

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Detección y Tratamiento de *Mycoplasma* spp. en cultivos celulares

Camila Alejandra Merizalde Cárdenas

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Detección y Tratamiento de *Mycoplasma* spp. en cultivos celulares

Camila Alejandra Merizalde Cárdenas

Nombre del profesor, Título académico

**Patricio Rojas Silva, M.D., Ph.D.
David Valencia, BSc., MSc.**

Quito, 17 de mayo de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Camila Alejandra Merizalde Cárdenas

Código: 00323223

Cédula de identidad: 1727793133

Lugar y fecha: Quito, 17 de mayo de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Mycoplasma es un género de bacterias carentes de pared celular pertenecientes a la clase Mollicutes. Son procariotas autorreplicantes de tamaño reducido que pueden proliferar silenciosamente en cultivos celulares y reactivos de laboratorio, dificultando su detección mediante métodos estándar. El problema abordado en este proyecto fue la presencia de contaminación por *Mycoplasma* spp. en los cultivos celulares, específicamente en la línea celular HEPG2. Inicialmente los ensayos de detección estándar basados en tinción DAPI arrojaron resultados negativos, sin embargo, tras observar anomalías en el crecimiento y morfología celular pese a cambios en los protocolos de cultivo, se decidió implementar técnicas de detección molecular más sensibles, las cuales revelaron *Mycoplasma* no solo en HEPG2, sino en otras líneas, medios, reactivos y superficies del laboratorio, confirmando una extensa contaminación. A pesar de que la respuesta habitual ante la contaminación por esta bacteria implica la eliminación de la línea celular afectada, se optó por aplicar el tratamiento con el antibiótico BM-Ciclina para evitar esta pérdida. Después del tratamiento, se observó una mejora significativa en la proliferación y morfología de las células HEPG2, demostrando la efectividad de BM-Ciclina. En conclusión, los resultados ayudaron a identificar áreas de mejora en los protocolos de detección y tratamiento implementados, así como medidas preventivas para futuros experimentos dentro del laboratorio.

Palabras clave: *Mycoplasma*, cultivos celulares, contaminación, HEPG2, BM Ciclina, detección, tratamiento.

ABSTRACT

Mycoplasma is a genus of cell wall-free bacteria belonging to the class Mollicutes. They are self-replicating prokaryotes of reduced size that can silently proliferate in cell cultures and laboratory reagents, making their detection difficult through standard methods. The problem addressed in this project was the presence of *Mycoplasma* spp. contamination in cell cultures, specifically in the HEPG2 cell line. Initially, standard detection assays based on DAPI staining yielded negative results; however, after observing abnormalities in cell growth and morphology despite changes in culture protocols, it was decided to implement more sensitive molecular detection techniques, which revealed *Mycoplasma* presence not only in HEPG2 but also in other cell lines, media, reagents, and laboratory surfaces, confirming extensive contamination. Although the usual response to contamination by this bacteria involves discarding the affected cell line, it was decided to apply treatment with the antibiotic BM-Cyclin to avoid this loss. After treatment, a significant improvement in the proliferation and morphology of HEPG2 cells was observed, demonstrating the effectiveness of BM-Cyclin. In conclusion, the results helped identify areas for improvement in the implemented detection and treatment protocols, as well as preventive measures for future experiments within the laboratory.

Key words: *Mycoplasma*, cell cultures, contamination, HEPG2, BM Cyclin, detection, treatment.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos.....	14
Cultivo celular de HEPG2	14
Ensayos moleculares de detección de <i>Mycoplasma</i> en cultivos celulares.....	15
Tratamiento de cultivo de HEPG2 contaminados con <i>Mycoplasma</i>	15
Resultados	17
Discusión.....	18
Conclusiones	22
Figuras.....	23
Referencias bibliográficas.....	27
Anexos	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ensayo de detección de <i>Mycoplasma</i> por tinción DAPI.	23
Figura 2. Células HEPG2 posterior a cambios en técnicas de cultivo.....	23
Figura 3. Primer ensayo de detección de <i>Mycoplasma</i> a nivel molecular.	24
Figura 4. Ensayos de detección de <i>Mycoplasma</i> en líneas celulares, medios, reactivos y superficies del laboratorio.	24
Figura 5. Comparación de muestras de células HEPG2 antes y después de tratamiento con BM-Ciclina.....	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultado positivo para Mycoplasma en células vero de acuerdo al protocolo de detección basado en tinción DAPI.	32
---	----

