses para esta interferência foi descrita por Aulbert-Tulkens (1979), que relata a inibição da degradação das proteínas na presença de altas concentrações de antimicrobianos. O aumento destas proteínas poderia, conseqüentemente, acarretar em uma variação nas medidas das hidrolases lisossômicas.

O mecanismo pelo qual o MRA interfere na célula hospedeira, alterando a atividade de algumas hidrolases lisossômicas é, para nós, ainda obscuro. Provavelmente, esta alteração seja secundária as mudanças na morfologia dos lisossomos. Dados da literatura não nos fornecem informações conclusivas para explicar o comportamento enzimático. O único fato que observamos foi que o aumento da atividade enzimática pelo MRA parece ser dose-resposta, ou seja,

quanto mais MRA foi adicionado às culturas, maior foi o aumento da atividade enzimática.

Já quando comparamos a medida da atividade das culturas contaminadas por micoplasma antes e após o tratamento com MRA, observamos que a ação deste não alterou significativamente a medida da atividade das 6 hidrolases estudadas.

Darin e colaboradores (2003), relatam que o tratamento com ciprofloxacina em culturas de fibroblastos humanos contaminados por *M. hyorhinis*, também não alterou significativamente a medida da atividade de algumas enzimas da cadeia respiratória quando comparado com aquelas atividades enzimáticas das culturas contaminadas e não tratadas.

Independente da atividade enzimática nas enzimas testadas estar alterada ou não, a medida das mesmas manteve-se praticamente igual após adição do MRA. Este antimicrobiano provavelmente atuou somente removendo o micoplasma encontrado no citoplasma das células, sem, no entanto, remover aqueles internalizados nos vacúolos lisossômicos (Larsson e Brunk, 1981), motivo pelo qual a medida da atividade não alterou após remoção do mesmo. No trabalho destes autores, foi utilizado o antimicrobiano canamicina, que removeu os micoplasmas, porém eles acreditam que a infestação retornaria, tão logo a proteção do antimicrobiano fosse abolida.

Trabalhos de Vollenbroich e colaboradores (1997) reforçam esta idéia. Eles relatam a ação de alguns antimicrobianos acrescidos às culturas celulares como as fluorquinolonas que só são capazes de bloquear o crescimento dos

micoplasmas, mas em alguns casos este bloqueio é incompleto, o que poderia levar ao retorno da contaminação.

Uma vez concluído que tanto a contaminação por micoplasma nas culturas quanto a ação do MRA nas culturas isentas de contaminação, poderiam ser interferentes na medida da atividade de hidrolases lisossômicas, pensou-se se esta interferência poderia acarretar em um falso negativo, para aqueles pacientes com DL. Será que estes agentes poderiam estar aumentando a atividade enzimática, de modo que o resultado desta equivalesse aquele de indivíduos normais? Neste caso, estaríamos diagnosticando indivíduos afetados como normais para estas doenças.

Para tanto, iniciou-se uma segunda investigação que teve como propósito verificar estes prováveis interferentes em culturas de fibroblastos de paciente previamente diagnosticados para DL. Foram selecionadas 4 enzimas (arilsulfatase B, β -galactosidade, hexosaminidase A, e α -glicosidase). Estas enzimas foram escolhidas por serem aquelas cujos fibroblastos de indivíduos afetados estavam disponíveis em nosso banco de células.

Neste estudo, em todas as culturas testadas (isentas de contaminação, contaminadas espontaneamente por micoplasma e culturas contaminadas e tratadas com MRA), os valores das atividades enzimáticas mantiveram-se abaixo do limite da normalidade estabelecido pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Isto garante que o diagnóstico da DL correspondente seja estabelecido.

Somente a enzima arilsulfatase B (ASB) aumentou significativamente a medida de sua atividade nas culturas contaminadas por micoplasma. Este aumento foi em torno de três vezes em relação à atividade das culturas controle.

Nas culturas contaminadas e tratadas com o MRA, novamente pôde-se observar que não houve alteração na medida da atividade enzimática nas 4 hidrolases estudadas, antes e depois da adição do mesmo.

Quando comparado a medida da atividade enzimática entre as culturas isentas de contaminação e culturas tratadas com MRA as enzimas α -glicosidase, β -galactosidase e hexosaminidase A mantiveram a mesma atividade nos dois grupos analisados. Porém, a enzima arilsulfatase B aumentou significativamente sua atividade na presença do agente removedor. Este aumento foi de aproximadamente quatro vezes em relação às culturas controle.

