



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# Tratamiento de *Mycoplasma* sp. presente en líneas celulares animales

María Camila Ferrucho Calle

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá D.C., Colombia

2023

# Treatment of *Mycoplasma* sp. present in mammalian cell lines

**María Camila Ferrucho Calle**

Trabajo final presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ingeniería - Ingeniería Química**

Directora:

**Dra. Ing. Ana Isabel Ramos Murillo**

Codirector:

**PhD. Rubén Darío Godoy Silva**

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2023

There are only two ways to live your life. One is as though nothing is a miracle. The other is as though everything is a miracle.

**Albert Einstein**

## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

María Camila Ferrucho Calle

Fecha 31 de julio 2023

## Agradecimientos

Antes que nada, doy gracias a Dios por brindarme y abrirme las puertas en todos los momentos que creía que no podía más, solo él me regaló la paciencia, humildad, tenacidad y perseverancia en todos los momentos que simplemente creía que los resultados no daban.

Gracias a mi padres, mami solo tú con todo el amor, dedicación y las notas de alegría que no faltaron que me regalabas cada día mientras que te contaba mi día a día en el laboratorio fue lo mínimamente necesario para que sintiera que cada día se estaba avanzando a pesar de que no lo pareciera. Papi, gracias por esos momentos en los que sólo tú con tus conclusiones sabías que era lo podría estar pasando y me dabas consejos que aunque descabellados terminaban ser los más acertados en momentos en los que los resultados inesperados daban más preguntas que respuestas.

Gracias a mis abuelos, que no pararon de darme ánimo a pesar de los reveses que da la vida, esta tesis se inició a escribir cuando estábamos todos, ahora mi tía Claris hace parte de los muchos ángeles que me cuidan. Cumpliendo esa promesa de que estamos para cosas grandes en esta vida, te recuerdo a ti en este momento.

Gracias a Anita y el profe Rubén por los consejos, la ayuda y por abrirme las puertas es de este gran grupo de investigación que más que un grupo de profesionales buscando respuestas en el “quiasier científico” formaron una familia llena de personas que brinda apoyo, cariño, con el que se celebran los triunfos y se tratan de resolver los problemas.

Gracias a mi partner de laboratorio con él contaba en todo momento para poder resolver todos los problemas discutía posibles soluciones y simplemente formamos una amistad para simplemente vivir la vida cada día, Cami eres un ser humano y profesional increíble Gracias por todos los consejos y ayuda.

Gracias a todos los que hicieron de esta gran montaña rusa que culminó con este magnífico proyecto.

Gracias totales!

## Agradecimientos y Financiación

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones financiadoras que permitieron el desarrollo de este trabajo:

- Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, a través de la convocatoria UN Innova: Convocatoria de Proyectos para el Fortalecimiento de la Innovación en la Universidad Nacional de Colombia a partir del Desarrollo de Prototipos y Experiencias Piloto 2019-2021 (segunda cohorte), modalidad: Propuestas de escalamiento de prototipos, en el marco de la ejecución del proyecto de investigación *“Kit para la evaluación in vitro de la seguridad de productos cosméticos y de cuidado personal”*.
- Secretaría de Desarrollo Económico y el Fondo Cuenta Distrital de Innovación, Tecnología e Industrias Creativas (FITIC) de la Alcaldía de Bogotá D.C., a través de la convocatoria de Negocios Verdes Innovadores 2021.
- Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MINCIENCIAS) a través de la “Convocatoria Senainnova para el Fomento a la Innovación y desarrollo Tecnológico por la reactivación del País” 2022 - área estratégica bioeconomía, en el marco del proyecto: *“Implementación de un laboratorio de seguridad biológica in vitro para la evaluación de productos cosméticos y de cuidado personal”*, contrato 210 de 2022.
- INTEK GROUP SAS ([www.intekgroup.com.co](http://www.intekgroup.com.co)) y su *spin off* de base científica y tecnológica SAFELAB ([www.safelab.com.co](http://www.safelab.com.co)), a través de fuentes de financiación internas de sus Departamentos de Investigación, Desarrollo e Innovación.

## Presentación en eventos

**Presentación oral:** “Detección y tratamiento de *Mycoplasma* sp. presente en líneas celulares animales empleadas en la industria farmacéutica”.

Congreso Farmacoscética 2023

Bogotá D.C., Colombia

**Presentación tipo Póster:** “*Treatment of Mycoplasma sp. present in mammalian cell lines*”

14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European Congress of Applied

Biotechnology, 2023

Berlín, Alemania

## Resumen

Los cultivos celulares en la industria farmacéutica y cosmética requieren un estricto control de parámetros, incluyendo la contaminación por *Mycoplasma* sp., debido a sus efectos negativos en aspectos económicos y biológicos. En este estudio, se evaluó el tratamiento para eliminar *Mycoplasma* sp. en células L929 contaminadas. Se utilizaron tres métodos de detección (PCR, luminiscencia bioquímica y tinción con DAPI) para identificar eficazmente la presencia de *Mycoplasma* sp. y se determinó la concentración necesaria del tratamiento. Además, se comparó la velocidad de crecimiento de las células evaluadas y se realizó un ensayo de viabilidad con diferentes concentraciones de SDS para analizar su respuesta posterior al tratamiento.

Durante el estudio, se detectó la contaminación de las células L929 con *Mycoplasma* sp., y se confirmó la efectividad de los tratamientos con Plasmocin® y MRA para eliminar el patógeno. A pesar de ello, la presencia de *Mycoplasma* sp. causó cambios mínimos en la velocidad de crecimiento de las células evaluadas, especialmente entre las 120 y 144 horas de estudio. En este período, se observó una disminución en la velocidad de crecimiento en las células tratadas con MRA, mientras que las tratadas con Plasmocin® lograron recuperar su velocidad de crecimiento. Además, en el ensayo de viabilidad celular, el tratamiento demostró proporcionar una protección adicional contra el efecto citotóxico, especialmente en concentraciones mínimas de SDS. No obstante, se observaron ligeras modificaciones en la morfología celular, lo que indican cambios irreversibles debido a la contaminación con *Mycoplasma* sp. a pesar de la eficacia del tratamiento.

**Palabras clave:** Células L929, *Mycoplasma* sp., métodos de detección, viabilidad celular, velocidad de crecimiento, tratamiento.

## ***Abstract***

Cell cultures in the pharmaceutical and cosmetic industry require strict control of parameters, including contamination by *Mycoplasma* sp., due to its negative effects on economic and biological aspects. In this study, the treatment to eradicate *Mycoplasma* sp. in contaminated L929 cells was evaluated. Three detection methods (PCR, biochemical luminescence, and DAPI staining) were used to efficiently screen for the presence of *Mycoplasma* sp., and the necessary concentration of the treatment was determined. In addition, the growth rate of the evaluated cells was compared, and a viability assay was performed with different concentrations of SDS to analyze their response after treatment.

During the study, contamination of L929 cells with *Mycoplasma* sp. was detected, and the effectiveness of the treatments with Plasmocin<sup>®</sup> and MRA to eradicate the pathogen was confirmed. However, despite the effectiveness of the treatments, the presence of *Mycoplasma* sp. caused minimal changes in the growth rate of the evaluated cells, particularly between 120 and 144 hours of study. In this period, a decrease in the growth rate was observed in the cells treated with MRA, while those treated with Plasmocin<sup>®</sup> managed to recover their growth rate. Furthermore, in the cell viability assay, the treatment appeared to provide additional protection against the cytotoxic effect, especially at the lower concentrations of SDS that were evaluated. However, slight changes in cell morphology were observed, indicating irreversible alterations due to contamination with *Mycoplasma* sp. despite the efficacy of the treatment.

**Keywords:** L929 cells, *Mycoplasma* sp., detection methods, cell viability, growth rate, treatment.

## Tabla de Contenido

2.	Introducción .....	17
2.1	Líneas celulares .....	18
2.2	<i>Mycoplasma</i> sp. y sus características.....	21
2.3	Métodos de detección de <i>Mycoplasma</i> sp. cultivo de líneas celulares.....	23
2.3.1	Técnicas tradicionales con medio de cultivo y tinción directa e indirecta .....	24
2.3.2	Técnicas moleculares (NAT) .....	25
2.3.3.	Técnicas alternativas.....	26
2.4	Tratamientos de cultivos celulares contaminados con <i>Mycoplasma</i> sp.....	28
3.	Materiales y Métodos.....	31
3.1	Cultivos celulares y preparación de muestras .....	31
3.2	Métodos de detección de <i>Mycoplasma</i> sp.....	32
3.2.1.	Método de luminiscencia bioquímica .....	32
3.2.1	Técnica de inmunotinción con DAPI.....	33
<b>3.2.3.</b>	<b>PCR.....</b>	<b>34</b>
3.3	Contraste de métodos implementados para la detección de <i>Mycoplasma</i> sp. en cultivo celular	37
3.4	Tratamiento para erradicar <i>Mycoplasma</i> sp. ....	38
3.4.1.	Evaluación de la concentración efectiva del agente de remoción de <i>Mycoplasma</i> sp. en las células L929 contaminadas (L929 C).....	38
3.4.2	Tratamiento de <i>Mycoplasma</i> sp. en las células L929 nuevas contaminadas (L929 N cMc).....	40
3.5	Evaluación de la tasa de crecimiento celular y el efecto del proceso de erradicación en células contaminadas .....	42
3.5.1	Curva estándar.....	42
<b>3.5.2</b>	<b>Curva de crecimiento.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Ensayo de citotoxicidad con una sustancia de referencia.....</b>	<b>44</b>
3.7	Análisis estadístico .....	45
4	Resultados and discusión.....	47
4.1	Selección de métodos de detección de <i>Mycoplasma</i> sp. en líneas celulares de mamíferos	47
4.2	Ensayos de detección de <i>Mycoplasma</i> sp.....	49

4.2.1	Ensayo de sensibilidad de detección de <i>Mycoplasma</i> sp. mediante método de bioluminiscencia.....	49
4.2.2	.....	50
	Ensayo de sensibilidad del método molecular (PCR punto final) .....	50
4.3	Detección de <i>Mycoplasma</i> sp. en líneas celulares animales L929 con los métodos seleccionados .....	52
4.4	Efecto de la presencia de <i>Mycoplasma</i> sp. en líneas celulares contaminadas .....	56
4.4.1	Ensayo de eficiencia de erradicación de <i>Mycoplasma</i> sp. con diferentes concentraciones de Plasmocin® y MRA.....	60
4.5	Efecto de tratamiento de <i>Mycoplasma</i> sp. con las concentraciones de tratamiento seleccionadas.....	66
4.6	Ensayos de citotoxicidad de células contaminadas libres y tratadas, comparación del efecto del tratamiento.....	72
5	Conclusiones.....	77
5.1	Conclusiones.....	77
5.2	Recomendaciones .....	78
6	Anexos.....	79
7	Referencias.....	82

## Lista de figuras

Figura 1. Ensayos de sensibilidad de los kits de luminiscencia MycoAlert™ PLUS y de PCR con las muestras de la línea celular L929 Contaminada con Myoplasma sp. (L929 C).....	51
<b>Figura 2.</b> Contraste y detección de Mycoplasma sp, en la línea celular L929 en cultivo con los métodos de detección selección. ....	54
<b>Figura 3.</b> Evaluación de la proliferación de la línea L929 Contaminadas (L929 C), L929 Nuevas libres de Mycoplasma sp. (L929 NL) y Nuevas intencionalmente contaminadas con Mycoplasma sp. (L929 N cMc).....	60
<b>Figura 4.</b> Tratamiento de Mycoplasma sp. con diferentes concentraciones a lo largo del tiempo. ....	63
Figura 5. Efecto de Tratamiento de Mycoplasma sp. con diferentes concentraciones de tratamiento en la proliferación de la línea L929 Nc tratadas (L929 Nc T). ....	69
Figura 6. Imágenes microscópicas cualitativas de las células en estudio posterior a los ensayos de tratamiento con las diferentes concentraciones. ....	71
Figura 7. Evaluación del efecto del tratamiento de Mycoplasma sp. en la sensibilidad a la citotoxicidad con diferentes concentraciones de SDS. Comparación con la línea celular L929 Nuevas Contaminadas (L929 N cMc), L929 Nuevas libres de Mycoplasma sp.(L929N) .....	74
<b>Figura 8.</b> Curva de calibración de resazurina en una placa de 96 pozos de las células L929 C, lectura por triplicado. R2=0.996. X= células adheridas L929 C, Y= unidades relativas de fluorescencia.....	80
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración de resazurina en una placa de 96 pozos de las células L929 C, lectura por triplicado. R2=0.996. X= células adheridas L929C, Y= unidades relativas de fluorescencia.....	81

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Comparación de sensibilidad, límite de detección, tiempo y costo de los métodos de detección de Mycoplasma sp. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Volúmenes de los componentes ensayados para estandarizar la detección de Mycoplasma sp. mediante el kit MycoAlert™ PLUS.....	33
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los kits de PCR más empleados para la detección de Mycoplasma sp. en cultivos celulares.....	35
<b>Tabla 5.</b> Diseño experimental para estandarizar la detección de Mycoplasma sp. mediante PCR usando el kit abm G238. ....	37

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
<b>L929 N</b>	Células L929 Nuevas Libres de <i>Mycoplasma</i> sp.
<b>L929 C</b>	Células L929 contaminadas con <i>Mycoplasma</i> sp.
<b>L929 C-C</b>	Células L929 contaminadas con <i>Mycoplasma</i> sp. en cultivo
<b>L929 C-F</b>	Células L929 contaminadas con <i>Mycoplasma</i> sp. conservadas en crio preservación en tanque de nitrógeno
<b>L929 N cMc</b>	Células L929 Nuevas contaminadas con medio con <i>Mycoplasma</i> sp.
<b>L929 cT</b>	Células L929 contaminadas tratadas de la contaminación con <i>Mycoplasma</i> sp.
<b>L929 NT</b>	Células L929 nuevas tratadas de la contaminación con <i>Mycoplasma</i> sp.
<b>MRA</b>	“Mycoplasma Removal Agent”, Agente de remoción de <i>Mycoplasma</i> sp. quinolona para el tratamiento proveído por MP Biomedicals LLC
<b>FDA</b>	“Food and Drug Administration”, La Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
<b>USP</b>	“United States Pharmacopea”, Farmacopea de los Estados Unidos
<b>PCR</b>	“Polymerase chain reaction”, Reaccion en cadena de la polimerasa

## 1. Contexto

La creciente búsqueda de innovación para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, ha conllevado al aumento exponencial de la producción de biofármacos. Paralelamente, el uso de diferentes alternativas para su producción en el futuro ha aumentado el empleo de los cultivos de líneas celulares como plataforma de estudio en diferentes áreas del conocimiento (1). La aplicación de cultivos celulares se introdujo con la producción de vacunas, el estudio de tejidos, la regeneración celular y la función de los genes en la expresión de una enfermedad durante el siglo XX (2).

En el estudio y aplicación de cultivos celulares se han encontrado diversos puntos de control que pueden mantener la viabilidad de la línea celular y una óptima producción del producto deseado. Entre los parámetros a controlar están contemplados la aplicación de productos químicos, la contaminación por microorganismos, el microambiente del cultivo celular, entre otros(1). La contaminación celular se debe a la presencia de bacterias, hongos, virus o parásitos, principalmente por las bacterias pertenecientes al género *Mycoplasma* sp., que tienen la capacidad afectar la viabilidad celular y alterar características genómicas y biológicas que pueden conllevar a la pérdida de la línea celular (3). Por lo que, la presencia de este género bacteriano puede implicar pérdidas en la industria farmacéutica y afectaciones en los centros de investigación (4). En Colombia, la búsqueda de esta bacteria prevalece en el estudio de infecciones en animales y personas, principalmente debido a la relevancia en el impacto de los sectores productivos avícolas, pecuarios y cuidado sanitario de la población mediante una detección serológica, técnicas de ELISA y hemaglutinación(5). Sin embargo, su impacto en el uso de líneas celulares y continua de la búsqueda de la contaminación tiene una alta importancia en el plano académico e investigativo, aunque no se descarta que en el futuro la industria tenga mayor auge con el impulso nuevamente en la producción masiva de vacunas, como lo fue en el siglo XX (6).

Debido al impacto que puede tener la presencia de esta bacteria a nivel industrial “la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos” FDA y “Farmacopea de los Estados Unidos” USP, recomiendan realizar protocolos y procesos de seguimiento, con el fin de detectar líneas celulares contaminadas y controlar la posibilidad de contaminación (7). La técnica recomendada por los protocolos de control se fundamenta en el cultivo de las células en placas con medio de cultivo que permite determinar la presencia de contaminación en 28 días. Siendo el tiempo de ejecución su principal desventaja, se han empezado a estudiar técnicas alternas que permitan la detección del microorganismo que sean costo-eficientes para su uso en el estudio de líneas celulares (4).

Entre los métodos empleados se encuentran el análisis de ácidos nucleicos, que permiten de manera rápida la detección de ADN específico del microorganismo contaminante, este es el caso de PCR y PCR cuantitativa y el uso de microarreglos, estos métodos permiten la detección de *Mycoplasma* sp. e identificación de la especie contaminante. Sin embargo, su principal desventaja son los equipos necesarios para su empleo y la especificidad que requieren los cebadores (primers) para la detección e identificación del microorganismo (8).

Por otra parte, el desarrollo e implementación de métodos alternativos como la detección de enzimas específicas y la aplicación de receptores de lipoproteínas en enzimas recombinantes son otras variantes contempladas en la detección del patógeno. Estas se fundamentan en la detección de actividad enzimática mediante la generación de bioluminiscencia y, detección de receptores específicos mediante colorimetría. Siendo métodos de bajo costo, alta sensibilidad y prácticos pero que carecen de capacidad de detección y cuantificación del patógeno presente (9).

En consecuencia, la presencia de *Mycoplasma* sp. puede tener efectos en la velocidad de crecimiento de una línea celular y uno de los procesos más importantes a desarrollar en el laboratorio su detección oportuna. No obstante, la diversidad de métodos, el tiempo de implementación, el costo y el límite de detección representan criterios de selección importantes para la implementación de un método de detección óptimo. Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto del tratamiento para la eliminación de *Mycoplasma* sp. en la velocidad de crecimiento de la línea celular animal L929 contaminada.

## 2. Introducción

La investigación en el campo de la biología ha experimentado un aumento significativo, lo que ha permitido transformar las posibilidades de estudio de la unidad más básica de la vida: la célula. Esto ha llevado a avances e innovaciones tanto en el ámbito terapéutico como científico. En particular, se ha empleado esta plataforma en la producción de biofármacos para tratar una amplia gama de enfermedades (10). En 1982, la FDA aprobó el uso terapéutico de biofarmacéuticos en respuesta a la necesidad de desarrollar enfoques innovadores para tratar enfermedades. Estos biofarmacéuticos son sustancias terapéuticas derivadas de microorganismos y células animales, obtenidas a través de métodos biotecnológicos, y representan una vía importante para curar y prevenir enfermedades en el nuevo siglo (11). Entre los tipos de biofarmacéuticos más destacados se encuentran las vacunas, los componentes sanguíneos, los tejidos, los productos celulares y genéticos, así como las proteínas recombinantes (3).

La producción de biofármacos y células como plataformas de investigación tiene diversos controles establecidos por los entes reguladores y requiere de años de proceso para obtener un producto final (12). Entre los controles se monitorean diferentes características en el cultivo celular que contemplan la diferenciación celular, cantidad, estabilidad de viabilidad, pureza e inocuidad (13). Uno de los pasos cruciales en la producción y mantenimiento de la línea celular es su pureza durante todo el proceso (13,14).

La contaminación con microorganismos u otras líneas celulares pueden ser factores críticos en la producción y seguridad del producto final. Por lo tanto, la aplicación de diferentes estrategias en el laboratorio y el proceso producción es clave para alcanzar un producto óptimo (15). Por otra parte, la selección de métodos de detección para *Mycoplasma* sp. en cultivo celular es uno

de los principales puntos para abordar las preocupaciones de esterilidad y pureza en la producción y actuar en caso de presencia de este microorganismo. Entre estas técnicas se han utilizado diferentes alcances como el cultivo tradicional, tinción directa e indirecta, técnicas de biología molecular y técnicas bioluminiscentes, siendo su principal diferencia la sensibilidad y el tiempo de detección del patógeno (8).

En este capítulo se presentan los principales conceptos de líneas celulares, posteriormente, se expone las características de *Mycoplasma sp* y cómo su presencia representa un problema de gran importancia en la producción y uso de líneas celulares en los ámbitos de investigación e industria, finalmente se identifican las diferentes técnicas de detección desarrolladas para detectar este microorganismo y algunas estrategias de tratamiento para eliminar *Mycoplasma sp*. de las líneas celulares como alternativa al proceso de descarte.

## 2.1 Líneas celulares

Desde 1950, el cultivo de líneas celulares se ha convertido en una práctica rutinaria para explorar alternativas en el tratamiento de enfermedades (16). Estas líneas celulares se clasifican en células primarias, células de autorrenovación y células transformadas, y su uso en bancos de células depende de los rasgos necesarios de la muestra de línea celular para el proceso de producción o investigación (16). Las líneas celulares primarias son finitas, lo que significa que su cultivo se limita a un número determinado de divisiones celulares. Además, se aplican medidas de control de seguridad debido a su origen, ya que se obtienen en su mayoría directamente de biopsias (17).

Por otro lado, las células transformadas son el resultado de la manipulación genética y se pueden obtener mediante optimizaciones de cultivo. Sin embargo, presentan una desventaja única: su genética puede alterarse en cada proceso de subcultivo, lo que conduce a modificaciones genéticas y fenotípicas en la línea celular (18,19). En la industria biofarmacéutica, se utilizan líneas celulares autorrenovables, las cuales tienen la capacidad de proliferar indefinidamente en medios de cultivo específicos sin alterar sus características intrínsecas. Algunas de las líneas celulares de mamíferos más comúnmente utilizadas incluyen el ovario de hámster chino (CHO) y la línea de mieloma de ratón NS0 (20,21).

Sin embargo, al principio, las líneas celulares no fueron el motor principal de la producción biofarmacéutica. Fue en 1975, cuando la cepa de *E. coli* K12 se estableció como el único huésped eficaz para la producción de la primera proteína recombinante. No obstante, presentaba una desventaja importante: no cumplía con las expectativas en cuanto a la producción de proteínas de mamífero con las modificaciones postraduccionales necesarias. Esto generó la necesidad de continuar investigando en técnicas de ADN recombinante (rDNA) para utilizar células de mamíferos como huéspedes de producción(22).

Estas técnicas impulsaron la producción de vacunas y anticuerpos monoclonales al utilizar líneas celulares como nuevas plataformas estables en lugar de anticuerpos químicamente idénticos. Esto brindó una ventaja significativa a las células: su capacidad de replicación infinita en comparación con otras plataformas de producción e investigación en diversos campos, como el tratamiento de enfermedades y la industria farmacéutica (18, 21).

Dentro del proceso biotecnológico de producción de productos biofarmacéuticos, como anticuerpos monoclonales, productos proteicos y enzimas de diversos huéspedes, las líneas celulares han demostrado ser una plataforma sólida para la investigación y la producción. Estas células desempeñan un papel fundamental en la industria biofarmacéutica. En la etapa upstream del proceso, las líneas celulares son utilizadas en la producción de anticuerpos y en la generación de tejidos, lo que constituye la base para obtener productos de origen biológico destinados a diversos mercados (19). En la etapa downstream, las células son empleadas en los diferentes procesos de aprobación de productos farmacéuticos, mediante estudios de citotoxicidad, análisis de funciones genéticas y estudios de terapia génica y celular (1, 3, 20).

Durante décadas, el monitoreo de parámetros operativos como el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura ha sido fundamental en la producción de biofarmacéuticos para asegurar una producción efectiva por parte de las líneas celulares. Sin embargo, para garantizar la calidad de los productos, muchas empresas han comenzado a implementar el monitoreo de las características de las células utilizadas en la producción. Esto implica evaluar la viabilidad, esterilidad y autenticidad de las células a lo largo de todo el proceso de producción (23).