INTRODUCCIÓN

El cultivo celular es un conjunto técnicas de laboratorio que implica el crecimiento *in vitro* de células en un entorno controlado. Se destaca como una herramienta esencial en una amplia gama de investigaciones, puesto que facilita el estudio del comportamiento celular tanto en condiciones normales como cuando son sometidas a sustancias de interés específico (Thermo Fisher Scientific, 2020). Dentro del cultivo celular, se trabaja con cultivos primarios y líneas celulares, estos se diferencian en que los cultivos primarios son derivados directamente de tejidos o biopsias, cuyas células conservan sus características y funciones, sin embargo, tienen una capacidad limitada de proliferación. Por otro lado, las líneas celulares son células provenientes de cultivos primarios, que se han adaptado a condiciones de laboratorio para presentar una capacidad de proliferación continua que incluso puede llegar a ser ilimitada (García, 2013). Dentro del cultivo celular se destaca el uso de diversas células como los fibroblastos, linfoblastos, macrófagos, células embrionarias de riñón, células hepáticas, entre otras. Es de particular interés la línea celular HEPG2, la cual proviene de tejido hepático humano con carcinoma hepatocelular. Estas son células que tienen alta tasa de proliferación, además de una morfología epitelial con funciones hepáticas diferenciadas (Donato, et al., 2015). Las células HEPG2 presentan ventajas distintivas frente a otras líneas de origen hepático, convirtiéndose en un modelo para evaluaciones de toxicidad farmacológica, estudios de metabolismo y desarrollo de tratamientos de enfermedades hepáticas, por lo que se destaca como una de las líneas celulares más empleada y ampliamente caracterizada en investigaciones de cultivo celular (Prieto, 2009)

Las especies de *Mycoplasma* se clasifican en respiratorias y hemotrópicas, pertenecen a la familia *Mycoplasmataceae* y a la clase Mollicutes (Hammerschlag, 2023). Son reconocidos como parte de los procariotas autorreplicantes más pequeños, con un tamaño que oscila entre

0.2 y 0.8 μm y un genoma de 0.58 a 2.2 Mb (Enciso, 2023). Estas bacterias carecen de pared celular, lo que les confiere resistencia a antibióticos beta-lactámicos como la penicilina, utilizada comúnmente en cultivos celulares (Enciso, 2023). Se caracterizan por una rápida y silenciosa proliferación en los cultivos y reactivos de uso común en laboratorios, lo que dificulta su detección mediante métodos estándar (Arfi, et al., 2021). A pesar de formar parte de la microbiota sin afectar el sistema, algunas especies pueden actuar como patógenas oportunistas, causando infecciones agudas, crónicas o fulminantes (Gómez, et al., 2021; Acosta, et al., 2011).

La mayoría de las especies de *Mycoplasma* requieren esteroides para estabilizar su membrana citoplasmática, obteniendo el colesterol de las células animales hospedadoras (Acosta, et al., 2011). Las especies se dividen generalmente en respiratorias y hemotrópicas, pero también se pueden encontrar en el sistema urogenital, la microbiota bucal y el sistema nervioso central (Gómez, et al., 2021). Las especies asociadas al sistema respiratorio más comunes son: *M. pneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. fermentans*, *M. orale* y, en casos específicos, *M. hominis*, actuando como comensales de las mucosas del tracto respiratorio (Pérez, et al., 2020; Gómez, et al., 2021). Los *Mycoplasmas* hemotrópicos, como *M. haemofelis*, *M. arginini* y *M. haemocanis*, afectan principalmente a animales no humanos, pero pueden ser transmitidos a humanos por contacto con individuos infectados (Pérez, et al., 2020). Por su parte, *M. hominis* y *M. genitalium* son las especies principales dentro de las infecciones urogenitales (Gómez, et al., 2021). Se ha observado que el 95% de los cultivos celulares contaminados están afectados por seis especies principales: *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis* y *M. hominis* (Enciso, 2023). La propagación de *Mycoplasma* puede ocurrir de forma directa a través de aerosoles, partículas y prácticas de esterilización inadecuadas, o indirectamente mediante el uso de soluciones, medios de cultivo y equipos contaminados. Además, el personal de laboratorio representa una fuente de contaminación, reflejada en que

las especies de *Mycoplasma* respiratorias son responsables de más del 50% de todas las contaminaciones detectadas (Tasker, 2020; Enciso, 2023; Biological Industries, 2016).

Existen múltiples métodos de detección de *Mycoplasma*, dentro de estos se encuentran las tinciones citoquímicas como la tinción mediante DAPI, un colorante fluorescente que tiñe el ADN. Este método ha demostrado ser efectivo debido a la ausencia de pared celular de estas bacterias (Krzysztoń, et al., 2021). No obstante, al fundamentarse en la detección de ADN no es específico para la identificación de un único tipo de bacterias, por lo que es recomendable realizar análisis como ELISA o PCR por su alta especificidad (Lai, et al., 2022). Una vez detectada la contaminación, es necesario realizar una identificación genotípica puesto que permite una caracterización precisa de la especie presente en el cultivo celular. De esta forma, se puede determinar la fuente de contaminación y establecer medidas correctivas dentro de los laboratorios (Lobo & Bugher, 2017). Por otro lado, un paso fundamental posterior a detectar este tipo de contaminación es el proceso de desinfección. Se ha determinado que la mayoría de *Mycoplasma* son sensibles a las tetraciclinas, fluoroquinolonas y algunas especies a macrólidos (Acosta, et. al., 2011). Esto ocurre porque las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S, impidiendo a los ribosomas unirse al ARN mensajero, por lo que detienen la síntesis de proteínas (Vicente & Pérez, 2010). Por otro lado, las fluoroquinolonas inhiben las enzimas topoisomerasa II y IV de las bacterias, inhibiendo su replicación (Carrillo, et. al., 2018), lo que es importante con *Mycoplasma* pues son autorreplicantes. Por último, los macrólidos se unen a la subunidad ribosomal 50S de las bacterias, inhibiendo la síntesis proteica y traslocación de los péptidos (Rodríguez, et. al., 2012).