Embora três das hidrolases estudadas não tenham sofrido alteração nas medidas de suas atividades enzimáticas, tanto na presença do micoplasma quanto do MRA, a ASB aumentou nas duas situações propostas.

A média dos valores apresentados tanto na presença do micoplasma quanto do MRA, ficou aquém dos valores encontrados em fibroblastos de indivíduos afetados para doença conhecida como mucopolissacaridose tipo VI, onde há a deficiência desta enzima.

Neste caso, em se tratando da investigação de mucopolissacaridose tipo VI, para se estabelecer um diagnóstico preciso, seria necessário correlacionar a medida da atividade enzimática com os resultados da concentração e padrão de excreção de glicosaminoglicanos urinários, bem como a história clínica do paciente.

O mecanismo que levou ao aumento da atividade desta enzima pode estar relacionado com alguns eventos previamente discutidos como: o acúmulo de lisossomos secundários, o somatório das enzimas do próprio micoplasma e as especificidades das enzimas. Somados a estes eventos, poderia haver ação do MRA sobre o citoplasma sem atuar efetivamente sobre os micoplasmas internalizados nos vacúolos lisossômicos levando, dessa maneira, a re-infestação das culturas celulares.

Devemos levar em conta que, tratando-se de laboratórios de cultivo celular onde não se detecta a espécie de micoplasma, trabalha-se com a hipótese de que, pelo menos, uma das cinco espécies mais comuns em culturas celulares (*A. laidlawii*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. hyorhinis* e *M. fermentans*) possa ser a contaminante. Isto nos levar a pensar que se mais de uma espécie de micoplasma estiver envolvida na contaminação, o antimicrobiano talvez não seja capaz de agir sobre todas as espécies.

O Laboratório de Cultura do Serviço de Genética Médica do HCPA adotou o a detecção pelo corante fluorescente Hoescht por ser um método que apresenta algumas vantagens que vão desde sua alta sensibilidade de detecção (aproximadamente 99%) até a agilidade no resultado, além de ter um custo menos elevado.

Vale ressaltar que o laboratório trabalha com culturas celulares oriundas das mais diversas instituições. Por esse motivo, são adotadas técnicas mais eficientes de assepsia envolvendo cuidadosa desinfecção do local de trabalho, equipamentos de proteção individual para o técnico (luva, máscara, touca, propés,

avental cirúrgico), uso de tripsina, soro, meio de culturas de laboratórios fidedignos, capelas de fluxo laminar classe II etc.

Devido às características assistenciais e de pesquisa do referido laboratório, é comum que se receba amostras contaminadas que propiciam a contaminação cruzada apesar de todos os cuidados já descritos. Por isso, há a necessidade de manter-se na rotina a detecção do micoplasma e, para aquelas culturas que, porventura, estejam contaminadas e não possam ser descartadas, faça-se, de maneira criteriosa, o uso do antimicrobiano MRA, propiciando, dessa maneira, um diagnóstico laboratorial fidedigno.

Embora nos pacientes com DL somente a enzima ASB tenha sofrido alteração na medida de sua atividade tanto na presença do micoplasma quanto do MRA, é de se considerar que a prevenção da contaminação seja o ponto relevante do laboratório, de maneira que a esta não venha a ter um impacto importante no diagnóstico clínico-laboratorial.

O ideal seria manter um laboratório isento de contaminação através de técnicas assépticas específicas, mas como isto, na maioria das vezes, torna-se impossível, o uso do MRA pode ser aconselhado. Neste caso, deve-se ter em mente que a importância da inter-relação entre a clínica e o laboratório é fundamental, principalmente no caso da detecção de indivíduos afetados para mucopolissacaridose tipo VI.

Este trabalho pesquisou somente algumas das muitas enzimas envolvidas nas DL. É importante uma continuidade no sentido de pesquisar a influência do micoplasma e do MRA em outras hidrolases lisossômicas.

VII. CONCLUSÕES

1ª Parte: Investigação em cultura de Fibroblastos de indivíduos normais

- 1) A medida da atividade das enzimas hexosaminidase total, β -galactosidase e β -glicuronidase, em culturas de fibroblastos, foi significativamente alterada na presença do micoplasma, quando comparada com a atividade das mesmas enzimas em culturas isentas de contaminação.
- 2) As enzimas arilsulfatase A, hexosaminidase A e β -glicosidase não sofreram alteração significativa na medida de suas atividades em culturas contaminadas com micoplasma.
- 3) Quando foi adicionado o MRA às culturas contaminadas com micoplasma, não houve alteração estatisticamente significativa na medida da atividade em nenhuma das 6 hidrolases estudadas.
- 4) Em culturas isentas de contaminação, mas incubadas com o MRA, houve alteração estatisticamente significativa na medida da atividade das enzimas hexosaminidase total, β -galactosidase, arilsulfatase A e hexosaminidase A.
- 5) Em culturas isentas de contaminação, mas incubadas com MRA, não foi observada alteração significativa na medida da atividade das enzimas β -glicosidase e β -glicuronidase.