El seguimiento de las características intrínsecas del cultivo celular implica realizar un monitoreo rutinario desde el banco de células hasta la obtención del producto final. Es fundamental implementar y seguir la morfología, la tasa de crecimiento y la calidad de los medios de cultivo

utilizados para garantizar una producción segura y homogénea en todo el proceso. Aunque en empresas que fabrican una amplia variedad de medicamentos, el monitoreo rutinario no representa un mayor problema, ya que este protocolo básico de monitoreo es fundamental durante la producción (23).

Sin embargo, la pérdida de autenticidad celular se convierte en un problema significativo, ya que implica el perfilado de la línea celular para garantizar la ausencia de contaminación cruzada entre diferentes líneas celulares presentes en un solo cultivo. Las características intrínsecas de las células pueden experimentar cambios menores o mayores durante el almacenamiento y la producción. Por lo tanto, en la actualidad, se realiza un seguimiento constante de la variación clonal mediante técnicas de edición de secuencias y genomas de última generación para asegurar la producción homogénea de biofármacos y detectar cualquier variación genética en la línea celular utilizada o, en el peor de los casos, la presencia de contaminación con múltiples líneas celulares (17,24).

Finalmente, el aseguramiento de la calidad del producto implica garantizar la ausencia de agentes químicos o biológicos que puedan representar riesgos para la salud del consumidor final o la pérdida de las células utilizadas en el proceso de producción. Para lograr esto, se implementan diversos métodos para la detección oportuna de agentes químicos provenientes de los procesos de limpieza y esterilización de los equipos de producción, que incluyen pruebas fisicoquímicas y microbiológicas. Además, se presta especial atención a la presencia de agentes biológicos como bacterias y mohos, siendo crucial la detección oportuna de *Mycoplasma* sp. Esto implica seguir protocolos de esterilidad y seguridad en conformidad con las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas de laboratorio, a fin de garantizar la seguridad del producto en todas las etapas de la línea de producción (25).

Dado el valor de esta plataforma de estudio, es crucial manejar y manipular las líneas celulares con cuidado para obtener resultados relevantes (2). El control de la contaminación por *Mycoplasma* sp. y otros microorganismos es esencial para evitar impactos negativos y la pérdida de la línea celular (10,26,27). No obstante, es importante tener en cuenta que el uso continuo de una línea celular en la investigación puede dar lugar a variaciones genéticas y fenotípicas debido a su manipulación y mantenimiento en el entorno de cultivo (26).

Sin embargo, los diferentes controles aplicados para mantener el *Mycoplasma* sp. al margen pueden verse empañados por otras prácticas que deben manejarse con cuidado. Con estas prácticas, la internacionalización de los estudios a nivel mundial y la interacción de diferentes grupos de investigación pueden conducir a la alta posibilidad de contaminación cruzada de las líneas celulares, debido al alto riesgo de contaminación durante el transporte y la manipulación de las líneas celulares en estudio (9,28). Estos han llevado a la aplicación de rastrear la presencia de *Mycoplasma* sp. y enfatizar la posibilidad de tratamiento y su efecto en la línea celular después de un procedimiento de detección y erradicación (28).

## **2.2 *Mycoplasma* sp. y sus características**

*Mycoplasma* sp. es un género bacteriano perteneciente a la clase Mollicutes y familia *Mycoplasmataceae* relacionado con bacterias Gram-positivas filamentosas (29,30). *Mycoplasma* sp. fue reportada por primera vez en 1898 como la causa de una enfermedad poco común, la pleuroneumonía bovina, aunque inicialmente se describió erróneamente como un virus debido a sus características morfológicas (31). En 1956, en el laboratorio de la Universidad John Hopkins, se le otorgó el nombre de *Mycoplasma*, en base a sus características morfológicas, después de su observación en un cultivo de una línea celular que posiblemente estaba contaminado con un microorganismo de morfología similar a la descrita 50 años antes(3).

A lo largo de los años se han llevado a cabo estudios que han revelado sus diversas características genéticas y fenotípicas de *Mycoplasma* sp., estos estudios han destacado la dificultad de detectarla de manera oportuna cuando está presente en cultivos celulares y de distinguirla de otros microorganismos(31). Dentro de los estudios del genoma, se ha propuesto la hipótesis de su evolución reductiva como explicación de su morfología y características únicas. Estas incluyen la ausencia de pared celular y su forma de vida parasitaria entre las células de su entorno.

Las bacterias se diferencian esencialmente por las características de su pared celular, entre Gram-positivas y Gram-negativas, tienen una estructura que les permite sobrevivir en diferentes ambientes de convivencia (32). La mayoría de los antígenos presentes en la superficie bacteriana son lipoproteínas, las cuales desarrollan un proceso clave en su crecimiento y ciclo de vida y su modulación es parte del mecanismo de generación de enfermedades y evasión de la respuesta inmune en sus hospedadores (33). Es por ello, que la ausencia de esta importante estructura,

indica la evolución reductiva de *Mycoplasma* sp. y la posible pérdida de partes de los cromosomas de sus ancestros. Debido a esto, se considera que este patógeno solo conserva los genes esenciales para sobrevivir, ya que esto los llevó a una forma de vida parasitaria que involucra la obtención de nutrientes de su hospedero (31).

La ausencia de una pared celular es parte de las propiedades inequitativas que posee *Mycoplasma* sp., algunas de las cuales pueden destacarse como el choque osmótico y la sensibilidad a los detergentes, la resistencia a diferentes antibióticos que son usualmente empleados en el cultivo celular como penicilina y estreptomina y la morfología macroscópica de colonias únicas que se asemejan a la descripción de un huevo frito (33,34). Después de la evolución reductiva de *Mycoplasma* sp., los orgánulos presentes son los ribosomas, la membrana celular y el ADN empaquetados de forma compacta. La forma dominante que se encuentra en las diferentes especies de micoplasma se asemeja a la presencia de un citoesqueleto anterior a su devolución de bacterias Gram positivas. Dado que la función principal de este orgánulo es la modulación de la forma, la motilidad y la división celular, esta bacteria presenta una estructura similar para mantener la replicación binaria distinguible que caracteriza a los procariotas(31).

Asimismo, su diminuto tamaño (0,1 – 0,3  $\mu\text{m}$ ) y forma pleomórfica son aspectos que dificultan su visualización en microscopios convencionales y aún más su control y prevención de contaminaciones en el cultivo de líneas celulares en muchos laboratorios que emplean esta plataforma de investigación (35). Estas características le permiten pasar a través de las membranas de filtración, métodos utilizados habitualmente para esterilización de medios de cultivos y otros componentes que no puede ser esterilizados a través de calor húmedo o seco (en autoclave) para evitar la contaminación microbiana, por lo que son necesarios otros métodos de prevención para evitar la contaminación de la línea celular (35). Durante el crecimiento de *Mycoplasma* sp. , al cohabitar con células, dependiendo de la especie, esta bacteria compite por los nutrientes necesarios para su supervivencia, afectando el crecimiento de la célula huésped y actuando como parásito al invadir y degradar el ADN (36).

La presencia de esta bacteria en cultivos celulares es un punto de control en la producción y estudio de líneas celulares, ya que afecta el cultivo de células eucariotas, alterando incluso los resultados obtenidos en estudios de investigación relacionados. Su presencia induce a la

reprogramación del transcriptoma celular, cambios en el metabolismo de la célula huésped, efectos en la transducción y, en algunos casos, puede conducir a la apoptosis celular (3).

Todas las especies de *Mycoplasma sp.* carecen de su pared celular rígida, sin embargo, algunas poseen organelos ubicados en sus polos, que permiten la adhesión y la motilidad en el cultivo celular, logrando así la invasión en las células huésped (35,37). Por lo tanto, el control de la contaminación por este microorganismo es de alta importancia y difícil manejo, ya que sus procesos de tratamiento y eliminación, si está presente en una línea celular, puede tener efectos posteriores sobre la viabilidad de la línea celular (36).

### **2.3 Métodos de detección de *Mycoplasma sp.* cultivo de líneas celulares**

La detección de *Mycoplasma sp.* en cultivos celulares es un requisito de entidades reguladoras como la FDA para poder comercializar un producto bioterapéutico en el mercado farmacéutico. El método principal para la detección de *Mycoplasma sp.* en cultivos celulares establecido por los entes regulatorios es la promoción del crecimiento del patógeno en medios de cultivo específicos. Este método requiere un tiempo de implementación y evaluación de entre 7 y 28 días, lo que implica la posibilidad de contaminación de otras células no infectadas durante el aislamiento del patógeno(4).

Debido a la necesidad de detectar efectivamente *Mycoplasma sp.* en cultivos celulares y su importancia en diversas industrias biofarmacéuticas, se ha considerado la implementación de nuevos métodos como alternativas de detección. Esto implica la comparación de diferentes aspectos, como el tiempo de implementación, la sensibilidad y el costo, que se establecen según los requisitos de cada industria. Entre los métodos utilizados se encuentran las técnicas que emplean la tinción directa e indirecta de ADN, las técnicas de biología molecular (NAT), la técnica bioquímica con bioluminiscencia y el uso de células recombinantes (8,30). Estas técnicas se comparan y se establecen como requisito fundamental para el manejo y procesamiento de líneas celulares en la industria y en los laboratorios de investigación.

### 2.3.1 Técnicas tradicionales con medio de cultivo y tinción directa e indirecta

Debido a la naturaleza del problema de contaminación que se enfrenta en el proceso de producción de vacunas y biofármacos, tradicionalmente los microorganismos han sido detectados mediante su cultivo en medios líquidos y sólidos que se asemejan a los nutrientes necesarios para su crecimiento en forma macroscópica. Además, existen enfoques directos para la detección de *Mycoplasma sp.* que incluyen técnicas de tinción de ADN y tinción directa e indirecta utilizando colorantes como Hoechst 13342 y DAPI (38).

Las técnicas tradicionales implican la inducción del crecimiento de *Mycoplasma sp.* en medios de cultivo para detectar la presencia del microorganismo. Los Procesos Operacionales Estándar (POE) determinados en los documentos de la Farmacopea Europea y FDA establecen el cultivo y aislamiento de la bacteria en medios de cultivo con fuentes complejas de carbono y nitrógeno, así como condiciones de cultivo similares a las utilizadas en el cultivo celular (38).

Las diferentes especificaciones presentes en el medio de cultivo y el aislamiento del microorganismo presente en el cultivo celular presentan una desventaja frente a otras técnicas de detección, dada la dificultad y el tiempo necesario para obtener un resultado confiable (39). Adicionalmente, la sensibilidad de la técnica es dependiente del manejo del cultivo, la preparación de los medios y la calidad de sus componentes pues la capacidad de obtención de nutrientes por parte *Mycoplasma sp.* para poder tener un crecimiento efectivo implica generalmente el aporte de nutrientes que las células huéspedes generan durante su crecimiento, por lo que el reemplazo de estos nutrientes mediante medios sintéticos y suplementos implica un manejo adicional (40).

La gran dificultad en la implementación de la técnica de cultivo en agar es la necesidad de confiar en la capacidad de *Mycoplasma sp.* para crecer en los medios de cultivo debido a la existencia de especies no cultivables. Por estas razones, las técnicas de tinción de ADN involucran el empleo de colorantes como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el bisbenzimidazol Hoechst 33342, los cuales son marcadores fluorescentes que permiten la visualización de *Mycoplasma sp.* cultivables y no cultivables, debido a que se une a regiones ricas de adenina y timina del ADN presente en la muestra (41).

### 2.3.2 Técnicas moleculares (NAT)

Por otra parte, desde 1988, la aproximación molecular para la detección se ha vuelto cada vez más importante en el ámbito de la investigación. En ese año, se logró una exitosa amplificación de ADN mediante el uso de una polimerasa termoestable. El concepto principal de los métodos moleculares en esta aplicación se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar un fragmento de ADN (1). Existen diferentes tipos de técnicas moleculares que se implementan en función de su nivel de especificidad y sensibilidad. Estos se clasifican en tres tipos principales: PCR isotérmica, convencional y cuantitativa(42). Los niveles de especificidad y sensibilidad están determinados inicialmente por el proveedor del kit o por el investigador que diseña los cebadores específicos utilizados en la prueba. Sin embargo, es de gran importancia que el laboratorio estandarice y valide el método, con el fin de definir las condiciones óptimas de uso y detección (8).

La implementación del método PCR convencional o de punto final, se basa en el uso de cebadores específicos que después de amplificar el fragmento específico del genoma de *Mycoplasma* sp. establecen la presencia o ausencia de *Mycoplasma* sp. mediante la visualización de las bandas de amplificación en la electroforesis en gel de acrilamida que debe relacionarse con el par de bases marcador per peso molecular (8). Dado que se trata de una verificación de la presencia o ausencia del patógeno mediante la observación de una banda específica, no se puede determinar la cantidad de *Mycoplasma* sp. presente en la muestra o cultivo celular.

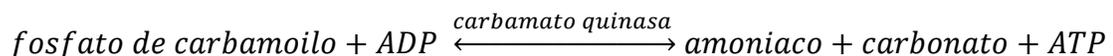
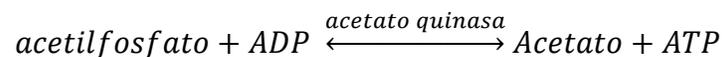
Sin embargo, en algunas instalaciones de investigación o industrias, la necesidad de desarrollar un plan de control requiere la cuantificación de *Mycoplasma* sp. presente en las diferentes muestras. Para este requisito, la implementación de una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real es un enfoque útil (8). Se basa en la medición en tiempo real de la fluorescencia generada durante la amplificación del fragmento de ADN durante la reacción de PCR debido a la intercalación de colorantes fluorescentes como SYBR Green en los fragmentos de ADN en estudio (8). El uso de esta técnica permite la comparación del ciclo límite que es proporcional a las copias amplificadas del fragmento en estudio. Adicionalmente, el estudio de las curvas de disociación permite verificar la autenticidad del fragmento amplificado frente a controles positivos y negativos (43).

Por otro lado, se han implementado nuevas tecnologías que combinan diferentes técnicas, como la amplificación isotérmica de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y la amplificación isotérmica en bucle (LAMP), entre otras. La técnica LAMP, en particular, es altamente específica y sensible en la detección de hebras de ADN. Además, al ser una técnica isotérmica, no requiere de equipos sofisticados para su implementación, aunque la cuantificación precisa de *Mycoplasma sp.* aún no está especificada(44).

A pesar de la sensibilidad y variedad de métodos disponibles, la principal desventaja es la necesidad de equipos específicos para su aplicación, lo que limita su uso como una técnica de detección de *Mycoplasma sp.* de bajo costo. Por lo tanto, se ha explorado la implementación de otras técnicas que no requieren equipos sofisticados, como un termociclador y equipos de cuantificación, con el fin de detectar *Mycoplasma sp.* en los cultivos celulares utilizados en el laboratorio.

### 2.3.3. Técnicas alternativas

Dentro de las alternativas, los nuevos avances en la industria incluyen el uso de enzimas mediante luminiscencia bioquímica, sondas específicas para detección y células recombinantes. La técnica de luminiscencia bioquímica se basa en el estudio de una actividad enzimática específica cuando *Mycoplasma sp.* está presente. Debido a su evolución reductiva, los microorganismos de la Clase Mollicutes, como *Mycoplasma sp.*, generan ATP a través de la fermentación de carbohidratos y arginina. Por lo tanto, las enzimas carbamato quinasa y acetato quinasa se utilizan como marcadores para su detección (8). La técnica de luminiscencia bioquímica tiene como objetivo detectar la enzima acetato quinasa presente en *Mycoplasma sp.*, ya que esta enzima convierte ADP en ATP, lo que genera una emisión de luminiscencia pues emplean las enzimas ya mencionadas dentro de las rutas metabólicas para la generación de ATP desde la fermentación de glucosa y la lisis de arginina (45,46). Debido a su sensibilidad, practicidad y rapidez, este método requiere una alta concentración del microorganismo para detectar de manera efectiva su presencia, Tabla 1 (47).



Los componentes del reactivo y el sustrato empleados en la prueba tienen presencia de luciferasas, fosfatos inorgánicos y ADP en el caso del reactivo y fosfatos de acetilo y carbamoilo como precursores de las reacciones que en presencia de las enzimas empleadas por *Mycoplasma sp.* pueden genera ATP como señal para la detección con luminiscencia bioquímica empleada en este kit de Lonza (48).

La técnica relacionada con la detección de *Mycoplasma sp.* mediante el uso de una línea celular recombinante específica que expresa el receptor Toll (TLR2) es otro enfoque utilizado. Este receptor reconoce las lipoproteínas presentes en *Mycoplasma sp.* y desencadena una cascada de señalización que activa la transcripción celular del complejo de transcripción de ADN conocido como NF- $\kappa$ B. Plasmotest® (InvivoGen) es una prueba que utiliza células HEK 293 que expresan el TLR2, y en presencia de Mycoplasma genera una cascada de señalización que se puede visualizar mediante un cambio de color en el medio de análisis (9). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la sencillez de este método puede afectar la especificidad de los resultados, ya que pueden producirse falsos positivos debido a la similitud de las respuestas con la contaminación por otros microorganismos, en lugar de la presencia real de *Mycoplasma sp.*

Por otro lado, la técnica empleando sondas para detectar *Mycoplasma sp.* tiene dos enfoques: microensayos y colorimetría. Los microensayos son altamente robustos debido a su enfoque de PCR altamente específico, que no solo permite la detección sino también la identificación del microorganismo. El resultado del microensayo depende de la especificidad de los genes 16S y 23S rRNA presentes en *Mycoplasma sp.*, así como del protocolo de PCR utilizado para la preparación de la muestra (49).

La técnica colorimétrica también utiliza sondas con una diana específica de la región 16S rRNA, pero solo puede detectar ocho especies de micoplasma. Esta estrategia se utiliza en un kit de detección proporcionado por R&D Systems, donde la muestra se hibrida con sondas en una placa recubierta, y luego se realiza una reacción de unión conjugado-sustrato. El color desarrollado es proporcional al rRNA de *Mycoplasma sp.* detectado en la muestra original. Sin embargo, una de las desventajas de esta técnica es que solo puede detectar ocho especies, lo que limita su aplicabilidad en casos donde puedan estar presentes otras especies de micoplasma que no están incluidas en la especificidad del kit (8).

**Tabla 1.** Comparación de sensibilidad, límite de detección, tiempo y costo de los métodos de detección de *Mycoplasma sp.*

Técnica	Sensibilidad	Límite de detección	de Tiempo	Cantidad de ensayos	Costo (USD)	Ref.
Tinción directa e indirecta	Directa: B Indirecta: A	1 UFC*	12 h - 8 d	100	333.00	(29,30)
Aislamiento con medio de cultivo	A	1 UFC	12 h - 14 d	---	367.61	(30)
PCR	A	1-10 copias $\mu\text{l}^{-1}$	30 min – 2h	100	247.50 – 1417.85	(8)
qPCR		1-10 copias $\mu\text{l}^{-1}$	30 min– 2 h	25	683.39	(8)
PCR isotérmica	A	10 – 10 <sup>2</sup> UFC ml <sup>-1</sup>	40 – 90 min	100	631.00	(8)
Sondas de detección	M	15 – 2500 UFC ml <sup>-1</sup>	4.5 h	96	421.00	(8)
Células recombinantes	M	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup> UFC ml <sup>-1</sup>	2 d	250	562.00	(9)
Inmunotinción con Hoechst 33342 / DAPI	M	10 <sup>5</sup> – 10 <sup>7</sup> UFC ml <sup>-1</sup>	2 h	25 mg	42.75***	(26)
Luminiscencia Bioquímica	M	10 <sup>3</sup> UFC ml <sup>-1</sup>	30 min	100	733.00	(28)

\* Depende del analista y representa una aproximación al resultado de la presencia o ausencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo. \*\*Alta: A, Moderada: M, Baja: B. \*\*\*Hoechst 33342

## 2.4 Tratamientos de cultivos celulares contaminados con *Mycoplasma sp.*

En presencia de *Mycoplasma sp.* en cultivos de líneas celulares, se sugiere inicialmente realizar un tratamiento térmico utilizando un autoclave y descartar las células contaminadas. Sin embargo, una opción práctica es el tratamiento con antibióticos para erradicar *Mycoplasma sp.* de los cultivos celulares. Se ha demostrado que ciertos antibióticos son efectivos para la erradicación

de *Mycoplasma* sp., entre ellos se encuentran las tetraciclinas, pleuromutilinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Estos antibióticos se utilizan en concentraciones bajas y pueden administrarse de forma individual o en combinación con otros antibióticos en un enfoque de tratamiento dual. También se pueden utilizar de manera profiláctica para prevenir la aparición de la contaminación por *Mycoplasma* sp. nuevamente en el cultivo tratado (50,51).

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos de amplio espectro utilizados para tratar infecciones causadas por bacterias Gram positivas. Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas, lo que impide que la bacteria funcione correctamente y se replique. Las tetraciclinas se consideran antibióticos bacteriostáticos, ya que detienen el crecimiento y la reproducción de las bacterias en lugar de erradicarlas directamente (52).

Por otro lado, la pleuromutilina es otro antibiótico con actividad antibacteriana moderada contra patógenos Gram positivos y *Mycoplasma* sp. Actúa mediante la inhibición de la síntesis proteica al interactuar con los ribosomas bacterianos, pero no afecta la síntesis proteica de las células eucariotas. Esto lo convierte en un tratamiento específico contra las bacterias sin dañar las células huésped (53). Estos antibióticos, como las tetraciclinas y las pleuromutilinas, pueden ser utilizados en un tratamiento dual durante un período de 3 semanas, con una concentración de 10 µg por mililitro, para tratar la contaminación de células en estudio causada por *Mycoplasma* sp. (50).

Por otra parte, las fluoroquinolonas son un grupo de antibióticos de amplio espectro con actividad bactericida. Uno de los antibióticos de segunda generación más utilizados es la ciprofloxacina, la cual genera actividad bactericida contra bacterias Gram negativas, así como actividad adicional contra bacterias Gram positivas. La ciprofloxacina actúa impidiendo la replicación bacteriana al inhibir la enzima ADN girasa. Además, también afecta a la topoisomerasa IV, lo cual interfiere con la división del ADN cromosómico y, como resultado, afecta la transcripción del ADN, lo que conlleva a la apoptosis de la célula bacteriana (54).

Asimismo, los macrólidos son compuestos antimicrobianos bacteriostáticos que están compuestos por un anillo de lactona con múltiples grupos cetona e hidroxilo unidos a uno o más azúcares, al igual que las fluoroquinolonas, son antibióticos de amplio espectro y su campo

de acción está dirigido a la unión al RNA ribosomal 23S del ribosoma 50, que tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas dependientes del RNA ribosomal (55,56).

En el mercado existen diversos productos para combatir contra la contaminación por *Mycoplasma* sp., entre los que se destacan: Plasmocin® , Mycozap, Mycoplasma Removal Agent (MRA) y Plamocure™. Plasmocin® es un tratamiento dual que contiene en su formulación fluoroquinolona (que actúa como agente bloqueante de la proteína de síntesis) y un macrólido (que detiene la replicación de ADN), este tratamiento se emplea en una concentración final de 25 µg ml<sup>-1</sup> por dos semanas.

Por otra parte, Mycozap es un tratamiento que se basa en la combinación de un péptido activo de membrana, que puede ser, surfactina y un antibiótico convencional. En la primera parte del proceso la mayoría de *Mycoplasma* sp. presente es lisado y lavado al utilizar un agente activo de superficie. En la segunda parte, *Mycoplasma* sp. aún presente es eliminado por el antibiótico. Este tratamiento es recomendado cuando las células se encuentran en malas condiciones previo al tratamiento y su cantidad solo alcanza para el tratamiento con un solo antibiótico (50).

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Cultivos celulares y preparación de muestras

La línea celular utilizada en el presente estudio fueron fibroblastos de ratón murino (L929). Estas células fueron clasificadas en dos grupos: células L929 con contaminación crónica de *Mycoplasma* sp. (L929 C) y células L929 nuevas libres de *Mycoplasma* sp. (L929 N). Las células L929 C se encontraban disponibles en el laboratorio de Procesos Químicos y Bioquímicos en criopreservación en nitrógeno líquido. Por otro lado, las células L929 Nuevas Libres de *Mycoplasma* sp. (L929 N) fueron adquiridas y se confirmó su ausencia de contaminación (L70026472, ATCC, USA) mediante los métodos de detección disponibles en el laboratorio

Las líneas celulares L929 C se subcultivaron desde el vial congelado en nitrógeno líquido a un frasco T75 con 10 ml de Medio de Eagle Modificado por Doubelco (DMEM, Gibco™) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco™) al 10% (v/v). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, se realizó un seguimiento de la morfología y, al alcanzar un 80% de confluencia (3 días después), se llevó a cabo un subcultivo mediante la remoción del medio de cultivo presente en la caja T75 y la adición de 4 ml de tripsina, se incubó durante 5 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se neutralizó la tripsina con 4 ml de medio DMEM suplementado y se procedió a realizar una centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. Luego, se removió el sobrenadante y se añadieron 3 ml de medio DMEM suplementado para resuspender las células.