2ª Parte: Investigação em cultura de Fibroblastos de pacientes com DL

- 6) Três das 4 enzimas testadas, em culturas de fibroblastos de pacientes com doenças lisossômicas, (β -galactosidase, hexosaminidase A e α -glicosidase), não modificaram significativamente suas atividades na presença do micoplasma. A atividade observada estava abaixo do limite para indivíduos normais definido pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

- 7) Quando foi adicionado MRA às culturas contaminadas, as enzimas β -galactosidase, hexosaminidase A e α -glicosidase não sofreram alteração em suas atividades.

- 8) A enzima arilsulfatase B alterou significativamente sua atividade tanto na presença do micoplasma quanto na presença do MRA.

Considerações Finais

- 9) A contaminação por micoplasma em cultura de fibroblastos pode alterar a medida da atividade de algumas hidrolases lisossômicas.

- 10) Para culturas de fibroblastos contaminadas por micoplasma, o uso do MRA foi eficaz na remoção da contaminação, tornando seu uso importante para aquelas culturas que não podem ser descartadas.

- 11) Algumas hidrolases lisossômicas mantiveram suas atividades alteradas após o uso do MRA. Concluindo-se, que os critérios para seu uso devam ser restritos.

- 12) A alteração da medida da atividade da arilsulfatase B reforça que, em uma rotina de investigação para DL faz-se necessário, além do diagnóstico enzimático, ensaios complementares acrescidos da investigação clínica.

- 13) Medidas preventivas nos laboratórios de cultivo celular, incluindo técnicas avançadas de assepsia e detecção do micoplasma, ainda são as soluções mais adequadas para que os ensaios laboratoriais sejam o melhor suporte na investigação clínica.

VIII. REFERÊNCIAS

Almagor M, Yatziv S, Kahane I. Inhibition of host cell catalase by *Mycoplasma pneumoniae*: a possible mechanism for cell injury. *Infect Immun*, 1983; 41:251-256.

Amaral O, Marcão A, Pinto E, Ribeiro MG, Miranda MC. Análise do genótipo na prevenção das esfingolipidoses. *Arquivos de Medicina*, 1997; 11:24-26.

Aubert-Tulkens G, Van Hoof F, Tulkens MD. Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts. *Lab Invest*, 1979; 40:481-491.

Bambeke FV, Gerbaux C, Michot JM, d'Yvoire MB, Montenez JP, Tulkens PM. Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998; 42:761-767.

Battaglia M, Pozzi D, Grimaldi S, Parasassi T. Hoechst 33258 staining for detecting mycoplasma contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching. *Biotech Histochem*, 1994; 69:152-156.

Ben-Menachem G, Bystrom T, Rechntizer H, Rottem S, Rilfors L, Lindblom G. The physico-chemical characteristics of the phosphocholine containing glycosylglycerolipid MfGL-II govern the permeability properties of *Mycoplasma fermentans* *Eur J Biochem*, 2001; 268:3694-3701.

Blanchard A & Browing G. Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control. Horizon Bioscience, Wymondham Norfolk, UK, 2005; 603p.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Mycoplasma & Cell Wall Defective Bactéria, In: Jawetz EM & Adelberg's Medical Microbiology. 23th ed. New York: McGraw-Hill, 2004.

Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W. Isolating cells and growing them in culture. In: Molecular Biology of the cell. New York and London: Garland Science, 2002.

Carrel A & Burrows MT. Cultivation of adult tissue and organs outside the body. J Am Med Assoc, 1912; 55:1379-1381.

Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp Cell Res 1977; 104: 255-62.

Clark AF, Farrell DF, Burke W, Scott CR. The effect of mycoplasma contamination on the in vitro assay of pyruvate dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. Clin Chim Acta, 1978; 82:119-124.

Coelho JC, Vargas CR, Pereira ML, Giugliani R. Investigação Laboratorial de Erros Inatos do Metabolismo. In: Carakushansky G. Doenças Genéticas em Pediatria. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001; cap. 22, p. 196-205.