Este proceso se repitió en dos subcultivos adicionales en cajas T75, con 10 ml de medio DMEM (Gibco™) y una concentración inicial de 500,000 células/ml, hasta alcanzar el 70% de confluencia para continuar con los ensayos.

De la misma manera, se llevó a cabo este proceso de cultivo y subcultivo con un vial de células de L929 N, extraído de la criopreservación en el tanque de nitrógeno líquido. Es relevante mencionar que las células L929 C fueron incubadas en una incubadora diferente a las células L929 N; no obstante, ambas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> en ambas incubadoras.

## **3.2 Métodos de detección de *Mycoplasma sp.***

### **3.2.1. Método de luminiscencia bioquímica**

El método bioluminiscente se desarrolló utilizando el kit de detección MycoAlert™ PLUS (LT07-710) proporcionado por Lonza (Walkersville, MD, USA). MycoAlert™ PLUS es un ensayo selectivo que emplea la actividad enzimática de carbamato y acetato quinasa para determinar la presencia de *Mycoplasma sp.* en líneas celulares. El ensayo se desarrolló inicialmente de acuerdo con las instrucciones dadas por el proveedor (57). En primer lugar, se transfirieron 2 ml del sobrenadante de la muestra de cultivo celular a un Eppendorf y se centrifugaron a 1500 rpm (200 x g) durante 5 minutos. Luego, se colocaron 100 µl de sobrenadante en un pozo de la placa de 96 pozos, adicionalmente se agregaron 100 µl del reactivo provisto en el kit de Lonza. Después de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente, se realizó la primera lectura de luminiscencia, siendo esta medición A. Posteriormente, se adicionaron 100 µl del sustrato, también proveído por el kit, y luego de 10 minutos se realizó la lectura en el equipo Cytation3® (BioTeK, USA) con una ganancia de 100, como lo establece el protocolo definido para la medición de luminiscencia del equipo en esta prueba, siendo esta la medición B (28). La relación obtenida entre las dos medidas de luminiscencia calculadas B/A nos permitió determinar si el cultivo celular estaba contaminado por *Mycoplasma sp.* Una relación con un resultado superior a 1 indicaba que efectivamente el cultivo celular estaba contaminado y era necesario un tratamiento de erradicación.

No obstante, debido a que el costo de cada ensayo de MycoAlert™ PLUS es elevado en comparación con otros ensayos de detección disponibles en el mercado (\$7.33 – 14.25 USD)(58), se hizo necesario realizar una estandarización del método y determinar si la variación de la cantidad de los componentes (sustrato, reactivo y muestra) en los reacción permitía una detección efectiva de *Mycoplasma sp.* en las muestras. Para ello, se realizó un ensayo preliminar

de la luminiscencia con volumen final de 100  $\mu\text{l}$  por componente, cada componente fue diluido con el buffer fosfato salino (PBS) (1X, pH 7.4) y esterilizado en autoclave, para garantizar la ausencia de otros microorganismos que pudieran alterar la prueba. Las diluciones empleadas se pueden observar en la Tabla 2, este ensayo se realizó con el fin de evaluar si la variación de las concentraciones de los componentes de la reacción también permitía una detección efectiva o si por el contrario, se requerían las concentraciones de cada componente expresadas en el protocolo del fabricante para garantizar la detección de microorganismo (57). Cada ensayo se realizó por triplicado, manteniendo los tiempos de incubación y temperatura preestablecidos por el proveedor.

**Tabla 2.** Volúmenes de los componentes ensayados para estandarizar la detección de *Mycoplasma sp.* mediante el kit MycoAlert™ PLUS.

Ensayo	Sustrato ( $\mu\text{l}$ )	Reactivo ( $\mu\text{l}$ )	Muestra ( $\mu\text{l}$ )	PBS ( $\mu\text{l}$ )
C1.1	100	100	100	0
C1.2	50	50	50	150
C1.3	25	25	25	225
C1.4	13	13	13	261
C1.5	10	10	10	270

### 3.2.1 Técnica de inmunotinción con DAPI

El ensayo de inmunotinción se desarrolló utilizando DAPI como colorante para teñir el ADN presente en la muestra del estudio. Luego de que la línea celular fuera primero cultivada en una placa de 24 pozos hasta obtener un 70% de confluencia, esta muestra se procesó a través de una serie de etapas que incluyeron fijación en la placa de cultivo, permeabilización y tinción con DAPI, para finalmente realizar una visualización microscópica de las células teñidas por fluorescencia con el objetivo de observar la morfología celular; en el caso de detectar fragmentos de DNA teñidos con DAPI agregados o alrededor de la línea celular (es decir, que no pertenezcan al núcleo de la célula) se confirmaría la presencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo celular.

En primer lugar, para la etapa de fijación, se removió del pozo el medio de cultivo celular y se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de paraformaldehído (4% en agua destilada) frío ( $\sim 0^{\circ}\text{C}$ ), incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, el paraformaldehído se lavó con 500

µl de PBS y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el paso de permeabilización dos veces. Para ello, se agregaron 250 µl de tritón X-100 al 0.1% v/v diluido con PBS estéril (1X, pH 7.4), incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se removió el tritón agregado y se realizó un lavado con 500 µl de PBS que se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se procedió al paso de tinción con DAPI (D9542, Sigma Aldrich, USA). Este proceso se llevó a cabo en un cuarto oscuro, agregando 200 µl de solución de colorante (300 nM, disuelto en PBS estéril 1X) a los pozos. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se retiró la solución de DAPI y se realizó un último lavado agregando 200 µl de PBS, que se mantuvo por 2 minutos antes de ser retirado nuevamente. Luego, se añadieron 200 µl de PBS estéril para poder realizar la visualización con microscopía.

La muestra se mantuvo en oscuridad durante unos minutos y posteriormente se observó mediante microscopía de fluorescencia en el equipo Cytation3® (BioTeK, USA), utilizando una longitud de onda de excitación y emisión de 377 y 447 nm, respectivamente. Se ajustó el contraste y brillo en las imágenes procesadas a una magnitud de 10X.

### **3.2.3. PCR**

En esta selección se realizó un contraste entre especificidad, cantidad de ensayos, tiempo de ejecución y costo entre los kits de PCR más empleados en el mercado, por lo que se realizó una comparación de entre el costo, especificidad y tiempo de ejecución del ensayo y se determinó cual podría ser la mejor selección (Tabla 3). En el caso de este estudio para la detección de *Mycoplasma sp.* en las muestras se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando el kit G238 específico para detección de *Mycoplasma sp.* desarrollado por Applied Biological Materials (abm) Inc. (abm, Richmond, BC, Canada), el cual tiene capacidad para detectar 213 especies de micoplasma con tamaño de bandas de *amplificación* entre 370 y 550 pb. Los *primers* (cebadores) utilizados en el kit tienen especificidad por las regiones que codifican el rRNA 16S y 23S del genoma del microorganismo en estudio. A pesar de que requiere el empleo de electroforesis para verificar las bandas amplificadas, estas pueden ser posteriormente cuantificadas por otros métodos para una identificación de la especie de *Mycoplasma sp.* presente; la detección únicamente requiere 3 horas, lo que permite una detección oportuna del patógeno a un bajo costo por prueba (Tabla 4).

**Tabla 3.** Comparación de los kits de PCR más empleados para la detección de *Mycoplasma sp.* en cultivos celulares.

Nombre del kit	Casa comercial	Especificidad	Cantidad de ensayos	Tiempo de ejecución	Costo (USD)*
<b>Lookout Mycoplasma</b>	Sigma	19 especies	24 reacciones No incluye Taq polimerasa	3 h	385.00(59)
<b>Venor™ GeM Mycoplasma PCR Detection Kit</b>	Sigma	24 especies	25 reacciones	3 h	342.00(60)
<b>Universal Mycoplasma Detection Kit</b>	abm	200 especies	100 reacciones	1.7 h	292.50 (61)
<b>EZ-PCR Mycoplasma Detection Kit</b>	Sartorius Biological industries	90 especies	20 reacciones	2.05h	255.00 (63)

\*Costos al corte del año 2023

El kit se utilizó inicialmente como indica el proveedor, con las cantidades establecidas de cada uno de los componentes (2.5 µl de muestra, 1 µl de *primer*, 12.5 µl de Master Mix y 9 µl de agua destilada grado molecular) (T27, **Tabla 4**). Luego de tener la mezcla completa, se procedió a realizar la amplificación de ADN mediante 35 ciclos de termociclado en el termociclador PTC 100 (MJ Research, Canadá) con una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una etapa de apareamiento de *primers* a 55°C durante 30 segundos, y una etapa de extensión a 72°C durante 1 minuto, siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante del kit(64). Posteriormente, la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (HyAgarose™, HydraGene, usa) al 1.8%, con la adición de 1 µl de bromuro de etidio en la cámara de electroforesis previo a la corrida de electroforesis (Horizon 58, Life Technologies, USA). Se aplicó una corriente de 90 V durante 40 minutos para la corrida del gel. La visualización de los resultados se realizó en un transiluminador para verificar la amplificación; un producto de amplificación de aproximadamente 500 pares de bases indica que el cultivo está contaminado con *Mycoplasma sp.* Nótese que la longitud del producto de PCR dependerá de la cepa particular de micoplasma, por lo que la longitud puede variar entre 370 y 550 pb.

No obstante, también se realizó una evaluación preliminar con el fin de estandarizar el kit y establecer un volumen de cada uno de los componentes de la reacción que permita la detección del microorganismo utilizando el control positivo previsto para evaluar el límite de detección del kit tras modificar la cantidad volumen de los componentes, para lo que se desarrolló un diseño experimental (3<sup>3</sup>) usando el software Design Expert 13.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA), donde se comparó el efecto de cada uno de los componentes para obtener en total 27 ensayos y se evaluó el límite de detección del kit en cuanto a muestra analizada y componentes utilizados en el ensayo con un volumen final de 25  $\mu$ l, según la Tabla 5.

Después de evaluar diferentes combinaciones de volúmenes para los componentes de la reacción, se identificó un tratamiento específico que establecía el límite de sensibilidad para obtener resultados positivos para la PCR, se utilizaron los volúmenes definidos en dicho tratamiento, que consistieron en 10.5  $\mu$ l de **Master Mix**, 1.5  $\mu$ l de muestra y 0.75  $\mu$ l de *Primers* (T14). La amplificación se llevó a cabo siguiendo las condiciones de termociclado establecidas por el fabricante del kit (64) y la verificación de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (HyAgarose™, HydraGene, usa) al 1.8%, con la adición de 1  $\mu$ l de bromuro de etidio en la cámara de electroforesis previo a la corrida de electroforesis (Horizon 58, Life Technologies, USA) como fue descrito anteriormente. Estas condiciones de reacción serán empleadas en las futuras evaluaciones para la detección de *Mycoplasma* sp. utilizando este método.

**Tabla 4.** Diseño experimental para estandarizar la detección de *Mycoplasma sp.* mediante PCR usando el kit abm G238.

Ensayo	Primer ( $\mu$ l)	Master Mix ( $\mu$ l)	Muestra ( $\mu$ l)	Agua destilada grado molecular ( $\mu$ l)
T1	0.5	7.5	0.5	16.50
T2	0.5	10.5	0.5	15.50
T3	0.5	12.5	0.5	14.50
T4	0.5	7.5	1.5	16.25
T5	0.5	10.5	1.5	15.25
T6	0.5	12.5	1.5	14.25
T7	0.5	7.5	2.5	16.00
T8	0.5	10.5	2.5	15.00
T9	0.5	12.5	2.5	14.00
T10	0.75	7.5	0.5	13.50
T11	0.75	10.5	0.5	12.50
T12	0.75	12.5	0.5	11.50
T13	0.75	7.5	1.5	13.25
T14	0.75	10.5	1.5	12.25
T15	0.75	12.5	1.5	11.25
T16	0.75	7.5	2.5	13.00
T17	0.75	10.5	2.5	12.00
T18	0.75	12.5	2.5	11.00
T19	1	7.5	0.5	11.50
T20	1	10.5	0.5	10.50
T21	1	12.5	0.5	9.50
T22	1	7.5	1.5	11.25
T23	1	10.5	1.5	10.25
T24	1	12.5	1.5	9.25
T25	1	7.5	2.5	11.00
T26	1	10.5	2.5	10.00
T27*	1	12.5	2.5	9.00

\*Son las condiciones de medición estándar

### 3.3 Contraste de métodos implementados para la detección de *Mycoplasma sp.* en cultivo celular

Con el fin de establecer y estandarizar un ensayo para la detección y control de la presencia de *Mycoplasma sp.* en las líneas celulares del Laboratorio de Cultivo Celular del Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, se decidió hacer una comparación de 3 métodos para detectar *Mycoplasma sp.* con base en diferentes criterios que podrían influir en la selección del método más eficaz para

detectar y controlar la presencia de *Mycoplasma sp.* en cultivo celular. Los criterios fueron tiempo de detección, sensibilidad, tiempo de ejecución y precio de implementación.

Luego de realizar la estandarización, se determinó que la prueba el método de luminiscencia bioquímica debía ser empleado con las cantidades de los componentes establecidas por el fabricante para garantizar la detección de presencia o ausencia de *Mycoplasma* (57), mientras que la prueba de PCR podría detectar la presencia del patógeno resultados hasta con una disminución de los componentes de la Master Mix como resultado del diseño experimental realizado (T14, Tabla 2) aumentando la cantidad de ensayos que se podrían realizar con la adquisición del kit a 118 ensayos.

En cuanto al tiempo de ejecución ambos ensayos continúan siendo rápidos, máximo 3 horas para una detección efectiva, en comparación con otros métodos disponibles en el mercado. Sin embargo, el costo de implementación está sujeto a la disponibilidad de los insumos adicionales como placas de 96 pozos, reactivos adicionales como agarosa, Bromuro de etidio, marcadores de peso molecular en el caso de PCR, lo que aumenta el valor de cada ensayo de PCR a ser equivalente al valor de una prueba con luminiscencia bioquímica, siendo esto compensado con la garantía de detectar efectivamente en un menor tiempo la presencia de *Mycoplasma sp.*, por lo que ambos métodos son una gran selección para corroborar lo observado con el método tinción de DAPI. Por lo que, finalmente se logró detectar y corroborar la presencia de *Mycoplasma sp.* con los tres métodos seleccionados y se determinó según la disponibilidad de insumos que el empleo de las técnicas moleculares y de luminiscencia podría ser herramientas útiles para la detección y control de la presencia de *Mycoplasma sp.* en las células L929 C.

### **3.4 Tratamiento para erradicar *Mycoplasma sp.***

#### **3.4.1. Evaluación de la concentración efectiva del agente de remoción de *Mycoplasma sp.* en las células L929 contaminadas (L929 C)**

Con base en reportes de la literatura, se desarrolló un diseño experimental para establecer la mejor concentración de tratamiento a añadir al cultivo celular contaminado (50,65,66). Para ello se empleó un cultivo de células L929 donde se había determinado la presencia crónica de *Mycoplasma sp.* (L929 C) con los tres métodos de detección ya seleccionados: MycoAlert™

PLUS (Lonza), Kit de PCR para detección de Mycoplasma (abm, g238, USA) y tinción con DAPI.

Se llevó a cabo un cultivo de células L929 C en 9 cajas de T25 con medio DMEM (Gibco™) suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco™). La siembra se realizó a una concentración de 250,000 células/ml en cada caja T25. Después de 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>, se adicionaron las concentraciones de agente anti-micoplasma evaluadas. A tres cajas se les agregó 2.5 µl de Plasmocin® (12.5 µg/ml), a otras tres cajas se les agregó 5 µl de Plasmocin® (25 µg/ml) y a las tres restantes se les agregó 7.5 µl de Plasmocin® (37.5 µg/ml).

Después de cumplir los primeros 4 días, se realizó el subcultivo mediante tripsinización con 1 ml de tripsina (Gibco™), incubando durante 5 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. La tripsina fue neutralizada con 1 ml de medio DMEM (Gibco™) con Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco™) al 10%. Luego, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron las células en 2 ml de medio DMEM suplementado con un 10% de SFB. Posteriormente, se realizó el conteo con cámara de Neubauer con azul de tripano y se añadieron nuevamente 250,000 células/ml al 5 ml de medio DMEM (Gibco™) suplementado con un 10% de SFB (Gibco™) y Plasmocin® a la concentración correspondiente cada 4 días. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Este proceso se repitió en cada pase.

Al final de cada semana de tratamiento, para fines del diseño experimental de la evaluación de concentración de tratamiento, se llevó a cabo una evaluación de la erradicación de *Mycoplasma* sp. utilizando dos métodos de detección: luminiscencia con MycoAlert™ PLUS (Lonza, USA) mediante el equipo Cytation3® (BioTeK, USA) y PCR con electroforesis en gel de agarosa al 1.8% con tinción con bromuro de etidio para la amplificación de una banda de aproximadamente 500 pb. Esta banda sería indicativa de la presencia de *Mycoplasma* sp. en las muestras analizadas.

Luego de las dos semanas de tratamiento, como lo indicado por el proveedor (), se evidenció la erradicación de *Mycoplasma* sp. con las concentraciones más altas evaluadas. Las células tratadas y ahora libres de *Mycoplasma* sp. fueron preservadas en el banco utilizando medio DMEM suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y un 10% de DMSO (D8418, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con fines de preservación.

Adicionalmente, al finalizar el ensayo, se llevó a cabo una evaluación para determinar la ausencia de otros microorganismos en el cultivo celular. Para ello, se realizó una siembra en placa en superficie utilizando una alícuota de 100  $\mu$ l del sobrenadante de la caja T25 en medios de cultivo para bacterias (Plate Count Agar, Liofilchem®, USA) y hongos (Sabouraud CAF Agar, Liofilchem®, USA) durante 48 horas a 37°C.

### **3.4.2 Tratamiento de *Mycoplasma* sp. en las células L929 nuevas contaminadas (L929 N cMc)**

Debido a que la presencia de *Mycoplasma* sp. ya evidenciaba cambios en la morfología celular de las células L929 C en comparación con la morfología observada en las células L929 N, se decidió realizar una contaminación intencional de uno de los subcultivos de células L929 N para evaluar el efecto de *Mycoplasma* sp. y determinar la concentración efectiva del agente anti-micoplasma necesario para tratar la presencia de este microorganismo.

Esta contaminación intencional se llevó a cabo mediante la adición de medio de cultivo proveniente de uno de los subcultivos de células L929 C. Antes de ser agregado, el medio fue centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos y filtrado con un filtro de 0.22  $\mu$ m. De esta manera, *Mycoplasma* sp. no sería retenido si está presente, pero se retendrían los posibles restos celulares que pudieran estar presentes en el medio empleado.

Por lo tanto, se procedió a realizar un subcultivo a partir de una de las cajas de L929 NL disponibles en cultivo. Para ello, se removió el medio de cultivo presente en la caja T75 con células L929 NL y se adicionaron 4 ml de tripsina (Gibco™). Posteriormente, se incubó durante 5 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, se neutralizó la tripsina con 4 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 10% (Gibco™) y se procedió a realizar una centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos.

Después de la centrifugación, se removió el sobrenadante y se añadieron 3 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 10% (Gibco™) para resuspender las células. Se realizó el conteo de las células presentes en cámara de Neubauer con azul de tripano y se procedió a adicionar 500,000 células/ml en una caja T75. Además, se añadieron 2 ml de medio contaminado

previamente filtrado y 8 ml de medio DMEM suplementado con un 10% de SFB. Finalmente, las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se realizó un subcultivo cada semana con la misma cantidad de células, empleando únicamente medio de cultivo celular DMEM suplementado con un 10% de SFB. Al cabo de tres semanas, se llevó a cabo la detección de *Mycoplasma* sp. mediante el empleo del kit MycoAlert™ PLUS (Lonza, EE. UU), y PCR utilizando el kit de detección de Mycoplasma (abm, g238). Al detectarse la presencia positiva de *Mycoplasma* sp. estas células se clasificaron como L929 N cMc y se procedió con el ensayo de tratamiento

Con base a los resultados de la evaluación de las concentraciones de tratamiento con las células con contaminación crónica, se seleccionaron las concentraciones de 25 y 37.5 µg/ml de Plasmocin® como las de mejor efectividad para la erradicación. Posteriormente, se procedió a evaluar la concentración efectiva del agente de remoción de *Mycoplasma* sp. en estas células L929 N cMc, utilizando dos agentes anti-micoplasma diferentes mediante un subcultivo en 4 cajas T25, cada una con 250,000 células/ml. Este proceso incluyó la tripsinización, el conteo con azul de tripano en cámara de Neubauer y la siembra en las cajas con medio DMEM suplementado con un 10% de SFB y condiciones de incubación de 37 °C una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, tal como se describió anteriormente.

Un día después, se adicionó el tratamiento en las cajas T25. Cada caja fue destinada para los tratamientos evaluados, incluyendo diferentes concentraciones y dos agentes anti-micoplasma. El antibiótico Plasmocin® (InvivoGen) se agregó al medio de cultivo fresco en concentraciones de 25 y 37.5 µg/ml durante 2 semanas, realizando un total de 4 pases. En cada pase, se llevó a cabo el proceso de tripsinización, el conteo en cámara de Neubauer y la siembra de 250,000 células/ml en medio DMEM suplementado con un 10% de SFB, junto con la cantidad correspondiente de Plasmocin® según la concentración evaluada (5 y 7.5 µl), respectivamente.

Simultáneamente, se trataron las otras 2 cajas de T25 con células L929 N cMc utilizando el "Mycoplasma Removal Agent" (MRA Cat. No. 3050044, MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, USA), el cual está compuesto por una quinolona derivada del ácido 4-oxo-quinolina-3-carboxílico. Se utilizó en dos concentraciones diferentes: 0.2 y 0.5 µg/ml, realizando el mismo proceso que con Plasmocin®, es decir, 4 pases en 2 semanas inicialmente, con el proceso de tripsinización, el conteo en cámara de Neubauer y la siembra de 250,000 células/ml en medio

DMEM suplementado con un 10% de SFB, junto con la cantidad correspondiente de MRA según la concentración evaluada (50 y 100  $\mu$ l), respectivamente.

Después de cada semana de tratamiento, se realizó la evaluación de la erradicación de *Mycoplasma* sp. mediante dos métodos: luminiscencia utilizando el ensayo MycoAlert™ PLUS (Lonza, EE. UU.) y PCR utilizando el kit de detección de Mycoplasma (abm, g238). Para la confirmación visual, se realizó un gel de electroforesis con una concentración de agarosa al 1.8% y se utilizó la tinción de bromuro de etidio. Se buscó la presencia de bandas que coincidieran con un tamaño de 500 pb, lo cual indicaría la presencia de *Mycoplasma* sp. Estas células fueron las empleadas al final como las células L929 Nuevas tratadas (L929N T) para cada una de las concentraciones y agentes anti-micoplasma evaluados y utilizadas en los ensayos posteriores de citotoxicidad.

Al finalizar el ensayo, se llevó a cabo una prueba adicional para verificar la ausencia de otros microorganismos en el cultivo celular. Se realizó una siembra en superficie de 100  $\mu$ l de sobrenadante del cultivo celular utilizando medios de cultivo específicos para bacterias (Plate Count Agar, Liofilchem®, EE. UU.) y hongos (Sabouraud CAF Agar, Liofilchem®, EE. UU.) durante 48 horas a 37°C. Esta etapa permitió asegurar que no hubiera contaminación por otros microorganismos en el cultivo celular.

### **3.5 Evaluación de la tasa de crecimiento celular y el efecto del proceso de erradicación en células contaminadas**

#### **3.5.1 Curva estándar**

Se implementó un ensayo de fluorescencia para determinar la proliferación y supervivencia celular mediante el contraste de las curvas de crecimiento de líneas celulares inicialmente planteadas con contaminación crónica de *Mycoplasma* sp. (L929 C) y líneas celulares nuevas libres de contaminación (L929 N). Para ello se empleó un método fluorométrico para la detección de la actividad metabólica celular que está basado en la reducción de resazurina a resofurina por reacciones enzimáticas empleando NADPH deshidrogenasa, efectuada por la mitocondria en las células viables. Ópticamente, la reacción transcurre desde resazurina, que es de color azul y baja fluorescencia, a resofurina, de color rosado y altamente fluorescente, que puede ser

monitoreada en las longitudes de onda de entre 530 y 590 nm de emisión y excitación, respectivamente (67,68).

Se llevó a cabo una curva patrón donde se cultivaron células L929 C y L929 N en placas de 24 pozos con diferentes concentraciones: para las L929C (5000, 7000, 14000, 28000, 56000 y 121000 células por mililitro) y para las L929 N (5000, 7000, 10000, 14000, 20000, 28000 células por mililitro). Las células se incubaron durante 5 horas para obtener una monocapa adherida en cada pozo. Luego, se retiró el medio de cada pozo y se agregaron 500  $\mu$ l de resazurina (solución stock 44  $\mu$ M, Cat No. 121519, PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania) al 10% v/v, diluida en medio DMEM alto en glucosa (Cat. No. 11588826, Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) sin suplemento. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 100  $\mu$ l de cada pozo y se transfirieron a una placa de 96 pozos, donde se realizó la medición por triplicado de cada muestra utilizando Cytation3® (BioTeK, USA) con una longitud de onda de excitación y emisión de 530 nm y 590 nm, respectivamente, para obtener una curva estándar. Los detalles sobre las curvas estándar obtenidas se encuentran en el capítulo 6.1, donde se obtuvo una relación lineal con un R<sup>2</sup> de 0.99 para ambas líneas celulares. El control negativo se definió como la fluorescencia registrada para medio fresco y se restó de cada resultado de muestra evaluado.

### **3.5.2 Curva de crecimiento**

Se llevó a cabo el proceso de cultivo y subcultivo de las células en estudio (L929 N, L929 N cMc y L929 N T tratadas con diferentes concentraciones de agente anti-micoplasma). Estas células se encontraban incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en cajas T25 con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Posteriormente, se realizaron subcultivos para sembrar 10,000 células por pozo en una placa de 24 pozos para cada tipo de célula, duplicando cada muestra.

Se realizó el proceso de subcultivo mediante la remoción del medio de cultivo y la adición de 1 ml de tripsina (Gibco™). Luego, se incubó durante 5 minutos a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a neutralizar la tripsina mediante la adición de 1 ml de medio de cultivo. El medio con tripsina de la caja T25 se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm. Tras la

centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 3 ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). A continuación, se llevó a cabo el conteo de células utilizando azul de tripano y se calculó la cantidad necesaria para sembrar 10,000 células en cada pozo de la placa de 24 pozos. Posteriormente, se sembraron las células en las placas de 24 pozos, empleando 3 pozos en cada tiempo de medición.

La curva de crecimiento se llevó a cabo con una medición cada 24 horas durante 6 días (144 horas). Antes de iniciar el ensayo en cada tiempo de medición, se preparó una solución de resazurina diluida en medio DMEM en una relación de 1:10, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la curva estándar en el capítulo 3.5.1. Se retiró el medio de cultivo de 3 pozos por cada tiempo de estudio, se realizó un lavado con 500  $\mu$ l de PBS estéril y luego se agregaron 300  $\mu$ l de la solución de resazurina. La placa se incubó por 3 horas a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en la oscuridad, cubriendo la placa con papel aluminio. Pasado el tiempo de incubación, se transfirieron alícuotas de 100  $\mu$ l a una placa de 96 pozos en triplicado y se realizaron las mediciones para cada muestra utilizando Cytation3® (BioTeK, USA) con una longitud de onda de excitación y emisión de 530 nm y 590 nm, respectivamente.

Para realizar el conteo las células presentes, se realizó la tinción con DAPI siguiendo el proceso descrito en el capítulo 3.2.2. en los pozos que fueron empleados con resazurina en los tiempos de estudio, se realizó un lavado con PBS y se procedió con el procedimiento de tinción, al finalizar se realizó la visualización y conteo de núcleos de células teñidos empleando el equipo Cytation3® (BioTeK, USA).

### **3.6 Ensayo de citotoxicidad con una sustancia de referencia**

Para cada una de las líneas celulares en estudio (L929 N, L929 N cMc y L929 N T tratadas con diferentes concentraciones de agente anti-micoplasma), se llevó a cabo un análisis de citotoxicidad utilizando diferentes concentraciones de dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma-Aldrich) para determinar las variaciones en la respuesta citotóxica en las diferentes líneas celulares como resultado del tratamiento para erradicar *Mycoplasma sp.*

Se emplearon dos placas de 96 pozos para evaluar el efecto citotóxico del SDS en un rango de concentraciones desde 2 mg/ml hasta 0.00002 mg/ml, utilizando diluciones seriadas de relación

1:10 en medio DMEM (Gibco™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco™). El ensayo se realizó por triplicado.

La solución de resazurina (PanReac AppliChem) empleada en la evaluación de citotoxicidad fue preparada a partir de una solución stock que tenía una concentración de 44µM. Por lo tanto, se preparó una solución realizando una dilución de relación 1:10 con medio DMEM (Gibco™).

A partir de un subcultivo de cada una de las células evaluadas (L929 N, L929 cMc, L929 N T 25 µg/ml P, L929 N T 37.5 µg/ml P, L929 N T 0.5 µg/ml MRA y L929 N T 0.2 µg/ml MRA), siguiendo el proceso detallado de subcultivo descrito en el numeral 3.1, se realizó la siembra de 10000 células por pozo en medio DMEM (Gibco™) suplementado con 10% de SFB (Gibco™) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posterior a las 24 horas de adherencia en incubación, se retiró el medio y se adicionó la solución de la sustancia de referencia (SDS) en diferentes concentraciones por triplicado. El tiempo de contacto de la solución de la sustancia de referencia con las células evaluadas fue de 42 horas (69,70). Pasado el tiempo de contacto, se removieron las soluciones de SDS y en condiciones de oscuridad se añadieron 100 µl de la solución de resazurina diluida (440 µM) en cada pozo, luego se recubrieron las cajas con papel aluminio y se procedió a incubar a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas.

Después de las 3 horas de incubación, se procedió a medir la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Luego, se calculó el porcentaje de supervivencia celular comparando la fluorescencia emitida por la muestra expuesta a la sustancia de referencia con la fluorescencia emitida por el control. A todas las condiciones se les restó el valor de fluorescencia base emitida por la resazurina sin reducir.

Como control positivo de citotoxicidad, se añadió TRITON-X100 (Sigma-Aldrich) al 0.1% v/v en PBS en lugar de SDS. El control negativo fue la medición de la fluorescencia emitida por la resazurina en un pozo con células que no fueron sometidas a las soluciones de SDS evaluadas.

### **3.7 Análisis estadístico**

La significancia estadística de la diferencia entre los grupos se evaluó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente

significativo y un valor de  $p < 0.001$  como altamente significativo. El análisis estadístico y la múltiple comparación de medias se realizó mediante el Test de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (Dotmatics Ltd, Boston, MA, USA).

## 4 Resultados and discusión

### 4.1 Selección de métodos de detección de *Mycoplasma sp.* en líneas celulares de mamíferos

La prevalencia de *Mycoplasma sp.* ha sido reportada en al menos 35% de los cultivos celulares a rededor del mundo (28,71,72). La detección de *Mycoplasma sp.* es un paso crucial en los ensayos que involucran líneas celulares. Para lograr una detección efectiva, se recomienda realizar una evaluación preliminar de los diferentes métodos disponibles en el mercado, comparando sus ventajas y desventajas. Muchos investigadores emplean diferentes métodos para la detección exitosa de *Mycoplasma sp.* siendo el cultivo directo en especial el método más eficaz, pues su posibilidad de obtener resultados falsos negativos es nula y un crecimiento característico es el indicativo de presencia de *Mycoplasma sp.* (73).

La especificidad del método seleccionado es importante, si se requiere la identificación precisa del género de *Mycoplasma sp.* presente en el cultivo contaminado, lo cual facilitaría una búsqueda más selectiva de tratamiento. Por lo que, el proceso de selección y el establecimiento de un método de detección para este patógeno se basó en el análisis de diversas variables, como el tiempo de detección, la especificidad y la sensibilidad para llevar a cabo la detección de *Mycoplasma sp.* en el cultivo celular en estudio(73). Los métodos disponibles se dividieron en tres categorías: métodos tradicionales (medios de cultivo y tinción), métodos moleculares (PCR punto final, PCR cuantitativa y PCR isotérmica) y métodos alternativos (como la técnica enzimática mediante luminiscencia, el uso de líneas celulares recombinantes y sondas específicas).

La selección del método adecuado para la detección de *Mycoplasma sp.* en el contexto específico del estudio se basó en varios aspectos, como el tipo de técnica o enfoque utilizado, el costo de implementación y la sensibilidad de la técnica. Se realizó una evaluación exhaustiva considerando estos aspectos con el objetivo de identificar los métodos más apropiados. Los

métodos seleccionados incluyeron la inmunotinción con DAPI, la detección molecular mediante PCR de punto final y la técnica bioluminiscente. Estas técnicas se eligieron debido a su sensibilidad y a los diferentes enfoques que permiten detectar la presencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo celular.

El enfoque de inmunotinción con DAPI permite la visualización y el establecimiento de la presencia de especies de *Mycoplasma sp.* cultivables y no cultivables, siendo un método de detección paralelo recomendado por los procedimientos de la FDA (1). No obstante, este método depende de la experiencia profesional y exige la corroboración de los resultados obtenidos con métodos alternativos de detección, siendo esta la causa de la selección de las técnicas moleculares y bioluminiscentes como enfoques alternativos de detección.

Estas técnicas de contraste requieren un menor tiempo de ejecución, pero con costos superiores para su implementación a las técnicas convencionales, siendo dependiente de la casa comercial seleccionada y los materiales adicionales necesarios para determinar la presencia del patógeno en la línea celular en estudio. En el caso de los kits de PCR, el mercado presenta una variedad de kits de ensayos comerciales que difieren en cuanto a sus especificaciones. Por lo que, aplicando los criterios establecidos para la determinación del kit más apropiado para realizar la evaluación de presencia, se estableció que el kit de ABM es el ensayo que cumple con el objetivo de determinar un método de detección confiable, fácil empleo a un costo accesible en comparación con otros kits comerciales disponibles en el mercado.

El método enzimático basado en bioluminiscencia permite detectar las enzimas carbamato quinasa y acetato quinasa producidas por *Mycoplasma sp.* durante su crecimiento. La interacción de estas enzimas con el reactivo y el sustrato presente en el kit de Lonza(57), genera una señal de luminiscencia, indicando la presencia o ausencia del patógeno en la muestra en estudio. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este ensayo es específico para las enzimas mencionadas y existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos debido a la presencia de otras bacterias que también pueden utilizar estas enzimas en ciertos ciclos metabólicos (74). Para implementar este método de detección, fue necesario establecer un riguroso protocolo de esterilidad e inocuidad que asegurara la ausencia de otros microorganismos que podrían generar resultados incorrectos o contaminación del cultivo. Esto garantizó la fiabilidad y precisión de los resultados obtenidos mediante el ensayo enzimático y aseguró que cualquier detección de *Mycoplasma sp.* fuera atribuida únicamente a la presencia real de este patógeno en la muestra.

Asimismo, se llevó a cabo el ensayo de detección tradicional utilizando el método de aislamiento de *Mycoplasma* sp. mediante cultivo en medios líquidos y sólidos específicos para su crecimiento, utilizando el medio Mycoplasma de Sigma-Aldrich. Sin embargo, no se logró obtener el crecimiento de una unidad formadora de colonia (UFC) que presentara las características macroscópicas típicas de *Mycoplasma* sp., como una colonia plana en forma de huevo frito con un centro de coloración crema y un halo alrededor. Siendo esto un resultado opuesto a lo observado con la inmunotinción con DAPI, donde ya había observado preliminarmente la presencia del patógeno en el cultivo celular en estudio. El ensayo de detección tradicional no fue exitoso en confirmar el crecimiento de *Mycoplasma* sp., pues las características macroscópicas requeridas para la identificación del patógeno no fueron observadas en el cultivo sólido después de un cultivo de 21 días.

## **4.2 Ensayos de detección de *Mycoplasma* sp.**

### **4.2.1 Ensayo de sensibilidad de detección de *Mycoplasma* sp. mediante método de bioluminiscencia**

La sensibilidad del MycoAlert™ PLUS fue evaluada mediante la dilución de los componentes del kit en PBS, buscando la posibilidad de emplear menores cantidades de sustrato, reactivo y la muestra manteniendo las cantidades de sustrato y reactivo establecidas por el proveedor. Sin embargo, al diluir los componentes a la mitad o más, se obtuvieron resultados negativos (falso-negativos) en la medición, mientras que la medición con las cantidades establecidas del kit con 100 µl de cada componente y muestra contaminada generó un resultado de relación de luminiscencia de 16.8 RLU (unidades relativas de luminiscencia), claramente indicando la presencia de *Mycoplasma* sp. en la muestra estudiada. Debido a estos resultados se concluyó que la dilución de los componentes del kit no es una opción válida para obtener resultados confiables.

Por otro lado, la prueba mostró resultados positivos al emplear 50 µl de muestra diluida en PBS, indicando que las muestras pueden ser diluidas hasta en una relación 1:2 (5:10) manteniendo la sensibilidad para detectar la presencia de *Mycoplasma* sp. No obstante, es importante tener en cuenta que con mayores diluciones existe la posibilidad de que, en bajas concentraciones de

*Mycoplasma sp.*, la prueba genere resultados falso negativos. En consecuencia, se sugiere que el kit se pueda emplear diluyendo la muestra hasta una relación máxima de 1:2 (5:10) con el fin de obtener resultados más precisos de presencia o ausencia del patógeno (Figura 1A).

#### 4.2.2 Ensayo de sensibilidad del método molecular (PCR punto final)

La validación de la sensibilidad del kit de PCR seleccionado permitió contrastar la cantidad mínima necesaria de cada uno de los componentes de la prueba para obtener un resultado acertado en la detección de *Mycoplasma sp.* empleando un control positivo para confirmar la sensibilidad del método. Para ello, se empleó un diseño de experimentos  $3^3$ , que permitió analizar el efecto de la variación de los componentes de la prueba de detección para determinar la cantidad mínima necesaria de los componentes del kit (Master Mix con Blast taq, *primer* y muestra) y obtener un resultado de detección acertado dado el uso del kit empleado.

El control de la prueba confirmó la detección de *Mycoplasma sp.* con las cantidades establecidas por el proveedor, empleando 12.5  $\mu\text{l}$  de Master Mix, 1.0  $\mu\text{l}$  de *primer* y 2.5  $\mu\text{l}$  de muestra en el Ensayo T27 del diseño de experimentos (Tabla 4). La validación de la sensibilidad del kit estableció la posibilidad de obtener falso-negativos al emplear un volumen menor a 10.5  $\mu\text{l}$  de Master Mix y 0.75  $\mu\text{l}$  de *primer* en el ensayo de detección, estableciendo que, 6 de los 27 ensayos del diseño de experimentos fueron resultados falso-negativos, con cantidades de Master Mix y *primer* que no eran volúmenes viables para detectar efectivamente a *Mycoplasma sp.* en la muestra en estudio, determinando que el kit podía ser empleado hasta con 10.5  $\mu\text{l}$  de Master Mix, 0.75  $\mu\text{l}$  de *primer* y 1.5  $\mu\text{l}$  de muestra con el que se lograba que la totalidad de ensayos fueran positivos y se aseguraba que la prueba estaba detectando al patógeno, como se puede observar en la Figura 1B.

Cabe resaltar que, en el diseño de experimentos realizado se muestra que un resultado equivalente a 1 es un resultado positivo de detección de *Mycoplasma sp.*, y un resultado de 0 es equivalente a negativo (falso-negativo) de presencia de *Mycoplasma sp.* (Figura 1B).

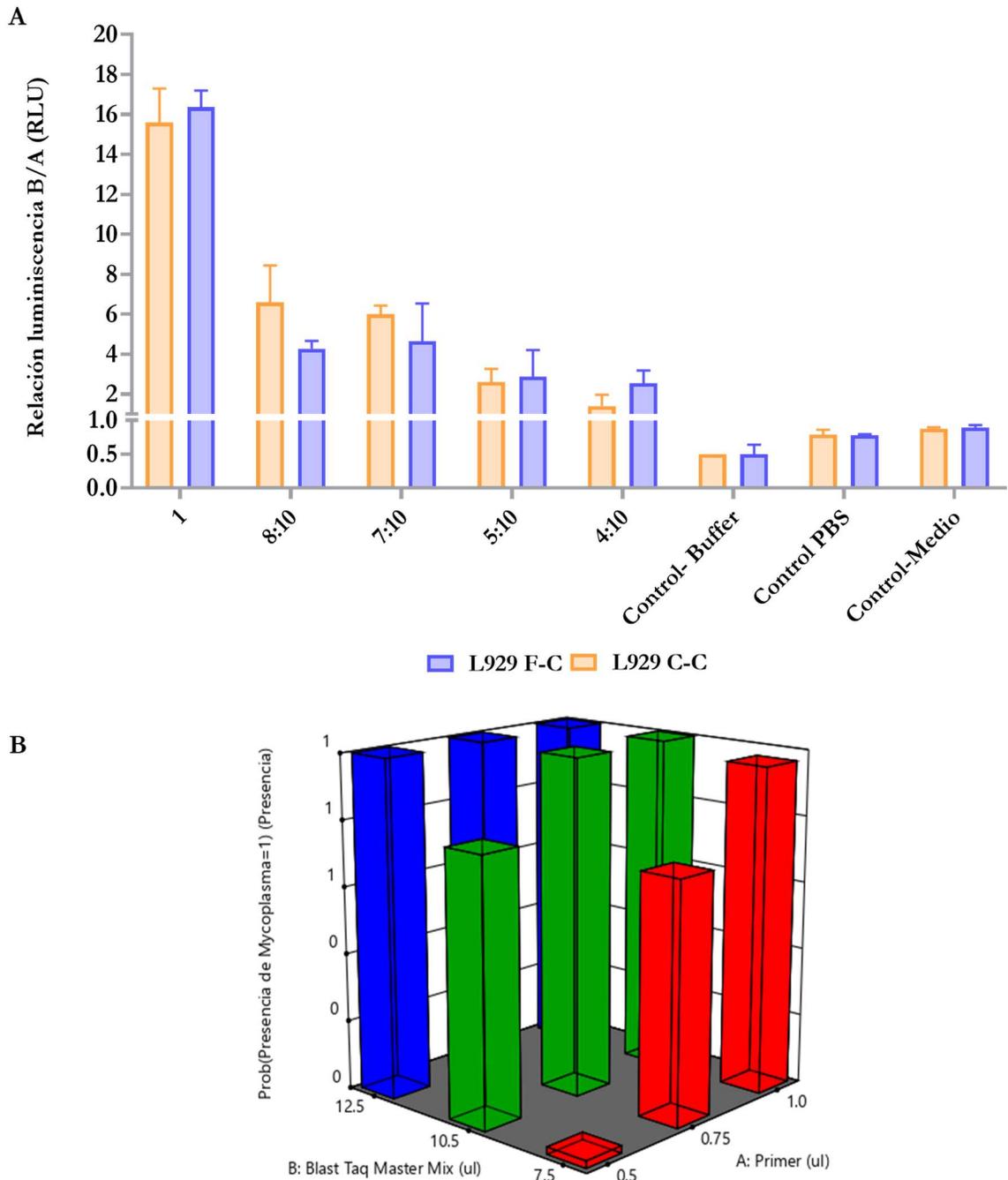


Figura 1. Ensayos de sensibilidad de los kits de luminiscencia MycoAlert™ PLUS y de PCR con las muestras de la línea celular L929 Contaminada con *Mycoplasma sp.* (L929 C).

A Diagrama de barras de la sensibilidad del kit de MycoAlert™ PLUS mediante la medición de unidades relativas de luminiscencia con diferentes diluciones de la muestra células L929, sustrato y reactivo (Tabla 2). Diluciones de 8:10, 7:10, 5:10, 4:10 de muestra con los volúmenes establecidos de 100  $\mu$ l de sustrato y 100  $\mu$ l de reactivo y volumen final de muestra 100  $\mu$ l empleando las células L929 Contaminada en cultivo (L929 C-C) y las células L929 contaminada del banco de células L929 preservadas (L929C-F). B Diagrama de barras en 3-D de la sensibilidad del diseño de experimentos con el kit de PCR con un volumen de 1.5  $\mu$ l de muestra de control positivo para detectar al *Mycoplasma sp.* en función de los factores A. primer con volúmenes (0.5  $\mu$ l, 0.75  $\mu$ l, 1  $\mu$ l) B. Master Mix - Blast Taq (Enzima). Barras de color rojo representan la medición con un

volumen de 7.5 µl de Master Mix - Blast Taq, las barras de color verde representan la medición empleando un volumen de 10.5 µl de Master Mix - Blast Tal y las barras color azul representan la medición con volumen de 12.5 µl de Master Mix - Blast Taq.

Las características de un método de detección ideal incluyen sensibilidad, especificidad, exactitud, rapidez, relación costo-efectividad y facilidad de interpretación (73). El ensayo con MycoAlert™ PLUS tiene una sensibilidad establecida por el fabricante de <50 UFC ml<sup>-1</sup>. Según los resultados de Molla *et al.* (2014), este ensayo mostró una sensibilidad de detección del 91.30% en comparación con el método de PCR seleccionado, el cual demostró una sensibilidad y efectividad de detección del 100%. Estos hallazgos resaltan la importancia de estandarizar el límite de detección y sensibilidad de la técnica para garantizar resultados precisos en la prueba.

La elección del método de detección queda a discreción del investigador, pero la confirmación de sensibilidad y especificidad depende de las células utilizadas y las técnicas seleccionadas(73). Algunos investigadores consideran que el método de luminiscencia bioquímica con MycoAlert™ PLUS es más selectivo en comparación con la PCR y el cultivo microbiano como método directo, debido a su alta selectividad (47). Sin embargo, otros destacan que la PCR es más reproducible, de fácil interpretación y aceptada en términos de sensibilidad y detección (75).

Después de realizar diferentes ensayos de sensibilidad, se determinó que el método de bioluminiscencia con MycoAlert™ PLUS requería utilizar los volúmenes establecidos por el fabricante. Las diluciones de los componentes de la prueba podrían afectar los resultados y generar falso-negativos en lugar de positivos en presencia de *Mycoplasma* sp. Por otro lado, la prueba de PCR seleccionada con el kit de detección de ABM demostró una alta sensibilidad para detectar la presencia de *Mycoplasma* sp. utilizando volúmenes mínimos de 10.5 µl de Master Mix, 0.75 µl de *primers* y 1.5 µl de muestra, tanto en muestras de control positivo como en muestras sin conocimiento previo de la presencia de *Mycoplasma* sp.