Cooper GM & Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. 5th ed. Hardcover, 2006.

Danks DM. Inborn errors of metabolism – a review of some general aspects. August. N.Z. J Med, 1981; 11:309-320.

Darin N, Kadhom N, Brière J-J, Chretien D, Bébéar CM, Rötig A, Munnich A, Rustin P. Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Micoplasma hyorhinis*. BMC Biochem, 2003; 10:1186/1471-2091-4-15 {online in manuscript form.}

Drexler HG & Uphoff CC. Contamination of cell cultures micoplasma. In: The Encyclopedia of Cell Technology. New York: (Spier, E., B. Griffiths, & A.H. Scragg, eds), 2000; 609-627.

Gabridge MG, Yip D-M, Hedges K. Levels of lysosomal enzymes in tissues of mice infected with *Mycoplasma fermentans*. Infec Immun, 1975; 12:233-239.

Gimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of Mendelian disease on human health. In: The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York: McGraw Hill, 2000.

Giugliani R. Erros Inatos do Metabolismo no Período Neonatal, In: Miura E, Prociandy R. Neonatologia. Princípios e Prática, 2^a ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997; cap. 58, p. 254-267.

Glew RH, Basu A, Prencz M, Remaley AT. Lysosomal storage diseases: Biology of Disease. Lab Invest, 1985; 53:250-269.

Goetz IE, Moklebust R, Warren CJ. Effects of some antibiotics on the growth of human diploid skin fibroblasts in cell culture. In vitro, 1979; 15:114-119.

Gong H, Zölzer F, von Recklinghausen G, Rössler J, Breit S, Havers W, Fotsis T, Schweigerer L. Arginine deiminase inhibits cell proliferation by arresting cell cycle and inducing apoptosis. Biochem Biophys Res Comm, 1999; 261:10-14.

Hamet M, Bonissol C, Cartier C. Enzymatic activities on purine and pyrimidine metabolism in nine micoplasma species contaminating cell cultures. Clin Chim Acta, 1980; 103:15-22.

Harrison M & Rae IF. General techniques of cell culture. Handbooks in Practical Animal Cell Biology. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

Harrison RG. Observations on the living developing nerve fibre. Proc Soc Exp Biol, 1907; 4:140.

Hasilik A & Neufeld EF. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts phosphorylation of mannose residues. J. Biol Chem, 1980; 25:4946-4950.

Hirschhorn R & Reuser AJJ. Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -glucosidase (Acid Maltase). In: CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly Valle (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease. vol 3, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001; 3389-3420.

Jolly J. Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animals en dehors de l'organisme. CR Soc Biol, Paris, 1903; 55:1266.

Jung H, Wang SY, Yang IW, Hsueh DW, Yang WJ, Wang TH. Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. Chang Gung Med J, 2003; 26:250-258.

Junqueira JC & Carneiro J. Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7^a ed. 2000.

Karam SM, Pires RF, Matte, U. Esfingolipidoses. In: Carakushansky G. Doenças Genéticas em Pediatria. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001. cap. 18, p. 177-184.

Koeberl DD, Kishnani PS, Cehn YT. Glycogen storage disease types I and II: Treatment updates. J Inherit Metab Dis, 2007; *in press*.

Kornfeld S, Lobel P, Dahms NM. Mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. J. Biol. Chem, 1989; 264:12115-12118.

Lambert PA, Mechanisms of action of antibiotics. In: Pharmaceutical Microbiology. Hugo WB & Russel AD eds. 6th ed. USA: Blackwell, 1998; 162-180.

Larsson E & Brunk UT. Tem and Sem findings in cat fibroblasts cultivated in vitro with and without mycoplasma. Acta Path Microbial Scand, 1981; 89:0-15.

McGarrity GJ, Constantopoulos G, Barranger A. Effect of mycoplasma infection on pyruvate dehydrogenase complex activity of normal pyruvate dehydrogenase complex-deficient fibroblasts. Exp Cell Res, 1984a; 151:557-562.

McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. In vitro, 1984b; 20:1-18.

Miyaki C, Pral MM, Gallina NMF, Rizzo E. Micoplasma como contaminante de cultura celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. São Paulo: Rev. Saúde Públ, 1989; 23:39-44.

Nir-Paz R, Prévost MC, Nicolas P, Blanchard A, Wróblewski H. Susceptibilities of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma hyorhinis* to membrane-active peptides and enrofloxacin in human tissue cell cultures. Antimicrobial Agents Chemother, vol. 46, 2002; 1218-1225

Pollitt RS, Green A, McCabe CJ, Booth A, Coopler NJ, Leonard JV, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Viridi NK. Neonatal screening for inborn errors of metabolism. Herat Technol Assess, 1997; 1:1-202. Online Copyright © - World Wide Web URL; <http://hta.nhsweb.nhs.uk>

Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Micoplasmas. American Society for Microbiology, vol 2, 1998; 1094-1156.

Razin S & Herrmann, R. Molecular and Pathogenicity of Mycoplasmas. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 572p.

Regee AL, Trump BF, Trifillis AL. Effect of gentamicin on the lysosomal system of cultures human proximal tubular cells. Endocytotic activity, lysosomal pH and membrane fragility. Biochem Pharmacol, 1989; 38:2527-2534.

Robinson LB, Wichelhausen RH, Roizman B. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science*, Vol. 124, 1956; 1147-1148.

Rottem S. Interaction of Mycoplasmas with Host Cells. *Physiol Rev*, 2003; 83:417-432.

Severini MHA, Giugliani R, Coelho JC, Sopelsa AM, Silva CD. High frequency of type GM1 Gangliosidosis in southern Brazil. *Clin. Genet*, 1999; 56:168-169.

Souza FTS, Mello AS, Michelin K, Coelho JC. Effect of amikacin, chepalothin, clindamycin and vancomycin on *in vitro* fibroblast growth. *Gen Mol Biol*, 2004; 27: 454-459.

Souza FT, Sostruznik LS, Scolari RC, Castro KJM, Giugliani R, Coelho JC. Comparison of the measurement of lysosomal hydrolase activity in micoplasma-contaminated and non-contaminated human fibroblast cultures treated with micoplasma removal agent. *Clinical Biochem*, 2007, *in press*.

Taylor-Robinson D & Bébéar C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasma and treatment of mycoplasmal infections. *J Antimic Chemoth*, 1997; 40:622-630.

Timenetsky J, Miyaki C, Mendes IF, Rizzo E. Identificação de micoplasma pela inibição de crescimento de amostras isoladas em culturas celulares. São Paulo: Rev. Saúde Pública, 1992; 26:17-20.

Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple micoplasma infection in cell cultures by PCR. Brazilian Journal of Medical and Biological, 2006; 39:907-914.

Timenetsky J. Micoplasmas. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~bmm/jorge.pdf>. Acesso em: 09 de agosto de 2006.

Tórtora GJ, Berdell RF, Cristine LC. Microbiologia 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Upchurch S & Gabridge M. De novo purine synthesis, purine salvage, and DNA synthesis in normal and Lesch-nyhan fibroblasts infected with *Mycoplasma pneumoniae*. Infection and Immunity, 1983; 164-171.

Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, MacLeod RAF, Quentmeier H, Steube K, Tümmler M, Voges M, Wagner B, Drexler HG. Sensitivity and specificity of five different micoplasma detection assays. Leukemia, vol. 6, 1992: 335-341.

Uphoff CC. & Drexler HG. Comparative antibiotic eradication of micoplasma infections from continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, 2002; 38:86-89.

Uphoff CC & Drexler HG. Eradication of micoplasma contaminations. *Methods Mol Biol*, 2005; 290:25-34.

Vanderwalle A. Stimulated secretion of lysosomal enzymes induced by drugs in transimmortalized proximal tubule mouse Kidney cells. *Cell Biol Toxicol*, 1996; 12:299-303.

Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a Lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *App Env Microbiol*, 1997; 44-49.

Wallace IJC, McCuster CA, McCornick D. The biochemical diagnosis of lysosomal storage diseases – a review of five years experience. *Irish J Med. Sci*, 1990; 159:203-209.

Wapper RS. Biochemical Diagnosis of Genetics Diseases. *Ped. Ann*, 1993; 22:282-297.

Watts RWE. A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses. *Philos Trans R Soc London B*, 2003; 358:915-919.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel P, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG Van Etten J, Maniloff J, Woese CR. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol*, 1989; 171: 6455 -6467.

Weissmann G, Thomas L: Studies on lysosomes. The Effects of endotoxin tolerance and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver. *J Cell Biol*, 1964; 22:115-126.

Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr*, 2004; 144:13-14

Wraith JE. Lysosomal disorders. *Semin Neonatal*, 2002; 7 :72-83 review.

Wraith JE. Limitations of enzyme replacement therapy: current and future. *J Inherit Metab Dis*, 2006; 29:442-447.