### **4.3 Detección de *Mycoplasma* sp. en líneas celulares animales L929 con los métodos seleccionados**

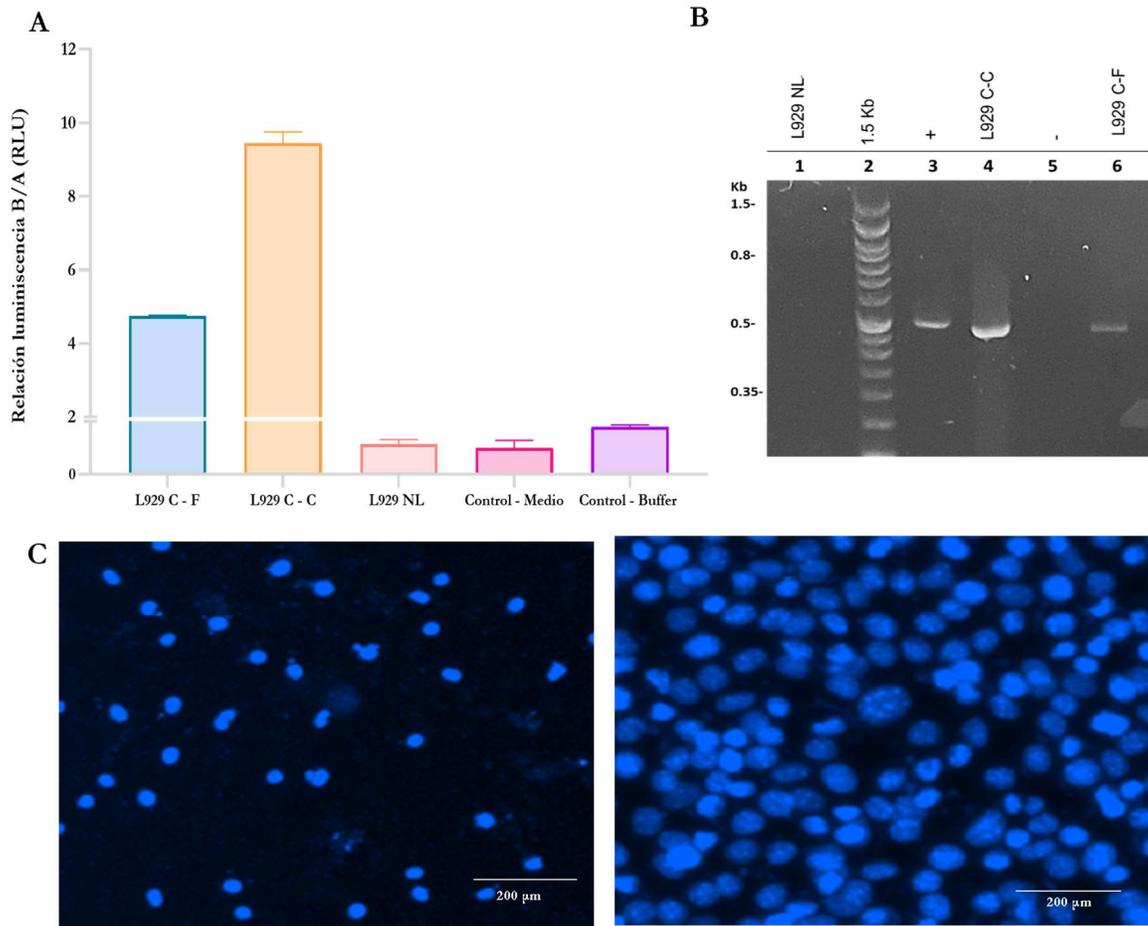
Considerando que la contaminación puede ser la causa de desviaciones en los resultados de cultivo celular, resulta fundamental utilizar métodos disponibles para la detección de *Mycoplasma*

sp. con el fin de obtener resultados científicos confiables (76,77)(50,78). Con este precedente, se seleccionaron los métodos de detección (luminiscencia bioquímica, PCR y tinción con DAPI) y se determinó la presencia del *Mycoplasma* sp. en la línea celular L929, que estaba siendo empleada en el laboratorio para diferentes ensayos de proliferación y citotoxicidad celular.

La detección de *Mycoplasma* sp. utilizando el método de luminiscencia reveló la presencia de contaminación en las muestras de la línea celular L929 en estudio. La Figura 2A muestra los resultados de la relación de luminiscencia obtenida antes (A) y después (B) de la adición del sustrato en las muestras contaminadas de células en cultivo L929 (L929 C-C) y las tomadas de conservación a  $-80^{\circ}$  C en cultivo durante 2 días (L929 C-F).

Los resultados de la relación de las mediciones de luminiscencia fueron superiores a 1 y 1.2, lo que indicaba la presencia de contaminación por *Mycoplasma* sp. Este resultado está relacionado con la emisión de ATP generada por la presencia de bacterias vivas en el cultivo celular durante su crecimiento, así como la detección de las enzimas carbamato quinasa y acetato quinasa, las cuales están asociadas a la ruta metabólica de la arginina dihidrolasa y son responsables de la síntesis de ATP en los microorganismos del género Mollicutes (74).

Para confirmar la presencia del patógeno mediante los otros métodos seleccionados en cuanto al método tradicional, en la tinción con DAPI (Figura 2C) se observaron precipitados alrededor de las células, indicando una contaminación con *Mycoplasma* sp. desde las 24 horas hasta las 96 horas de cultivo. Asimismo, el gel de electroforesis teñido con Bromuro de etidio permitió visualizar la presencia de *Mycoplasma* sp. en los medios tomados del cultivo de las muestras de L929 C-C y L929 C-F, al obtener una banda luminiscente con un peso de 500 pb similar al control positivo con material genético de *Mycoplasma* sp. (Figura 2B).



**Figura 2.** Contraste y detección de *Mycoplasma sp.* en la línea celular L929 en cultivo con los métodos de detección selección.

**A** Diagrama de barras de la relación de luminiscencia obtenida con MycoAlert™ PLUS de la línea celular L929 contaminada con *Mycoplasma sp.*, (L929 C-C), células L929 nuevas libre de *Mycoplasma sp.* (L929 NL), las células L929 en preservación  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  posterior a 2 días de cultivo (L929 C-F), Control con medio (M) y buffer (B). **B** Gel de electroforesis de la detección de *Mycoplasma sp.* con el kit de ABM con las células L929 NL, L929 C-C y L929 C-F. Control negativo (-) con agua desionizada estéril y control positivo (+) con la solución con micoplasma liofilizado del kit con una banda positiva a 500 bp. **C**. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células contaminadas L929 C-C a las 24 horas de cultivo y 96 horas de cultivo. Filtro DAPI Objetivo 10X barra de medición 200  $\mu\text{m}$ .

Las líneas celulares L929 que dieron positivo a la presencia de *Mycoplasma sp.* demostraron que el patógeno puede sobrevivir al proceso de conservación en nitrógeno líquido (L929 C-F) y seguir siendo viable después del primer cultivo posterior a la conservación de la línea celular (Figura 2 a-b). Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Fallagan-Lotch *et al.* 2015, donde compararon el efecto de la conservación de muestras sobrenadantes en la detección de *Mycoplasma sp.* utilizando el método bioluminiscente y la PCR (24). Además, se observó una diferencia significativa en los resultados de la relación de luminiscencia entre las células nuevas

y libres de *Mycoplasma* sp. L929 NL, y las células contaminadas tanto crío preservadas (L929 C-F) como en cultivo (L929 C-C). También se evidenció la inocuidad y ausencia de *Mycoplasma* sp. con resultados inferiores a 1 en la relación de luminiscencia.

De la misma manera, [Degeling et al., \(2012\)](#) llevaron a cabo evaluaciones de diferentes métodos para determinar la presencia o ausencia del patógeno en las células utilizadas mediante un ensayo diseñado por el equipo de investigación. Este ensayo de detección de *Mycoplasma* sp. se basó en la degradación del gen reportero *Gaussia luciferasa*, el cual fue añadido a las células mediante un lentivirus. Para validar este ensayo, se comparó con otras técnicas de detección disponibles en el mercado, como MycoAlert™ PLUS (Lonza) y PCR con el kit de detección de micoplasma de PromoKine (PromoCell). Los resultados obtenidos fueron consistentes entre los dos métodos de detección, lo que llevó a la conclusión de que este ensayo era válido para detectar la presencia de *Mycoplasma* sp. y era necesario el empleo de pruebas contraste para validar la presencia del patógenos en las muestras en estudio (79).

Por otro lado, en el estudio realizado por [Russel et al., \(2020\)](#), se llevó a cabo una comparación de cinco kits comerciales para la detección de *Mycoplasma* sp. en la producción de un virus utilizando líneas celulares animales y humanas, como Vero, BHK-21, AP61 y MRG-5. Se analizaron los resultados positivos y los falso-negativos obtenidos con los cinco ensayos de detección, incluyendo el kit de PCR para la detección de micoplasma (ABM) y MycoAlert™ PLUS (Lonza). Se observó que el kit de luminiscencia bioquímica MycoAlert™ PLUS arrojó 28 resultados falso-negativos. Los autores atribuyeron esto a su capacidad de detectar *Mycoplasma* sp. viable en las muestras, a diferencia de la PCR que detecta el ADN, concluyendo así que la detección con el kit MycoAlert™ PLUS debe realizarse en un cultivo fresco de *Mycoplasma* sp., donde el patógeno haya tenido tiempo suficiente para multiplicarse en su temperatura óptima, y en un cultivo activo de al menos 24 horas, a fin de asegurar la confiabilidad de los resultados (80).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la [Figura 2A](#), donde se identificó la presencia de *Mycoplasma* sp. en las células L929 C-F, que fueron conservadas en un tanque de nitrógeno líquido. La relación de luminiscencia registrada (3.5) fue inferior a la de las células que ya estaban contaminadas en cultivo (L929 C-C). Sin embargo, esta evaluación se llevó a cabo después de

24 horas de incubación a 37°C, lo que indica que dicho periodo de incubación fue suficiente para activar el *Mycoplasma sp.* viable e iniciar su replicación, lo que permitió detectar la presencia del patógeno en el cultivo analizado.

#### **4.4 Efecto de la presencia de *Mycoplasma sp.* en líneas celulares contaminadas**

La comparación entre la concentración celular de las líneas celulares L929 contaminadas (L929 C), L929 libres de *Mycoplasma sp.* (L929 NL) en 144 horas de incubación se realizó para observar la influencia de la presencia de *Mycoplasma sp.* en la proliferación celular. Los resultados de ANOVA con un  $p < 0.001$  indica que hay significancia en términos del modelo. La [Figura 3A](#) muestra que en los tiempos de estudio entre las 48 y las 120 horas una diferencia significativa de entre las células contaminadas (L929 C M1 y L929 C M2) y las células libres de contaminación (L929 N M3 y L929 N M2), determinada por la concentración celular obtenida a partir de la relación de las curvas patrón establecidas ([Figura 8](#) y [Figura 9](#)) como medida inicial para determinar la concentración celular presente en la medición de fluorescencia emitida en el ensayo de proliferación por la reducción de resazurina cada 24 horas.

En una observación preliminar, se puede notar que el aumento o disminución en la velocidad de crecimiento de las líneas celulares contaminadas, según el estudio de [Peterson \*et al.\* \(2004\)](#), puede estar relacionado con el número de subcultivos previos realizados en las células L929 C M1 y L929 C M2 ([81](#)). Además, durante los primeros meses del estudio, se detectó de manera constante la presencia de *Mycoplasma sp.*, indicando la persistencia del patógeno durante 5 meses. Al analizar el cultivo en estudio, se observaron características distintivas que afectaron la proliferación de la línea celular contaminada (L929 C), como un incremento acelerado en el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento entre las 24 y 96 horas de estudio, con valores de 33 h y  $1.4 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

Estos hallazgos pueden estar asociados a la interacción y competencia por los nutrientes entre las células L929 contaminadas y el patógeno *Mycoplasma sp.*, como se determinó en el estudio de [Gerlic \*et al.\*, \(2004\)](#). Inicialmente, *Mycoplasma sp.* inhibe la apoptosis celular para mantener su viabilidad y continuar su replicación, lo que se observa como un crecimiento acelerado en las

primeras horas de estudio (82). Sin embargo, el descenso en la velocidad de proliferación a las 120 horas de estudio ( $0.9 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) puede atribuirse al estrés oxidativo inducido por la continua presencia del patógeno en el cultivo. Durante su crecimiento y síntesis de lípidos, *Mycoplasma* sp. produce peróxido de hidrógeno y superóxido, lo cual genera toxicidad en el medio de crecimiento, resultando en una disminución en la concentración celular viable (74), tal como se determinó mediante el ensayo de proliferación utilizando resazurina (Figura 3A).

Por otro lado, se observó que las células L929 NL mostraron una fase lenta de adaptación y crecimiento, indicando que la ausencia de competencia por nutrientes permite un mayor tiempo de duplicación (29 h) en comparación con las células contaminadas. Además, estas células mantuvieron una fase de crecimiento exponencial continuo incluso después de 120 horas de siembra. Debido a que estas células tienen menos subcultivos (Pase 3), su velocidad de crecimiento es inicialmente menor en las primeras horas de cultivo, pero muestran una tendencia creciente a lo largo del ensayo (Figura 3A y Figura 3B) (83).

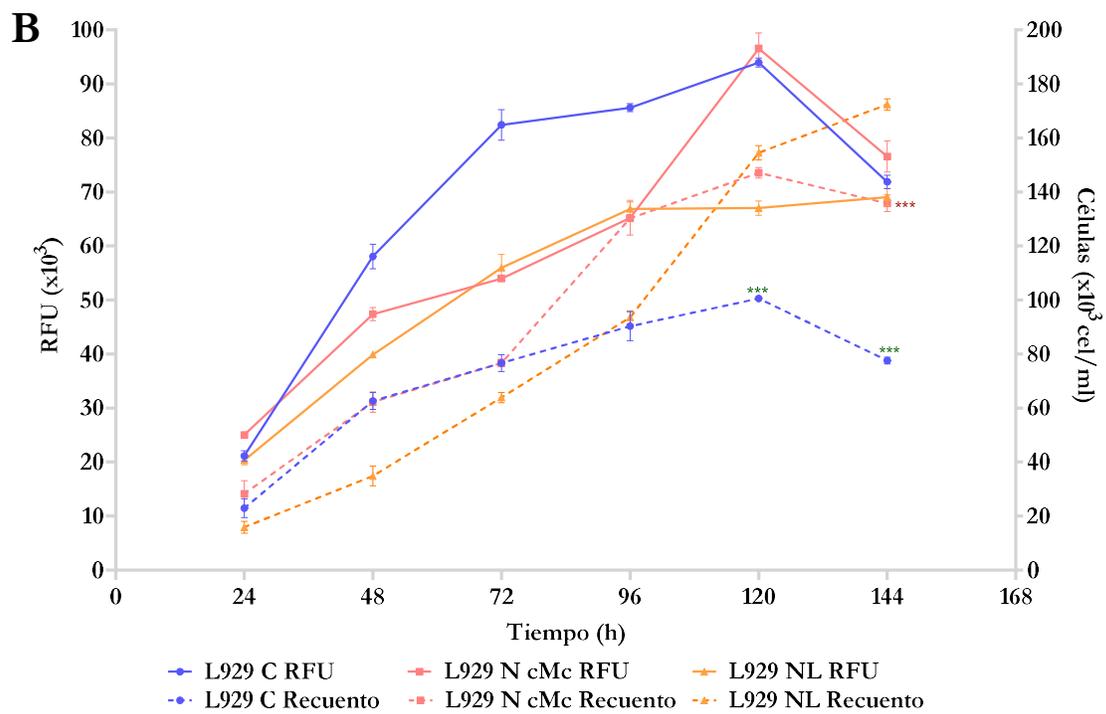
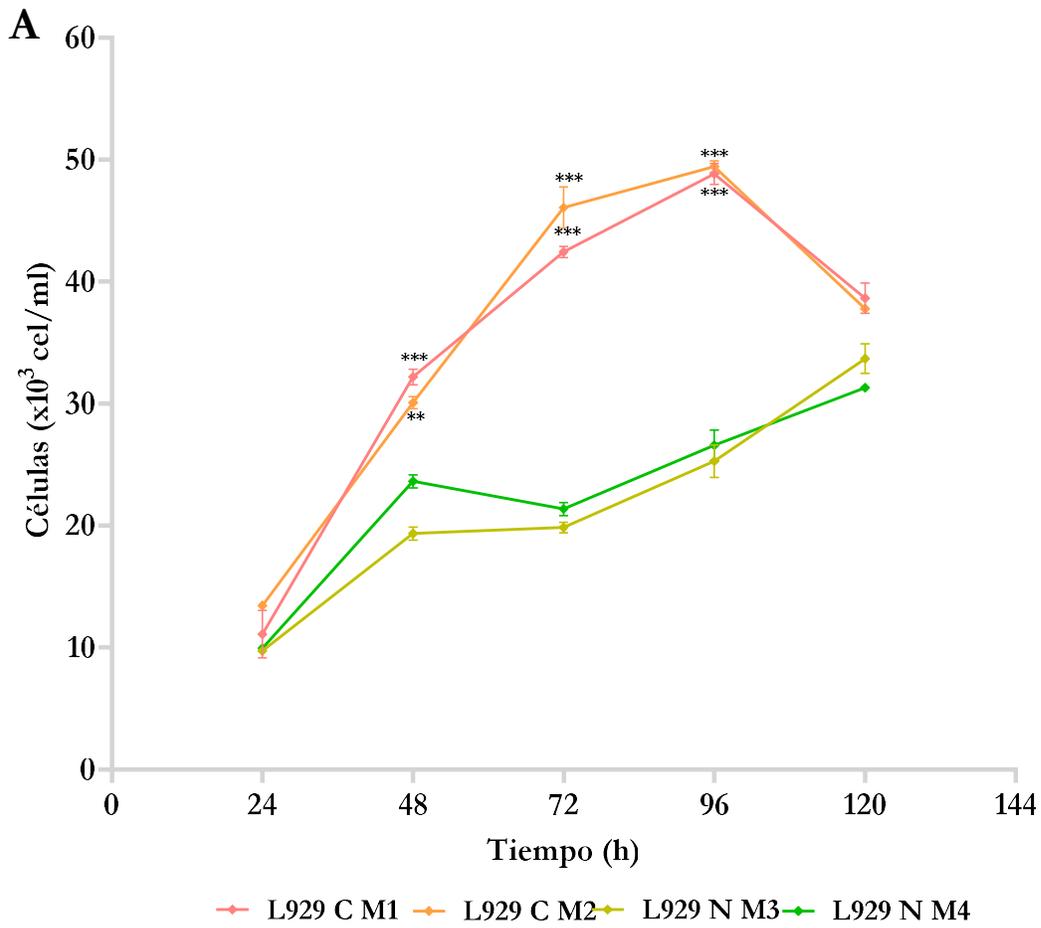
Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el estudio de Prasertsung *et al.*, (2013) donde se midió un tiempo de duplicación de 30 h en las células L929, a pesar de que otros autores establecen rangos de 24-30 h de tiempo de duplicación (83). Además, es importante tener en cuenta que la presencia de *Mycoplasma* sp. puede afectar los resultados esperados en las mediciones de viabilidad y proliferación celular. La competencia por nutrientes y la necesidad de supervivencia tanto de las células como del patógeno pueden acelerar la tasa de proliferación, lo que podría indicar un mayor crecimiento del cultivo a medida que se obtienen más nutrientes en cada subcultivo y cambio de medio. Sin embargo, en lugar de eso, se observa un punto máximo de crecimiento exponencial que luego concluye en una fase estacionaria leve y el inicio de la senescencia (Figura 3A y Figura 3B).

De manera paralela, en la Figura 3B se observa el efecto de la presencia y ausencia de *Mycoplasma* sp. en la proliferación celular al comparar los resultados de la medición de fluorescencia con resazurina y el recuento celular mediante tinción de DAPI en las células L929 libres de contaminación (L929 NL), contaminadas con *Mycoplasma* sp. (L929 C) y las células nuevas intencionalmente contaminadas con medio con *Mycoplasma* sp. (L929 N cMc).

En este sentido, las células L929 N cMc muestran una tendencia de crecimiento similar a las células L929 NL en cuanto a velocidad, pero a medida que pasan las horas, se evidencia que la presencia de *Mycoplasma sp.* genera un marcado decrecimiento en las unidades de fluorescencia obtenidas a las 120 horas de ensayo y una disminución leve en el recuento celular en comparación con la tendencia creciente observada en las células libres de *Mycoplasma sp.* (L929 NL) durante todo el ensayo, lo cual indica la influencia de *Mycoplasma sp.* en las últimas horas de ensayo en las células L929 C.

Estos resultados muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en diferentes tiempos de análisis entre las células L929 N cMc y L929, dado que, entre las 24 y 72 horas se observaron conteos celulares más altos en las células contaminadas en comparación con las células L929 NL, lo que indica un perfil de crecimiento similar a las células L929 C durante las primeras 72 horas. Sin embargo, a las 120 horas de crecimiento se observa un cambio en la continuidad de la fase exponencial en las células L929 N cMc, lo cual demuestra que la presencia de *Mycoplasma sp.* en poco tiempo (tres semanas) genera cambios en el comportamiento celular. Finalmente, en el último tiempo de análisis (144 h), se evidencia una disminución en la cantidad de células viables presentes en las células L929 N cMc, como resultado de la contaminación con *Mycoplasma sp.* (Figura 3B).

En el estudio realizado por *Gedye et al. (2015)*, se comparó la proliferación de células de melanoma LM entre células libres de contaminación y células contaminadas con *Mycoplasma sp.*, la presencia del patógeno se determinó utilizando dos métodos similares a los empleados en este estudio, MycoAlert™ PLUS y PCR. Los resultados obtenidos mostraron una tendencia similar, donde se observó que las células contaminadas presentaban una mayor absorbancia con el Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de manera continua, durante 14 días, en comparación con las células libres de contaminación (84), lo cual concuerda con los resultados presentados en las primeras 120 horas de nuestro estudio, utilizando resazurina (Unidades Relativas de Fluorescencia -RFU) (Figura 3B), donde se observa una disminución considerable del recuento de células viables y la fluorescencia emitida por las células al estar contaminadas.



**Figura 3.** Evaluación de la proliferación de la línea L929 Contaminadas (L929 C), L929 Nuevas libres de *Mycoplasma sp.* (L929 NL) y Nuevas intencionalmente contaminadas con *Mycoplasma sp.* (L929 N cMc).  $1.0 \times 10^4$  cel/ml en cada pozo (placa de 24 pozos). A. Evaluación de la proliferación mediante la medición de la fluorescencia de las células L929contaminadas muestras 1 y muestra 2 (cajas diferentes de cultivo) L929 C M1 y M2, y las células L929 nuevas libres de contaminación pase 3 (L929N M3 y M4) RFU: Unidades relativas de fluorescencia B. Evaluación de la proliferación mediante la medición de la fluorescencia (RFU) y conteo de número de células L929 contaminadas (L929 C), Células libres de contaminación (L929 NL) y L929 nuevas contaminadas intencionalmente con *Mycoplasma sp.* (L929 N cMc). Las células fueron enumeradas usando tinción con DAPI con el equipo Cytation 3.

Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en la [Figura 3B](#), donde las células contaminadas (L929 C y L929 N cMc) mostraron una mayor actividad metabólica en comparación con las células libres de contaminación. Estos resultados sugieren que *Mycoplasma sp.* también puede llevar a cabo la re-oxidación de NADH mediante la enzima glutamato deshidrogenasa, lo que contribuye al aumento en la reducción de resazurina mediada por NADH a  $\text{NAD}^+$ , observada en todas las etapas de estudio en las células contaminadas. Este fenómeno ya había sido establecido previamente por [Pollack et al., \(1997\)](#) en su estudio sobre el metabolismo de las bacterias del género *Mollicutes* (74).

#### 4.4.1 Ensayo de eficiencia de erradicación de *Mycoplasma sp.* con diferentes concentraciones de Plasmocin® y MRA.

El ensayo de tratamiento preliminar para establecer la concentración de Plasmocin® necesaria para tratar los cultivos celulares, se basa en emplear la concentración de tratamiento de manera proporcional a la concentración de *Mycoplasma sp.* presente en el cultivo celular contaminado (45), sin embargo, las instrucciones de los proveedores (InvivoGen y MP Biomedicals LLC ) indican la posibilidad de emplear diferentes cantidades para eliminar la presencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo celular. Para determinar la presencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo se empleó el método de detección de luminiscencia, donde la relación de la medición de luminiscencia previa (A) y posterior (B) a la adición del sustrato superior a 1.0, indica la presencia de *Mycoplasma sp.* en la línea celular en estudio.

El tratamiento de Plasmocin® se adicionó en concentraciones de  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $37.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  en las células L929 C en cultivo y con prevalencia del patógeno durante 10 pases. La primera semana de tratamiento, inicio la erradicación con una disminución en el resultado de relación de luminiscencia hasta 10.5 y 14.4 para los tratamientos de  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente, indicando una erradicación del 75 y 66%. Sin embargo, en la segunda semana

se observó la prevalencia de *Mycoplasma sp.*, aumento de la relación de luminiscencia en el caso de las células tratadas con  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  hasta 11.4 y una disminución que continuaba sobre el umbral de tratamiento efectivo de 6.0 en las células L929 tratadas con  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , indicando aún la presencia de *Mycoplasma sp.* (Figura 4A).

Dados los resultados de las primeras dos semanas, fue necesario la evaluación de una tercera semana para la erradicación de *Mycoplasma sp.* con el tratamiento, con una concentración de  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  de Plasmocin® y se determinó que el tratamiento de  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  no era suficientemente radical para eliminar la contaminación, en este caso del cultivo celular de L929 C que tenía mucho tiempo contaminado con el patógeno en estudio.

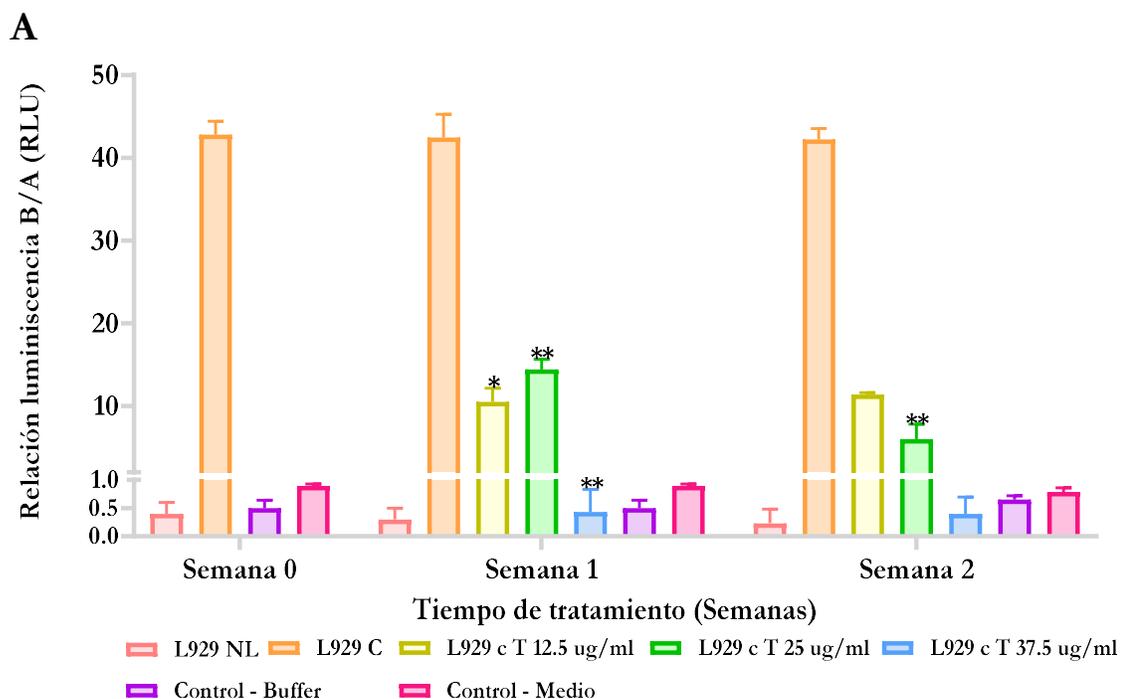
Cabe resaltar que en estudios como Uphoff *et al.* (2012) y Molla *et al.*, (2011) se emplea el tratamiento de *Mycoplasma sp.* con una concentración de  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , indicando que las concentraciones de los diferentes tratamientos empleados fueron aplicadas de acuerdo con las concentraciones establecidas por el fabricante (50,73). En el estudio de Molla *et al.*, (2011), se concluye que, de las líneas celulares infectadas, el 66% fueron tratadas con efectividad empleando Plasmocin® a una concentración de  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , por dos semanas, detectando la ausencia de *Mycoplasma sp.* al emplear el método de PCR (66).

Sin embargo, en este estudio, la adición de  $37,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de Plasmocin® al cultivo de células L929 C, evidenció un resultado radical, donde la primera semana se erradicó de manera efectiva en un 81% y en la segunda semana se completó la erradicación de *Mycoplasma sp.* presente en un 97% (Figura 4A). Por lo anterior, se puede inferir que el tratamiento de Plasmocin® a una concentración de  $37.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  es radical y efectiva, siendo importante evaluar cuál es el efecto de un tratamiento radical en la viabilidad y velocidad de proliferación de las células luego de estar contaminadas (Figura 4A).

Luego de determinar las cantidades que serían más pertinentes y efectivas para tratar la contaminación por *Mycoplasma sp.* en el cultivo celular, se procedió a evaluar la efectividad del tratamiento con *Mycoplasma sp.* de las células L929 NL contaminadas intencionalmente con medio de cultivo contaminado con *Mycoplasma sp.* (L929 N cMc) en cultivo, por un lapso de 3 semanas, el tratamiento se realizó con las concentraciones de Plasmocin® ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $37.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), ya determinadas en el tratamiento de las células L929 C, y el empleo del agente antimicoplasma MRA con dos concentraciones de estudio ( $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Estas células fueron el punto de partida para la evaluación de la efectividad de un tratamiento de *Mycoplasma* sp. en un escenario en donde las células están constantemente monitoreadas para el control de la contaminación con *Mycoplasma* sp. En este sentido, se determinó la presencia de *Mycoplasma* sp. empleando MycoAlert™ PLUS obteniendo un resultado mayor a 1 (47.5), luego de estar en contacto con un medio de cultivo contaminado con el patógeno. Con este resultado, se procedió a realizar un tratamiento con diferentes concentraciones y dos antibióticos de espectros diferentes (Figura 4C), Plasmocin® y MRA (65,66,79,85).

Luego de realizar el tratamiento por separado de las células contaminadas L929 N cMc con los dos antibióticos, se observó que en la primera semana hubo un efecto de erradicación significativo de las líneas tratadas en contraste con las células L929 N cMc. El tratamiento de las líneas celulares tratadas con Plasmocin® tuvo una respuesta de erradicación más rápida y eficaz, lo que corroboró el tiempo de tratamiento de dos semanas, como tiempo requerido para una erradicación efectiva, de acuerdo con lo establecido por el proveedor (Invivo Gen) y lo obtenido en el estudio de Molla *et al.*, (2011),(66).



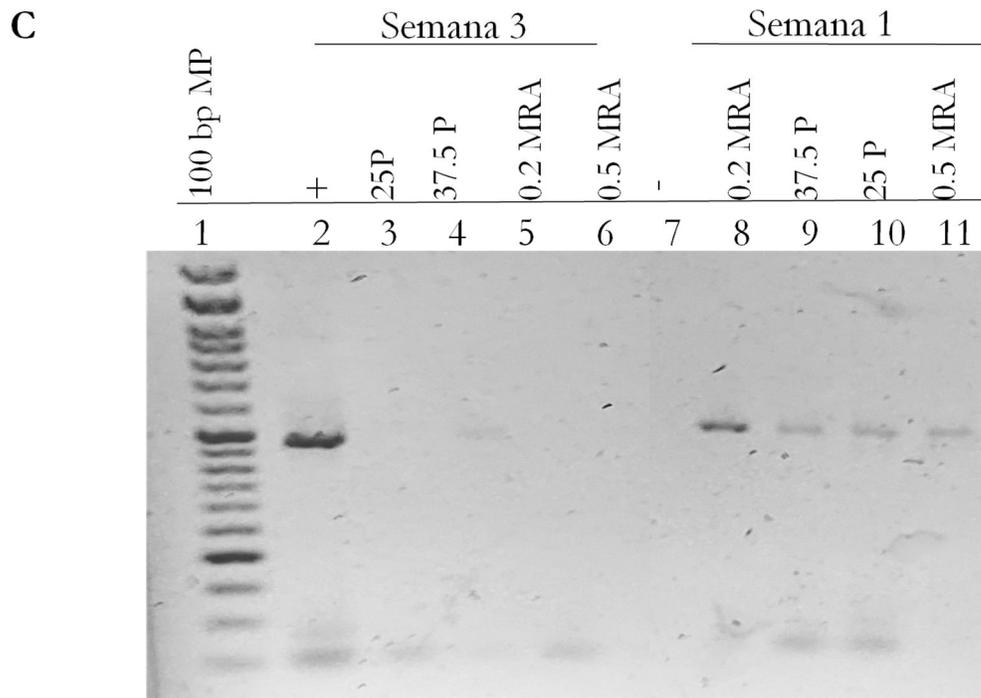
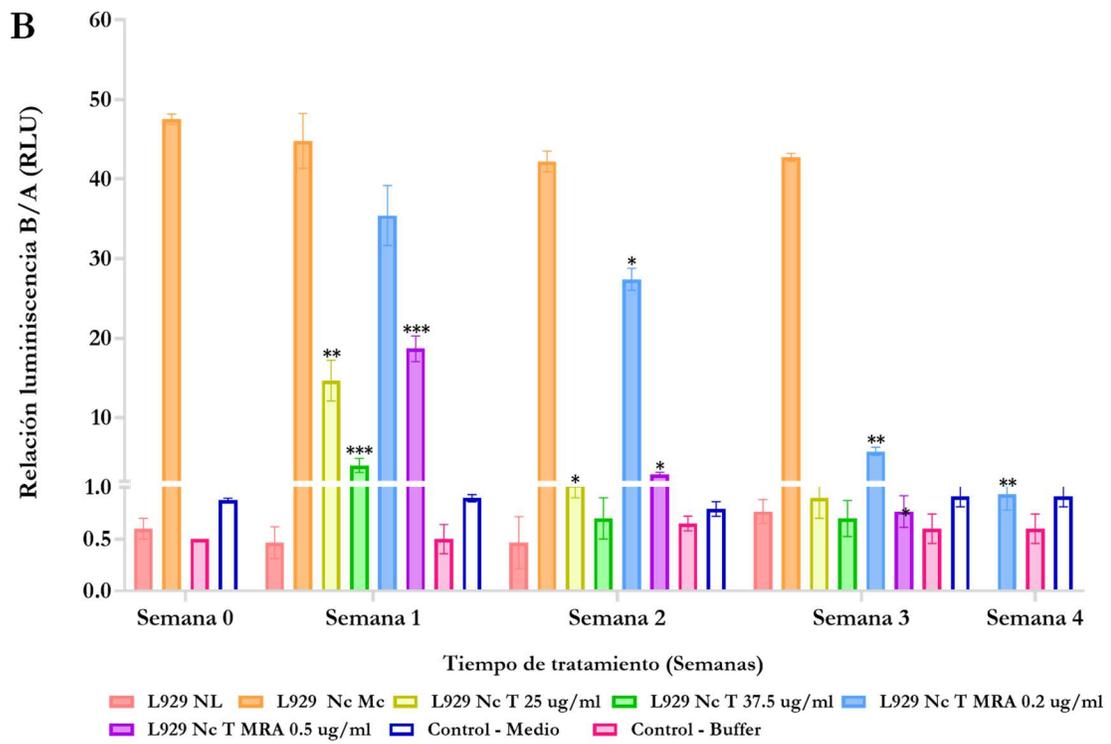


Figura 4. Tratamiento de *Mycoplasma sp.* con diferentes concentraciones a lo largo del tiempo.

A. Medición de presencia de *Mycoplasma sp.* mediante medición enzimática de la relación de luminiscencia B/A de las células L929 C (L929 contaminadas con *Mycoplasma sp.*) y su tratamiento con Plasmocin® a diferentes concentraciones (12.5 µg/ml, 25 µg/ml y 37.5 µg/ml) (L929c T). B. Medición de tratamiento de *Mycoplasma sp.* con Plasmocin® y MRA en las diferentes concentraciones mediante medición enzimática de la relación de luminiscencia B/A en las células L929 N cMc a lo largo de las semanas. C. Determinación de erradicación de *Mycoplasma sp.* de las células L929 N cMc (Células L929 Nuevas contaminadas con *Mycoplasma sp.*) mediante PCR punto final por tres semanas posterior al tratamiento de Plasmocin® (25 µg/ml y 37.5 µg/ml) y MRA (0.2 µg/ml y 0.5 µg/ml) Los ensayos desarrollados (\*) denotan significancia ( $n=3$  réplicas técnicas,  $p, < 0.001$ ) en comparación con todos los tiempos de los mismos tratamientos en estudio. Las barras de error representan 1 DS

Los resultados con Plasmocin® a 37.5 µg ml<sup>-1</sup> en la primera semana mostraron que esta concentración de tratamiento, al igual que en el ensayo preliminar (Figura 4A), tuvo un efecto radical en la eliminación de *Mycoplasma sp.*, con un 90% de erradicación, con respecto a la relación de luminiscencia obtenida con las células L929 N cMc y un resultado de luminiscencia menor a 1 en la segunda semana, indicando la erradicación total del patógeno del cultivo.

Asimismo, los resultados con Plasmocin® a 25 µg ml<sup>-1</sup> en la primera semana evidenciaron una erradicación parcialmente radical, que fue efectiva en el 69% y efectiva en más del 96% al finalizar la segunda semana de tratamiento, donde el resultado de luminiscencia obtenido (1.2) en la segunda semana estuvo en el límite máximo de reanálisis y ante la posibilidad de presencia de *Mycoplasma sp.* se decidió dejar 4 días adicionales con Plasmocin® en esta concentración y hacer una medición en la tercera semana para todas las células en cultivo, evidenciando así una erradicación satisfactoria para la tercera semana del tratamiento con Plasmocin® (Figura 4B).

Este proceso y efectividad del tratamiento concuerda con lo reportado por Yang *et al.*, 2012 en su estudio sobre el efecto inhibitorio que genera la presencia de *Mycoplasma sp.* en la respuesta celular de las células antitumorales realizó la evaluación y contraste entre las células infectadas y libres de *Mycoplasma sp.* y evaluó la presencia de *Mycoplasma sp.* mediante PCR, realizando el tratamiento con Plasmocin® hasta 3 semanas para lograr una erradicación efectiva del patógeno (86).

Por otro lado, al emplear el tratamiento con MRA en una concentración 0.5 µg ml<sup>-1</sup>, la primera semana de tratamiento, se observó una respuesta significativa de erradicación y se produjo una disminución del 60% en la contaminación en comparación con la relación de luminiscencia obtenida antes del tratamiento (44.8). Las células tratadas con esta concentración mostraron una respuesta similar al tratamiento con Plasmocin® a 25 µg ml<sup>-1</sup> y también requirieron 3 semanas para lograr una erradicación y ausencia aceptables de *Mycoplasma sp.* en el cultivo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Uphoff *et al.* (2002) en su estudio sobre el tratamiento de *Mycoplasma sp.*, donde reportaron una eficacia del 71 al 77% en el tratamiento de

células LL con una concentración de  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA. Entre los tratamientos con tetraciclinas y quinolonas evaluados en su estudio, el tratamiento menos efectivo fue MRA. Además, este tratamiento también mostró una mayor prevalencia o respuesta de resistencia por parte del patógeno, lo que explica la necesidad de un mayor tiempo de tratamiento para obtener resultados efectivos, como se observó en este estudio que requirió hasta 3 semanas de tratamiento (Figura 4B) (50,87).

En contraste, el tratamiento con una concentración de  $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA en la línea celular contaminada durante la primera semana, se observó una disminución del 25% en la luminiscencia y se requirieron 4 semanas de tratamiento para obtener resultados aceptables de luminiscencia (0.9), indicando la ausencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo (Figura 4B).

Por lo anterior, se confirma que con una concentración de  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA y las dos concentraciones de Plasmocin<sup>®</sup>, presentaron efectos significativos en la disminución de la contaminación de las células L929 N cMc en la primera semana y en contraste la concentración de  $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA requeriría más tiempo de tratamiento, dado que se observó un efecto significativo en la erradicación de *Mycoplasma sp.* solo hasta la segunda semana de tratamiento (Figura 4B).

Finalmente, se corroboró el progreso del tratamiento de las células L929 N cMc mediante la realización de dos geles de electroforesis. En la primera semana, se observó la presencia continua del patógeno, mientras que en la tercera semana se evidenció la ausencia de *Mycoplasma sp.* en las líneas celulares en tratamiento. La Figura 4C muestra el gel de electroforesis que abarca las semanas evaluadas, donde se observa una banda tenue de aproximadamente 0.5 kb en las células tratadas con Plasmocin<sup>®</sup> en ambas concentraciones estudiadas y con  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA.

Por otro lado, en el ensayo de la primera semana, se aprecia una banda de electroforesis bastante marcada en las células tratadas con  $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA, indicando la presencia continua del patógeno. Sin embargo, en la tercera semana, se observa la erradicación del patógeno en las células tratadas con Plasmocin<sup>®</sup> y con la concentración de  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA. Además, se puede apreciar una leve banda en la muestra de la línea celular tratada con la concentración de  $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MRA, lo cual indica que se requirieron 4 semanas de tratamiento para lograr una erradicación efectiva. Estos resultados confirman los hallazgos de luminiscencia obtenidos con MycoAlert<sup>™</sup> PLUS a lo largo de las 4 semanas de estudio (Figura 4B).

#### 4.5 Efecto de tratamiento de *Mycoplasma* sp. con las concentraciones de tratamiento seleccionadas

La Figura 5 muestra el efecto de tratamiento de *Mycoplasma* sp. en la proliferación las líneas celulares tratadas en contraste con las células L929 NL y L929 N cMc, los resultados evidencian diferencias significativas entre las células libres, contaminadas y las tratadas, a pesar de que ya había sido eliminado *Mycoplasma* sp. del cultivo celular, revelando que la contaminación durante 3 semanas con *Mycoplasma* sp. fue suficiente para generar afectaciones en la proliferación de las células tratadas.

La contaminación con *Mycoplasma* sp. inicialmente evidencio resultados superiores en la mediciones de fluorescencia y conteo con DAPI de las células contaminadas L929 N cMc con respecto a la línea celular libre de contaminación L929 NL, indicando que la presencia de *Mycoplasma* sp. podría tener un efecto en la proliferación celular en el cultivo en estudio (Figura 3A-B). No obstante, se evidenció un efecto negativo en la velocidad de proliferación de la línea celular al estar contaminada, la cual decreció de  $2.0 \times 10^{-2}$  cel h<sup>-1</sup> en la medición a las 120 horas a  $1.8 \times 10^{-2}$  cel h<sup>-1</sup> en 140 horas de ensayo de proliferación, indicando preliminarmente que la presencia de *Mycoplasma* sp. generó un efecto negativo luego de 5 días de cultivo en la proliferación de la línea celular en estudio (L929 N cMc).

Adicionalmente, en la Figura 5A se muestran las curvas de proliferación de las células L929 NT tratadas con concentraciones de 25 y 37.5 µg ml<sup>-1</sup> de Plasmocin®. Estas curvas revelan velocidades de proliferación superiores en comparación con las líneas celulares no tratadas. Específicamente, se observaron tasas de proliferación de  $2.1 \times 10^{-2}$  células h<sup>-1</sup> y  $2.0 \times 10^{-2}$  células h<sup>-1</sup>, respectivamente. Además, se encontró que el recuento de células con DAPI fue similar al de las células L929 N cMc al inicio del experimento, pero a diferencia de estas últimas, no mostraron un decrecimiento en la proliferación celular después de 5 días de crecimiento.

Asimismo, se observó que las velocidades de proliferación entre las líneas celulares tratadas no presentaron diferencias significativas durante los primeros días del ensayo (72 horas). Sin embargo, a partir de las 96 horas de ensayo, se evidenciaron diferencias significativas tanto en el recuento de células con DAPI como en las unidades de fluorescencia emitidas en la reducción de resazurina. Esto indica que las células tratadas con concentraciones de 25 µg/ml y 37.5 µg/ml

de Plasmocin® mostraron velocidades de crecimiento de  $3 \times 10^{-2}$  células  $h^{-1}$  y  $2.7 \times 10^{-2}$  células  $h^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados sugieren que una mayor concentración de tratamiento puede tener un efecto en la proliferación celular.

Por otra parte, en la [Figura 5B](#) se presentan las curvas de proliferación de las células L929 NT tratadas con concentraciones de 0.2 y 0.5  $\mu g/ml$  de MRA. Se observó que las velocidades de proliferación fueron similares a las células tratadas con Plasmocin® y mostraron resultados superiores en términos de unidades de fluorescencia en comparación con las células L929 N cMc y L929 NL. Sin embargo, entre las células tratadas con MRA se evidenció una diferencia significativa a partir de las 120 horas de ensayo en las unidades de fluorescencia y en el recuento con DAPI.

En particular, se observó que el tratamiento con 0.2  $\mu g/ml$  de MRA (L929 NT 0.2 MRA) mantuvo una tendencia similar a la línea celular antes de su tratamiento (L929 N cMc). Sin embargo, posterior a las 120 horas de estudio de la proliferación, su velocidad de crecimiento disminuyó y se inició una fase de senescencia. Este comportamiento puede estar asociado a la presencia de un tratamiento o a efectos posteriores al mismo, como lo han establecido otros estudios (65). Durante el tratamiento, es posible que se produzcan efectos en la mitocondria que comprometan la inhibición o citotoxicidad celular mínima, lo que resulta en un decremento en la velocidad de proliferación en lugar de continuar con la tendencia de crecimiento exponencial observada en las células L929 NT 0.5 MRA y L929 NL(65).

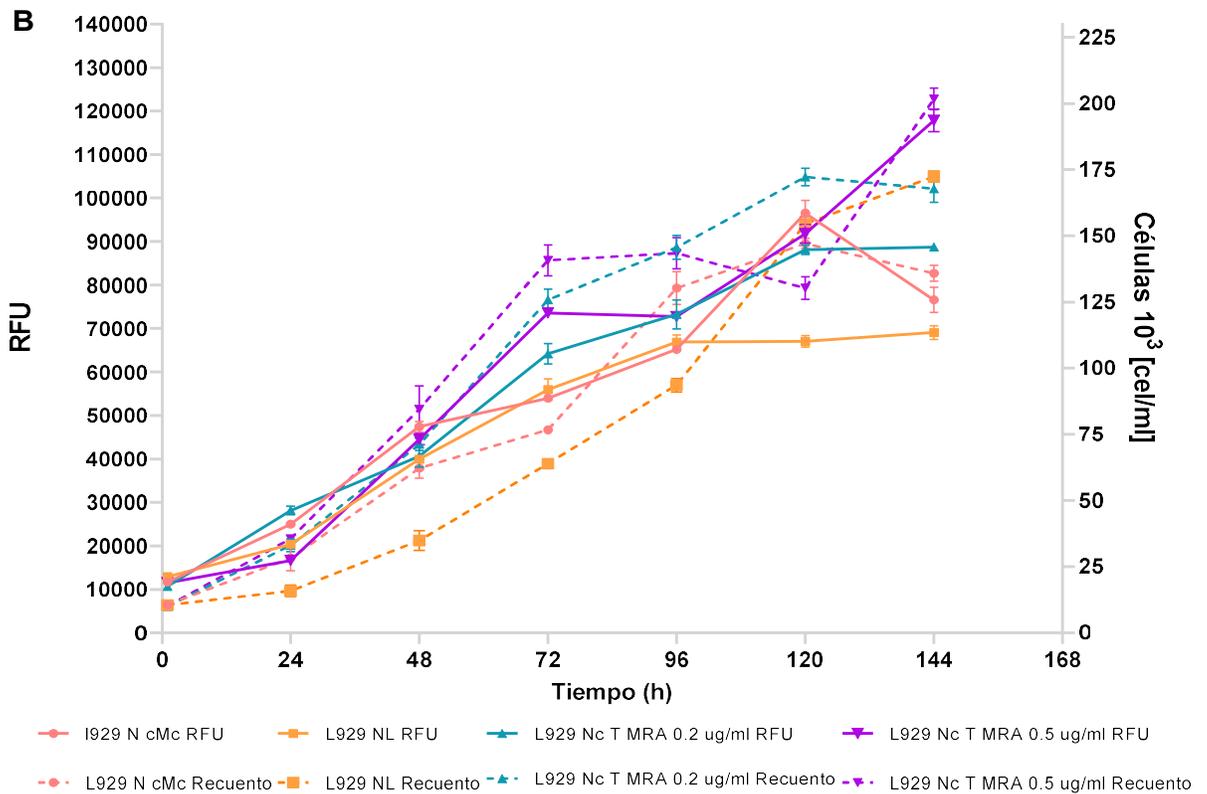
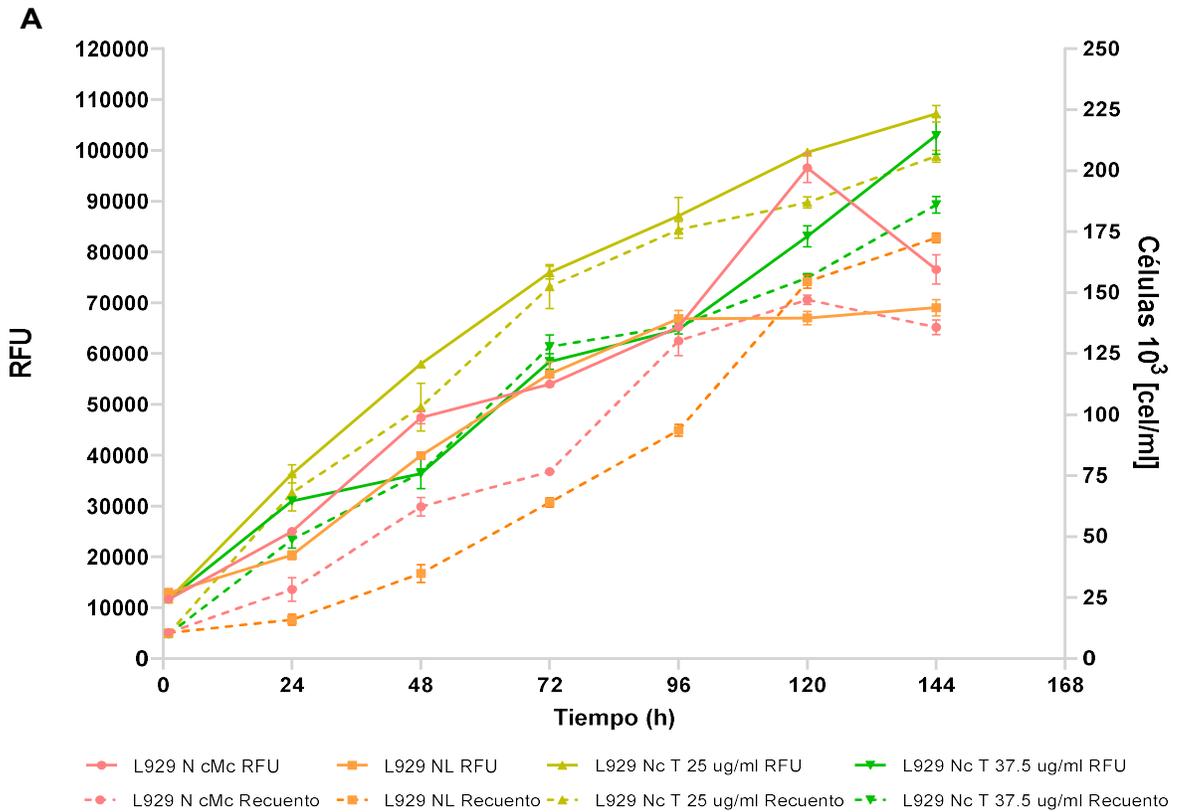


Figura 5. Efecto de Tratamiento de *Mycoplasma sp.* con diferentes concentraciones de tratamiento en la proliferación de la línea L929 Nc tratadas (L929 Nc T).

$1.0 \times 10^4$  cel/ml L929 NT – Pase 3 en cada pozo (placa de 24 pozos) A. Evaluación de la proliferación mediante la medición de la fluorescencia con resazurina y conteo de número de células posterior al tratamiento con Plasmocin® en las dos concentraciones en estudio (25  $\mu\text{g/ml}$  y 37.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células fueron enumeradas usando tinción con DAPI B. Evaluación de la proliferación mediante la medición de la fluorescencia Resazurina y conteo de número de células posterior al tratamiento con MRA (0.2  $\mu\text{g/ml}$  y 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) Las células fueron enumeradas usando tinción con DAPI.

Estos resultados sugieren que, tras un tratamiento efectivo, las células lograron recuperar una velocidad de proliferación similar a la de la línea celular libre de contaminación (L929 NL). No obstante, es importante tener en cuenta que pueden haber ocurrido cambios irreversibles en el funcionamiento de la mitocondria, debido a las altas dosis utilizadas en el tratamiento, así como la activación o inhibición de la apoptosis debido a la presencia previa de *Mycoplasma sp* (86). Estos factores podrían haber influido en algunos de los resultados obtenidos. Por lo tanto, es crucial llevar a cabo un monitoreo continuo de las células después del tratamiento y verificar si se restablecen sus características de expresión normales. Esto garantizará la ausencia de efectos residuales del tratamiento y la identificación de posibles cambios irreversibles en la expresión celular que puedan afectar los resultados futuros.

En la Figura 6 se observan la morfología de las células L929 nuevas contaminadas con *Mycoplasma sp* (L929 N cMc), libres de *Mycoplasma sp* (L929 NL) y posterior al tratamiento con las diferentes concentraciones de agente anti-micoplasma en imágenes de fluorescencia con DAPI y en campo claro, donde se puede evidenciar la diferencia en la morfología de las células L929 N cMc en la imagen de campo claro, con algunos pequeños cambios morfológicos en contraste con las células L929 NL. Adicionalmente, en la imagen de fluorescencia con DAPI, se observan algunos precipitados fluorescentes alrededor de las células, lo que implica la presencia de *Mycoplasma sp.* adherido a las células en el cultivo.

Aunque la adhesión a las células se observa levemente en la imagen de fluorescencia, este es el principal y primer paso de colonización en el cultivo, y dado que el tiempo de exposición al medio contaminado con el patógeno era solo de 3 semanas, no se observan grandes precipitados como en la Figura 2C, donde el cultivo de L929 C había sido detectado con contaminación de *Mycoplasma sp.* meses atrás. (31,35).

Adicionalmente, se observan las morfologías de las células de las células tratadas con los diferentes concentraciones y tratamientos donde se presentan leves cambios con respecto a las

células contaminadas posterior a su tratamiento, evidenciando levemente una mejoría en su morfología de elongación que puede estar relacionada con la presencia de un antibiótico de manera reiterativa por semanas. Cabe resaltar que al observar las imágenes de DAPI de las células tratadas al inicio del ensayo de proliferación, no se detectaron precipitados fluorescentes alrededor, que pudieran indicar la presencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo. Por lo tanto, se estableció de manera cualitativa que la erradicación había sido exitosa. Sin embargo, se observaron pequeños cambios en la morfología de las células, lo cual difiere de lo reportado por algunos autores que afirman que después del tratamiento se restablecen todos los mecanismos y características celulares de la línea celular antes de la contaminación (88).

No obstante, la contaminación por *Mycoplasma sp.* puede haber ocasionado cambios irreversibles en las células, especialmente en las rutas metabólicas específicas, como la vía utilizada por las células para producir NAD a partir del ácido nicotínico (Ruta alternativa Preiss-Handler) (88). Estos cambios pueden haber afectado la velocidad de crecimiento celular en las células afectadas y haber disminuido la apoptosis celular mientras *Mycoplasma sp.* estuvo presente.

Adicionalmente, otros estudios han asociado mecanismos de transmisión de genes de resistencia a través de vesículas extracelulares durante la contaminación con *Mycoplasma sp.*, lo que puede haber impactado la capacidad de las células para restablecer sus características originales. Sin embargo, Geyde *et al.*, 2015 establece que estos procesos de transmisión y adherencia, así como las características celulares se restablecen lentamente una vez lograda una erradicación efectiva de la contaminación, lo que podría suceder en un futuro si se continúa realizando el seguimiento de las células tratadas (37,86).

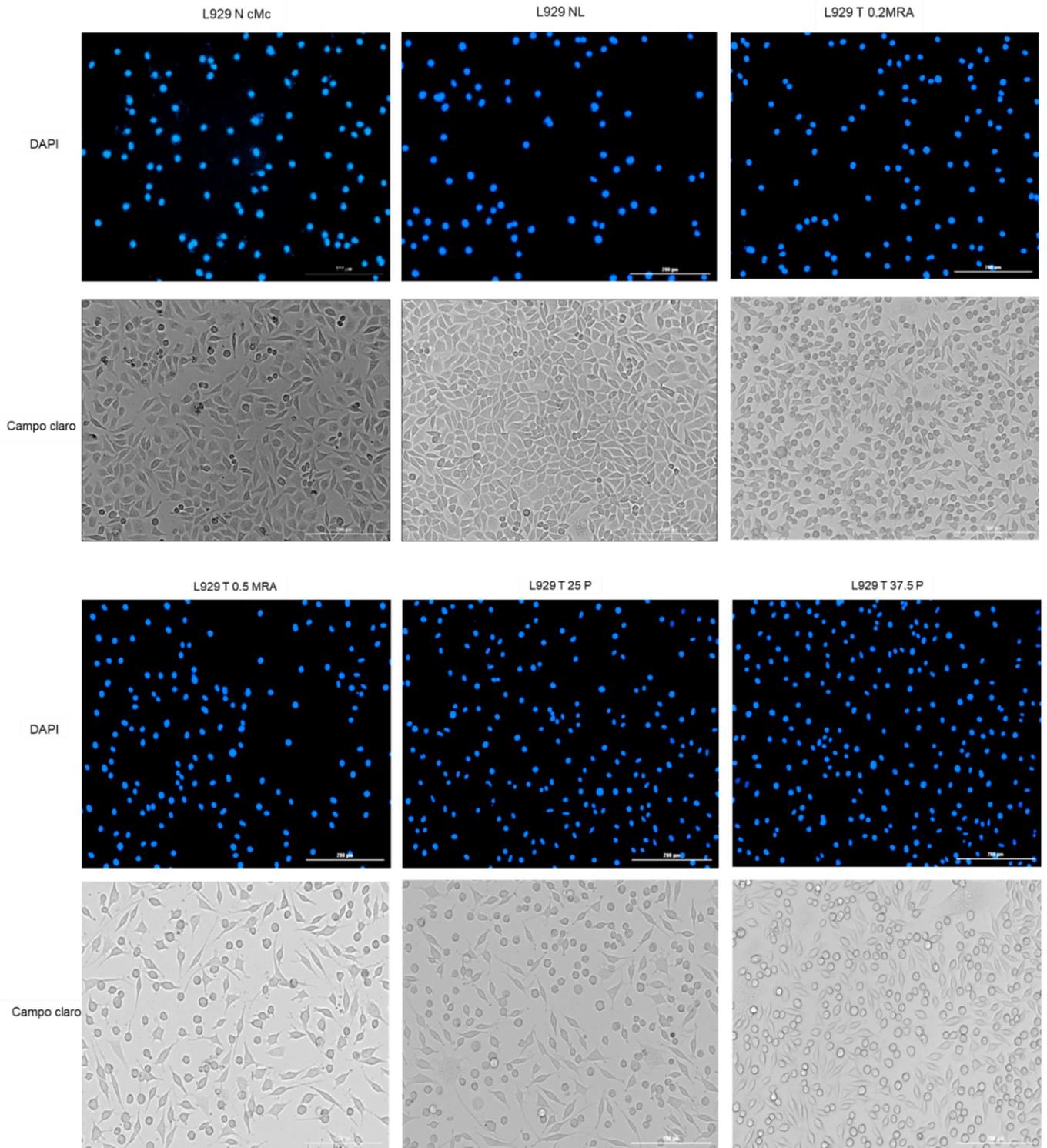


Figura 6. Imágenes microscópicas cualitativas de las células en estudio posterior a los ensayos de tratamiento con las diferentes concentraciones.

Imágenes en campo claro y con tinción con DAPI objetivo 10 X con aumento de 200 µm. L929 NL, L929N cMc, L929 N T25 µg / ml, L929 N T 37.5 µg / ml, L929 N T 0.2 µg / ml, L929 N T 0.5 µg / ml. Placa de 24 pozos.

#### **4.6 Ensayos de citotoxicidad de células contaminadas libres y tratadas, comparación del efecto del tratamiento.**

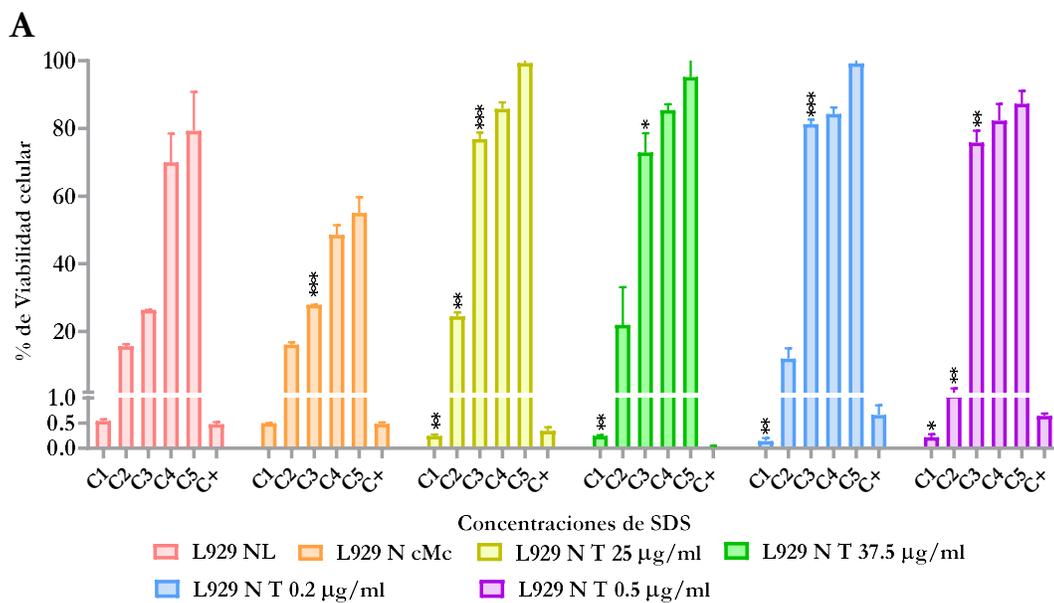
SDS es un surfactante aniónico usualmente empleado como componente en cosméticos y dentífricos debido a sus propiedades hidrofóbicas (89). Debido a su toxicidad moderada y que en altas concentraciones puede generar irritación y toxicidad dérmica, es empleado para la prueba de sensibilidad en la evaluación de citotoxicidad celular empleando ensayos de viabilidad con resazurina, rojo neutro y la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para determinar las concentraciones que generan toxicidad y muerte celular (90). Debido a esto, en este estudio se seleccionaron diferentes concentraciones de SDS (2000 y 0.0002  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) con el fin de comparar la respuesta de viabilidad celular de las células evaluadas L929 NL, L929 Nc T con las diferentes concentraciones de Plasmocin<sup>®</sup> y MRA y L929 N cMc.

En la [Figura 7A](#), se observa el porcentaje de viabilidad de las células en estudio al estar expuesta a diferentes concentraciones de SDS y una concentración control de tritón al 0.1% v/v, en esta comparación se obtuvieron resultados relevantes con respecto al efecto de la contaminación de *Mycoplasma sp.* y su tratamiento en el ensayo de sensibilidad y citotoxicidad de las células L929 contaminadas con *Mycoplasma sp.*, libres y tratadas. Las células que fueron tratadas mostraron resultados de baja citotoxicidad al emplear concentraciones entre 0.002 y 0.2  $\mu\text{g/ml}$  de SDS y no mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos entre los diferentes tratamientos y las células L929 NL.

Inicialmente, los resultados evidenciaron un efecto de citotoxicidad bajo entre 0.7 y 4.8% para las células tratadas con Plasmocin<sup>®</sup> a 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y 37.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente, indicando que el tratamiento evito un efecto citotóxico en las células al estar en contacto con las menores cantidades de SDS. De la misma manera, las células tratadas con MRA evidenciaron un efecto citotóxico reducido de 0.8 y 12.71% para las células tratadas con 0.2  $\mu\text{g/ml}$  y 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, al estar expuestas a 0.002  $\mu\text{g/ml}$  de SDS, indicando que la adición del tratamiento evitó también el efecto citotóxico esperado de más del 20% al estar en contacto con esta concentración mínima de SDS ([Figura 7 a-b](#)).

No obstante, se observaron diferencias significativas al exponer las células a concentraciones de SDS mayores a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lo que resultó en una citotoxicidad con diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los diferentes tratamientos y las células L929 NL. En todos los tratamientos, las células tratadas mostraron porcentajes de viabilidad superiores al 76%, mientras que las células libres de *Mycoplasma sp.* y con medio contaminado (L929 N cMc) alcanzaron una viabilidad máxima de solo 27% y 28%, respectivamente (Figura 7b-c). Estos resultados indican que la respuesta a la concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de SDS fue similar en las células contaminadas y libres, pero se observó una posible protección contra el efecto citotóxico del SDS después del tratamiento.

Con respecto a la concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de SDS, se observó una respuesta viabilidad diferente entre las células tratadas. Las células que fueron tratadas con Plasmocin<sup>®</sup> mostraron un respuesta ante la concentración de SDS de un porcentaje de viabilidad del 25%, mientras que las células tratadas con las diferentes concentraciones de MRA el máximo porcentaje de viabilidad fue de 12% con las células 0.2 MRA y 1.4% con 0.5 MRA, revelando la viabilidad de las células tratadas con MRA al estar expuestas a una concentración mayor a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  era afectada en mayor proporción, concordando con los resultados de proliferación obtenidos, donde a las 72 y 96 horas de tratamiento con MRA las células decrecieron parcialmente su velocidad de proliferación (Figura 5B).



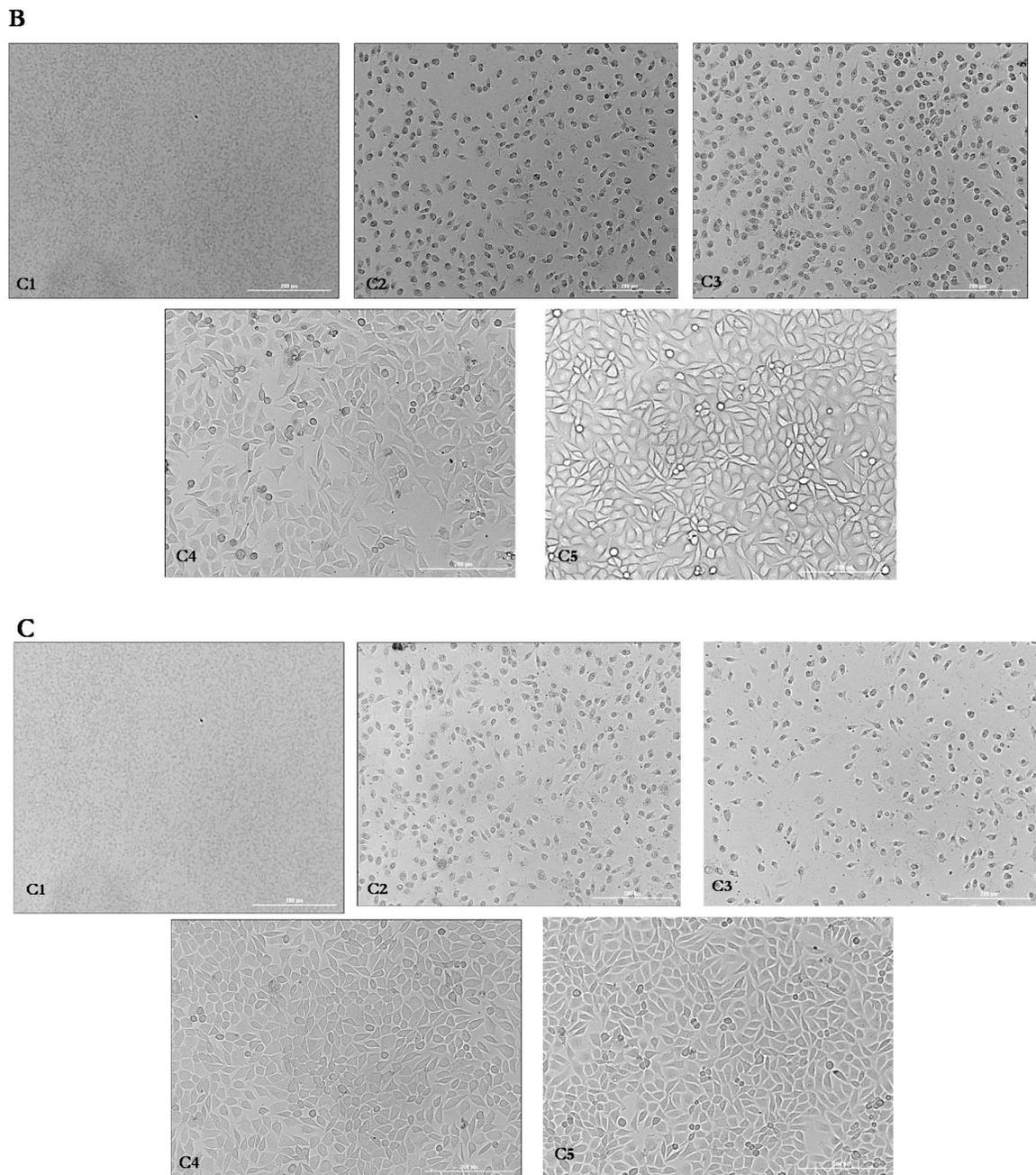


Figura 7. Evaluación del efecto del tratamiento de *Mycoplasma* sp. en la sensibilidad a la citotoxicidad con diferentes concentraciones de SDS. Comparación con la línea celular L929 Nuevas Contaminadas (L929 N cMc), L929 Nuevas libres de *Mycoplasma* sp. (L929N)

$1.0 \times 10^4$  cel/ml L929 N – Pase 3 en cada pozo (placa de 96 pozos). A. Evaluación de citotoxicidad de diferentes concentraciones de SDS en las células libres, contaminadas y tratadas (L929 NL, L929N cMc, L929 N T25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , L929 N T 37.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L929 N T 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L929 N T 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mediante la medición de la reducción de resazurina. C1 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C2 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C3 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C4 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  C5 0.0002  $\mu\text{g}/\text{ml}$  C+ Tritón 0.1%. B. Imágenes microscópicas cualitativas del efecto de las concentraciones de SDS de las células L929 NL. Imagen en campo claro Objetivo 10X-barra de escala 200  $\mu\text{m}$ . C. Imágenes microscópicas cualitativas del efecto de las concentraciones de SDS de las células L929 N cMc. Imagen en campo claro Objetivo 10X-barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

El efecto observado en las células libres de *Mycoplasma* sp. concuerda con los resultados obtenidos en el estudio realizado por Braut-Boucher *et al.*, 2017. En ese estudio, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de SDS en las células endoteliales utilizando resazurina como indicador de viabilidad celular. Se encontró que las células alcanzaban una viabilidad del 20% a una concentración de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de SDS. En el caso de las células L929, los resultados de viabilidad mostraron que la citotoxicidad aumentaba de manera significativa a concentraciones superiores a 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de SDS (90).

Este efecto citotóxico se evidencia en el estudio de Srikanth *et al.*, (2020), donde utilizaron el SDS como control positivo de citotoxicidad en las células L929 donde se encontró que la adición de SDS en concentraciones de hasta 3.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  generó un 20% de viabilidad, mientras que concentraciones mayores mostraron resultados de citotoxicidad con una viabilidad del 0% (91). Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde se observó un efecto citotóxico en las células L929 cuando se utilizó SDS en concentraciones superiores a 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Por otro lado, en el estudio realizado por Park *et al.*, (2015), se evaluó el efecto del SDS en las células NIH 3T3 y HaCaT, donde se encontró que a concentraciones de 0.075%, se observaba un efecto en la viabilidad celular de más del 50%. Este resultado concuerda con los hallazgos obtenidos en con la concentración C3, donde las células contaminadas (L929 N cMc) y las nuevas células libres de *Mycoplasma* sp. (L929 NL) fueron afectadas en más del 50% de su viabilidad con concentraciones superiores a 2  $\mu\text{g/ml}$  de SDS (89).

Los resultados de viabilidad al evaluar las concentraciones de C4 y C5 coinciden con los reportados por Babich *et al.*, (1997) en su estudio del efecto del SDS en células gingivales. En dicho estudio, no se observó un efecto citotóxico debido a las bajas concentraciones de SDS a las que fueron expuestas las células (92). Cabe resaltar que no se encontraron resultados que pudieran explicar la protección contra la citotoxicidad observada en las células tratadas la ser evaluadas con concentraciones de 2 y 0.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de SDS.

Finalmente, se puede evidenciar mínimos cambios morfológicos entre las células L929 NL (Figura 7B) y L929 N cMc (Figura 7C) luego de estar expuestas a las concentraciones 0.2  $\mu\text{g/ml}$  (C4) y 0.0002  $\mu\text{g/ml}$  (C5) observando que hay pequeños efectos del SDS y evidenciando algunas células afectadas por estar contaminadas con *Mycoplasma* sp. No obstante, se presenta una

citotoxicidad consistente con los resultados de viabilidad para las concentraciones 2000 µg/ml (C1), 20 µg/ml (C2) y 2 µg/ml (C3) en la [Figura 7A](#), lo cual demuestra que evidentemente la citotoxicidad con la concentración C1 fue radical y no se observan células supervivientes luego de estar en contacto con esta concentración.

## 5 Conclusiones

### 5.1 Conclusiones

1. Durante la comparación de métodos disponibles, se determinó que se requería el uso de dos métodos: uno tradicional y otro de alta sensibilidad, para la detección de *Mycoplasma sp.* en células L929 evaluadas (L929 C). Los métodos altamente sensibles, MycoAlert™ PLUS y PCR, demostraron una detección efectiva y corroboraron los resultados inicialmente obtenidos con la tinción de DAPI.
2. La evaluación de la erradicación de *Mycoplasma sp.* utilizando concentraciones de 25 y 37.5 µg/ml de Plasmocin® indicó su efectividad para una eliminación definitiva. Se comparó con la capacidad de erradicación de MRA, que requirió hasta 4 semanas para ser efectiva.
3. A pesar de la erradicación exitosa, la presencia de *Mycoplasma sp.* generó cambios mínimos en la velocidad de crecimiento de las células evaluadas, especialmente entre las 120 y 144 horas de estudio. Las células tratadas con MRA mostraron una disminución en la velocidad de crecimiento, mientras que aquellas tratadas con Plasmocin® lograron recuperarla.
4. En el ensayo de viabilidad celular, el tratamiento proporcionó protección adicional contra el efecto citotóxico, especialmente en bajas concentraciones de SDS. Aunque se observaron cambios leves en la morfología celular, indicando que la presencia previa de *Mycoplasma sp.* ya había afectado morfológicamente a las células.

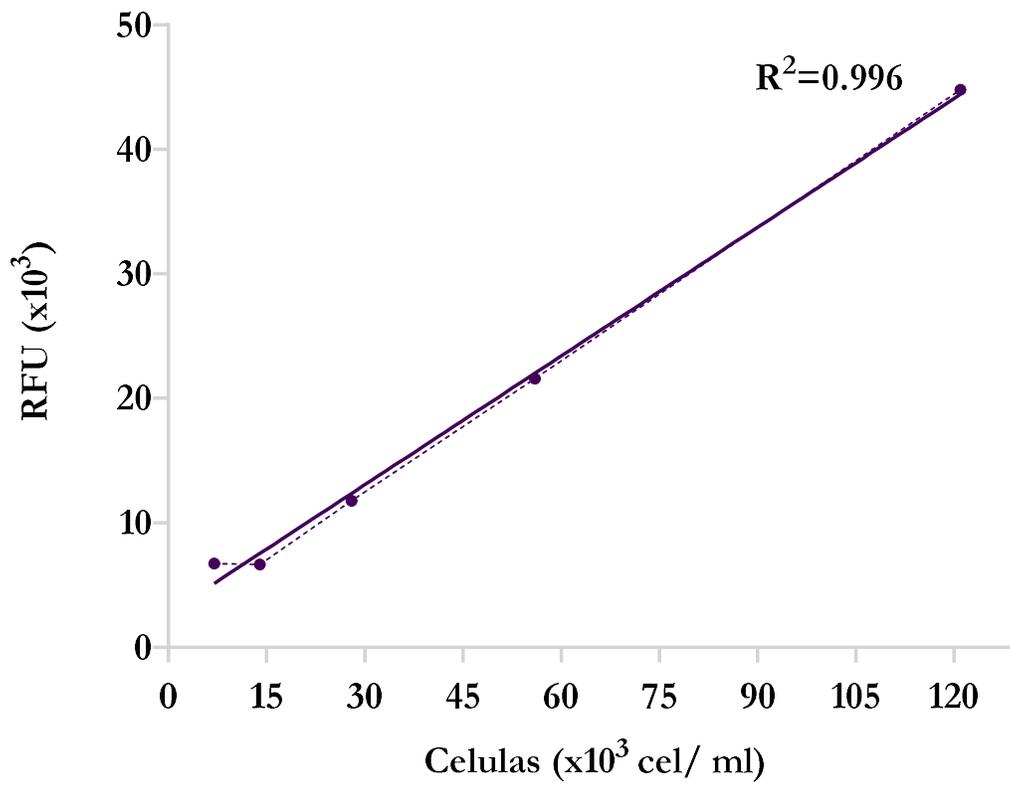
## 5.2 Recomendaciones

1. Se recomienda realizar la detección de la presencia de *Mycoplasma* sp. en las otras líneas celulares disponibles en el laboratorio, (Vero, U973, HEK 297, hMSC y CHO-s), con el fin de realizar una erradicación del patógeno en caso de estar presente y evaluar el efecto de la presencia de *Mycoplasma* sp. en sus velocidades de crecimiento.
2. Se recomienda evaluar si el tratamiento con 25 µg/ml de Plasmocin® y 0.5 µg/ml de MRA adicionado a las células L929 N libres de *Mycoplasma* sp. puede también generar una protección adicional para aumentar la viabilidad celular al estar en contacto con diferentes cantidades de SDS y comparar si estos resultados coinciden la tendencia observada en este trabajo con las células L929 tratadas.
3. Se recomienda establecer un protocolo de monitoreo de detección de *Mycoplasma* sp. constante de cada 3 meses de las células en uso con el fin de prevenir posibles contaminaciones y garantizar la validez de los resultados obtenidos en futuras investigaciones.

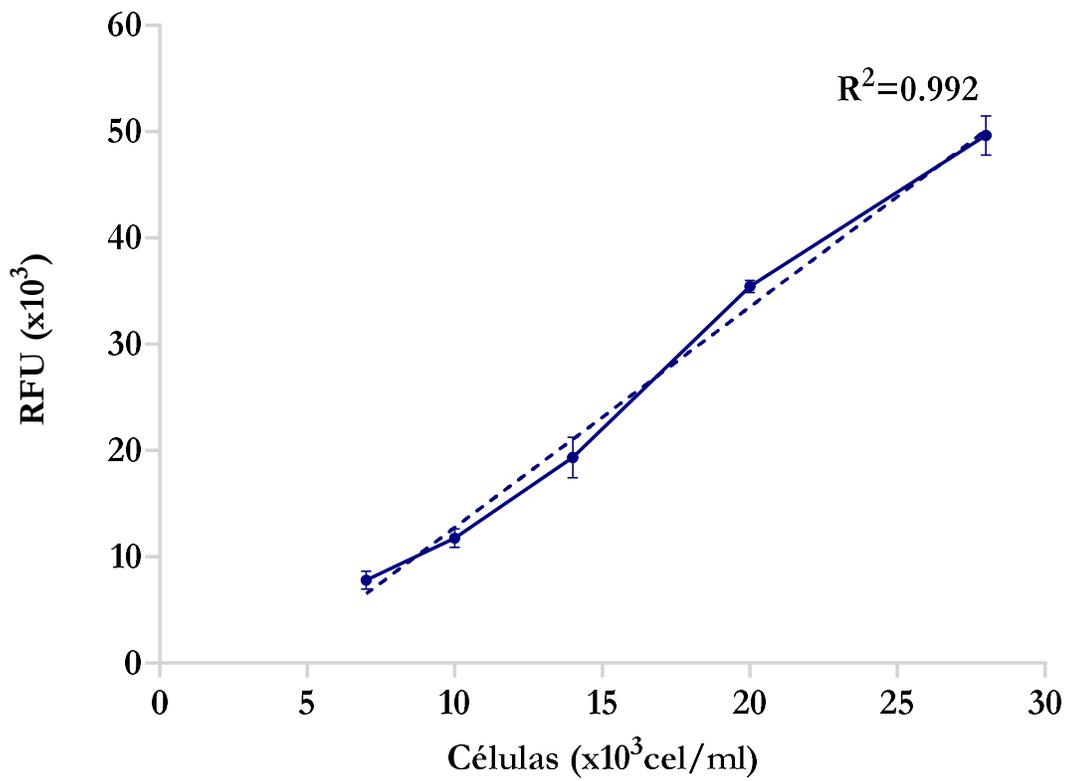
## 6 Anexos

### 6.1 Curva de calibración de resazurina y número de células

Como se describió anteriormente en el numeral 3.5.1, se realizó una curva de calibración para establecer cuantificar la cantidad de células presentes mediante la reducción de resazurina obtenida(93), para ello se emplearon las concentraciones ya descritas y se realizó la medición con las longitudes de onda de excitación y emisión de 590 y 530 nm, respectivamente . El control negativo empleado fue medio DMEM con resazurina 10% v/v, su fluorescencia fue restada de los valores obtenido en cada una de las mediciones de 100  $\mu$ l por triplicado en la placa de 96 pozos.



**Figura 8.** Curva de calibración de resazurina en una placa de 96 pozos de las células L929 C, lectura por triplicado.  $R^2=0.996$ . X= células adheridas L929 C, Y= unidades relativas de fluorescencia



**Figura 9.** Curva de calibración de resazurina en una placa de 96 pozos de las células L929 C, lectura por triplicado.  $R^2=0.996$ . X= células adheridas L929C, Y= unidades relativas de fluorescencia

## 7 Referencias

1. Li F, Vijayasankaran N, Shen A, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2(5):466–79.
2. Kaur G, Dufour JM. Cell lines. *Spermatogenesis*. 2012;2(1):1–5.
3. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq Archive. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(5):2535–42.
4. Lawrence B, Bashiri H, Dehghani H. Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms. *Biologicals* [Internet]. 2010;38(2):218–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.002>
5. Ventura CE, Ramírez G, Ph D. Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. *Acta Biol Colomb*. 2012;17(3):525–36.
6. Villamil Jiménez LC. Investigación y producción de vacunas en Colombia y el exterior. *Apuntes de una vida: Eduardo Aycardi Barrero*. *Rev la Univ La Salle*. 2017;2017(73):177.
7. Dreolini L, Cullen M, Yung E, Laird L, Webb JR, Nelson BH, et al. A Rapid and Sensitive Nucleic Acid Amplification Technique for Mycoplasma Screening of Cell Therapy Products. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2020;17(June):393–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.009>
8. Volokhov D V., Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes* [Internet]. 2011;25(2–3):69–77. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.002>

9. Huang LY, DuMontelle JL, Zolodz M, Deora A, Mozier NM, Golding B. Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3427–34.
10. Butler M. Animal cell cultures: Recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(3):283–91.
11. Li QC, Cohen K, Tougas T, Qiu F, Li J, McCaffrey J, et al. Best practices for drug substance stress and stability studies during early-stage development Part II - Conducting abbreviated long-term and accelerated stability testing on the first clinical drug substance batch to confirm and adjust the drug substance . *J Pharm Innov*. 2013;8(1):56–65.
12. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1158–70.
13. Maillot C, Sion C, De Isla N, Toye D, Olmos E. Quality by design to define critical process parameters for mesenchymal stem cell expansion. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2021;50:107765. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107765>
14. Gad SC. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook*. John Wiley. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., Hoboken; 2008. 6–12 p.
15. Li F, Shen A, Amanullah A. Cell Culture Processes in Monoclonal Antibody Production. *Pharm Sci Encycl*. 2013;1–38.
16. Sharma S V., Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010;10(4):241–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2820>
17. Ulrich AB, Pour PM. Cell Lines. In: Brenner S, Miller JH, editors. *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press; 2001. p. 310–1.
18. Shukla AA, Thömmes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol*. 2010;28(5):253–61.

19. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Sci Methods Clin Res*. 2017;(January):151–72.
20. Macdonald C. Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*. 1990;10(2):155–78.
21. Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol*. 2007;25(9):425–32.
22. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(6):1110–22.
23. O'Brien SA, Hu WS. Cell culture bioprocessing — the road taken and the path forward: Cell culture bioprocessing — the road taken and the path forward. *Curr Opin Chem Eng*. 2020;30(Figure 1):128–34.
24. Lee JS, Kildegaard HF, Lewis NE, Lee GM. Mitigating Clonal Variation in Recombinant Mammalian Cell Lines. *Trends Biotechnol*. 2019;37(9):931–42.
25. Morris C, Lee YS, Yoon S. Adventitious agent detection methods in bio-pharmaceutical applications with a focus on viruses, bacteria, and mycoplasma. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2021;71:105–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.027>
26. Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2012;84(1):147–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.023>
27. Capes-Davis A, Bairoch A, Barrett T, Burnett EC, Dirks WG, Hall EM, et al. Cell Lines as Biological Models: Practical Steps for More Reliable Research. *Chem Res Toxicol*. 2019;32(9):1733–6.
28. Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Ferreira N, Balthazar N, Monteiro AM, Borojevic R, et al. Performance of PCR-based and Bioluminescent assays for mycoplasma detection. *J Microbiol Methods*. 2015;118:31–6.

29. Jean A, Tardy F, Allatif O, Grosjean I, Blanquier B, Gerlier D. Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes. PLoS One [Internet]. 2017;12(2):1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0172358>
30. Young L, Sung J, Masters JR. Detection of mycoplasma in cell cultures. Nat Protoc. 2010;5(5):929–34.
31. Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. Biologicals. 2010;38(2):183–90.
32. Dörr T, Moynihan PJ, Mayer C. Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. Front Microbiol. 2019;10(September):4–7.
33. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Am Soc Microbiol. 1998;62(4):1094–1156.
34. Angart P, Kohnhorst C, Chiang MJ, Arden NS. Considerations for risk and control of mycoplasma in bioprocessing. Curr Opin Chem Eng [Internet]. 2018;22:161–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.09.012>
35. Rottem S, S. N, D. J. Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas. Biomed Tissue Cult. 2012;
36. Gill P, Pan J. Inhibition of cell division in L5178Y cells by arginine-degrading mycoplasmas: the role of arginine deiminase. Can J Microbiol. 1970;16(6):415–9.
37. Chernov VM, Chernova OA, Sanchez-Vega JT, Kolpakov AI, Ilinskaya ON. Mycoplasma contamination of cell cultures: Vesicular traffic in bacteria and control over infectious agents. Acta Naturae. 2014;6(22):41–51.
38. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia 2.6.7 Mycoplasmas. Eur Pharmacopoeia. 2004;5(1):1581–3.
39. Schneider EL, Stanbridge EJ. Comparison of methods for the detection of mycoplasmal contamination of cell cultures: A review. In Vitro. 1975;11(1):20–34.

40. Stanbridge E. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriol Rev.* 1971;35(2):206–27.
41. Russell W, Newman C, Williamson D. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature.* 1975;253:461–2.
42. Volokhov D V., George J, Liu SX, Ikonomi P, Anderson C, Chizhikov V. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;71(5):680–98.
43. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209–19.
44. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009;15(2):62–9.
45. Kirchhoff H, Mohan K, Schmidt R, Runge M, Brown DR, Brown MB, et al. *Mycoplasma Crocodyli* sp. nov., a new species from crocodiles. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(3):742–6.
46. Forsyth MH, Tully JG, Gorton TS, Hinckley L, Frasca S, Van Kruiningen HJ, et al. *Mycoplasma sturni* sp. nov., from the conjunctiva of a European starling (*Sturnus vulgaris*). *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46(3):716–9.
47. Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, Fortunato G, Salvatore F. Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. *Leuk Res.* 2008;32(2):323–6.
48. Pitt A. Assay for detecting Mycoplasma by measuring acetate kinase or carbamate kinase activity [Internet]. EP Patent 0879946A2. Great Britain; 2010. p. 1–48. Available from: <http://info.sipcc.net/files/patent/fulltext/EP/200605/EP2099194A1/EP2099194A1.PDF>
49. Jang H, Kim H, Kang B, Kim C, Park H. Oligonucleotide, array-based detection and

- genotyping of mollicutes (Acholeplasma, Mycoplasma, and Ureaplasma). *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19(3):265–70.
50. Uphoff CC, Drexler HG. Eradication of mycoplasma contaminations from cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol.* 2014;(SUPL.106):1–12.
  51. Duffy LB, Crabb D, Searcey K, Kempf MC. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(4 SUPPL. S1):29–33.
  52. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(4):387–99.
  53. Z. Tang Y, H. Liu Y, X. Chen J. Pleuromutilin and its Derivatives-The Lead Compounds for Novel Antibiotics. *Mini-Reviews Med Chem.* 2011;12(1):53–61.
  54. Sharma PC, Jain A, Jain S. Fluoroquinolone antibacterials: A review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2009;66(6):587–604.
  55. Sanchez S, Demain AL. Secondary metabolites [Internet]. Third Edit. Vol. 1, *Comprehensive Biotechnology.* Elsevier; 2019. 131–143 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00012-4>
  56. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. Review of Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin), Ketolids (Telithromycin) and Glycylcyclines (Tigecycline). *Med Clin North Am* [Internet]. 2011;95(4):761–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2011.03.012>
  57. Lonza. MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit. 2012;292:1–8. Available from: [www.lonza.com](http://www.lonza.com)
  58. Avantor. MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kits, Lonza [Internet]. 2023. Available from: <https://us.vwr.com/store/product/21346689/mycoalerttm-mycoplasma-detection-kits-lonza>
  59. Aldrich S. Kits LookOut® para detección de micoplasmas mediante PCR [Internet].

- 2023 [cited 2023 Jun 10]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/US/es/product/sigma/mp0035>
60. Aldrich S. Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based [Internet]. 2023 [cited 2023 Jun 10]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/US/es/product/sigma/mp0025>
61. abm. Mycoplasma PCR Detection Kit [Internet]. 2023 [cited 2023 Jun 9]. Available from: <https://www.abmgood.com/pcr-mycoplasma-detection-kit-g238.html>
62. ATCC. Universal Mycoplasma Detection Kit [Internet]. 2023 [cited 2023 Jun 8]. Available from: <https://www.atcc.org/products/30-1012k>
63. Biological Industries. EZ-PCR Mycoplasma Detection Kit. 2018;1–2. Available from: <https://www.bioind.com/worldwide/media/wysiwyg/product/mycoplasma/EZ-PCR-Mycoplasma-Test-Kit-IFU.pdf>
64. Applied Biological Materials Inc. Mycoplasma PCR Detection Kit [Internet]. Available from: [https://www.abmgood.com/document//g/2/g238\\_datasheet\\_v4-3\\_1.pdf](https://www.abmgood.com/document//g/2/g238_datasheet_v4-3_1.pdf)
65. Romorini L, Riva DA, Blüguermann C, Videla Richardson GA, Scassa ME, Sevlever GE, et al. Effect of Antibiotics against Mycoplasma sp. on Human Embryonic Stem Cells Undifferentiated Status, Pluripotency, Cell Viability and Growth. *PLoS One*. 2013;8(7):1–15.
66. Molla Kazemiha V, Azari S, Amanzadeh A, Bonakdar S, Shojaei Moghadam M, Habibi Anbouhi M, et al. Efficiency of Plasmocin™ on various mammalian cell lines infected by mollicutes in comparison with commonly used antibiotics in cell culture: A local experience. *Cytotechnology*. 2011;63(6):609–20.
67. Zachari MA, Chondrou PS, Pouliliou SE, Mitrakas AG, Abatzoglou I, Zois CE, et al. Evaluation of the alamarblue assay for adherent cell irradiation experiments. *Dose-Response*. 2014;12(2):246–58.
68. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front*. 2020;1(3):332–49.

69. International Standard. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009. p. 1–42.
70. Escobar M. L, Rivera A, Aristizábal G. FA. Comparison of resazurin and MTT methods on studies of cytotoxicity in human tumor cell lines. *Vitae*. 2010;17(1):67–74.
71. Harlin H, Gajewski TF. Diagnosis and treatment of mycoplasma-contaminated cell cultures. *Curr Protoc Cytom*. 2008;(SUPPL. 43):3–6.
72. Weiskirchen S, Schröder SK, Buhl EM, Weiskirchen R. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*. 2023;12(5).
73. Molla Kazemiha V, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R, et al. Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology*. 2014;66(5):861–73.
74. Pollack JD, Williams M V., McElhaney RN. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol*. 1997;23(4):269–354.
75. Garner C, Hubbard L, Chakraborti P. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br J Biomed Sci*. 2000;57(4):295–301.
76. Corral-Vázquez C, Aguilar-Quesada R, Catalina P, Lucena-Aguilar G, Ligeró G, Miranda B, et al. Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of cell lines in biobanking. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(2):271–80.
77. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1021–46.
78. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization, Annex 3: Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell

- banks. World Health Organ Tech Rep Ser [Internet]. 2013;(978):79–187. Available from: [http://www.who.int/biologicals/expert\\_committee/TRS\\_978\\_61st\\_report.pdf](http://www.who.int/biologicals/expert_committee/TRS_978_61st_report.pdf)
79. Degeling MH, Maguire CA, Bovenberg MSS, Tannous BA. Sensitive assay for mycoplasma detection in mammalian cell culture. *Anal Chem*. 2012;84(9):4227–32.
  80. Russell BJ, Horiuchi K, Velez JO, Goodman CH, Johnson BW. Mycoplasma detection in a historical arbovirus repository: Commercial kit comparison and implications for improved repository management. *J Virol Methods* [Internet]. 2020;276(October 2019):113769. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113769>
  81. Peterson WJ, Tachiki KH, Yamaguchi DT. Serial passage of MC3T3-E1 cells down-regulates proliferation during osteogenesis in vitro. *Cell Prolif*. 2004;37(5):325–36.
  82. Gerlic M, Horowitz J, Horowitz S. Mycoplasma fermentans inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis in the human myelomonocytic U937 cell line. *Cell Death Differ*. 2004;11(11):1204–12.
  83. Prasertsung I, Kanokpanont S, Mongkolnavin R, Wong CS, Panpranot J, Damrongsakkul S. Comparison of the behavior of fibroblast and bone marrow-derived mesenchymal stem cell on nitrogen plasma-treated gelatin films. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2013;33(7):4475–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.057>
  84. Gedye C, Cardwell T, Dimopoulos N, Tan BS, Jackson H, Svobodová S, et al. Mycoplasma Infection Alters Cancer Stem Cell Properties in Vitro. *Stem Cell Rev Reports*. 2016;12(1):156–61.
  85. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2002;38(2):79–85.
  86. Yang C, Chalasani G, Ng YH, Robbins PD. Exosomes released from mycoplasma infected tumor cells activate inhibitory B cells. *PLoS One*. 2012;7(4).
  87. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2002;38(2):86–9.

88. Shats I, Williams JG, Liu J, Makarov M V., Wu X, Lih FB, et al. Bacteria Boost Mammalian Host NAD Metabolism by Engaging the Deamidated Biosynthesis Pathway. *Cell Metab* [Internet]. 2020;31(3):564-579.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.001>
89. Park S, Kim Y, Choi B, Kim J. The effect of the cytotoxicity of sodium lauryl sulfate containing toothpaste on HaCaT and NIH-3T3 cells. *J Korean Soc Dent Hyg.* 2015;15(4):719–25.
90. Braut-Boucher F, Aubery M. Fluorescent molecular probes [Internet]. 3rd ed. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier Ltd.; 2016. 661–669 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00072-8>
91. Srikanth M, Khan W, Asmatulu R, Misak H, Yang S, Asmatulu E. In vitro Cytotoxicity Studies of Industrially Used Common Nanomaterials on L929 and 3T3 Fibroblast Cells. *J Biomed Res Environ Sci.* 2020;1(5):192–200.
92. Babich H, Babich JP. Sodium lauryl sulfate and triclosan: In vitro cytotoxicity studies with gingival cells. *Toxicol Lett.* 1997;91(3):189–96.
93. Balbaied T, Moore E. Resazurin-based assay for quantifying living cells during alkaline phosphatase (ALP) release. *Appl Sci.* 2020;10(11).