Generalmente, cuando un individuo está infectado por *Mycoplasma* se administra doxiciclina, antibiótico perteneciente a las tetraciclinas (Molina & Pacheco, 2016). Sin embargo, cuando se trata de cultivos celulares las medidas suelen ser radicales, tanto que las líneas celulares deben descartarse para eliminar la contaminación (Biological Industries, 2016).

No obstante, experimentos recientes han presentado el tratamiento con BM-Ciclina como un tratamiento efectivo para contaminación por *Mycoplasma*. BM-Ciclina (Roche®) es una combinación de minociclina y fumarato de tiamulina. El fumarato de tiamulina es un derivado semi sintético del antibiótico pleurumutulina usado en veterinaria para tratar *Mycoplasma*. Este compuesto mejora su actividad en presencia de tetraciclinas, generando una interacción sinérgica que inhibe la síntesis proteica y la proliferación bacteriana (MedChemExpress, s.f.). BM-Ciclina es efectivo para la eliminación de *Mycoplasma* sin efectos citotóxicos marcados, cuyo proceso de curación de cultivos se basa en un tratamiento en cuarentena de 1-3 semanas dependiendo del nivel de contaminación de cultivo, con una posterior verificación de ausencia de la bacteria (MedChemExpress, s.f.; Roche, 2011).

MÉTODOS

Cultivo celular de HEPG2

El proceso general de cultivo de la línea celular HEPG2 implicó la descongelación y siembra de células en stock del laboratorio de cultivo celular en flasks T25, utilizando medio MEM (Minimal Essential Medium) (Sigma-Aldrich®), suplementado con 1% de penstrep (Gibco™), 1% de piruvato de sodio (Gibco™), 1% de glutamax (Gibco™), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco™) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco™), con incubación a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO₂. Se realizaron cambios de medio cada 48 horas, así como conteos celulares y pases al tener un 80% de confluencia celular. Estas células se destinaron inicialmente a ensayos de citotoxicidad MTT, no obstante, estos experimentos se detuvieron cuando las células presentaron morfologías irregulares, vacuolizaciones y variaciones en el crecimiento. Se investigaron los posibles factores que podían afectar el crecimiento celular. En primer lugar, se realizó un ensayo de detección de *Mycoplasma* mediante tinción DAPI, el mismo que consistió en un cultivo en placa, fijación con paraformaldehído (PFA), lavados con PBS y tinción citoquímica con DAPI para detectar DNA teñido en el citoplasma celular bajo microscopía de fluorescencia como señal de contaminación. Este ensayo se realizó tres veces con diferentes pases celulares, sin embargo, la contaminación por esta bacteria fue temporalmente descartada.

Posteriormente, se realizaron ajustes a los protocolos generales de cultivo. Se determinó que ya no se usaría glutamax para suplementar el medio de cultivo, puesto que el medio MEM contenía ya dicho compuesto. Se implementaron lavados con PBS durante los pases celulares, se modificó la concentración de piruvato de sodio y se probó la siembra sin antibióticos para reducir el estrés celular. A pesar de estas medidas, persistieron los problemas como las vacuolas celulares, la adherencia y la detención del crecimiento después del segundo o tercer pase. Ante

esta situación, se decidió realizar análisis moleculares para detectar la presencia de *Mycoplasma*.

Ensayos moleculares de detección de *Mycoplasma* en cultivos celulares

Se tomó una muestra de 300 µl de células y sobrenadante en microtubos, y se procedió a la extracción de ADN utilizando columnas de centrifugación según el protocolo del kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen. Una vez obtenido el ADN, se llevó a cabo una PCR convencional, con una concentración de reactivos por reacción que consistía en 12.5 µl de Go-taq polimerasa 2x, 1.5 µl de S-*Mycoplasma* (GTGGGGAGCAAAYAGGATTAGA) y As-*Mycoplasma* (GGCATGATGATTTGACGT CRT), respectivamente, y 7 µl de agua. Se utilizaron 2.5 µl de ADN extraído, 2.5 µl de control positivo (un fragmento de *Mycoplasma* proporcionado por el laboratorio) y 2.5 µl de control negativo (agua para PCR) para completar las reacciones. Las muestras fueron sometidas a un programa de termociclado que incluyó una denaturación inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 32 ciclos de denaturación a 94°C durante 1 minuto, annealing a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Después de aproximadamente dos horas, se preparó un gel de agarosa al 0.8%, se cargaron las muestras con Blue Juice y se corrió el gel a 100V durante 45 minutos para visualizar los resultados. Este procedimiento se repitió utilizando muestras de células y sobrenadantes de diversas líneas celulares, así como reactivos utilizados en el laboratorio y muestras de superficies.

Tratamiento de cultivo de HEPG2 contaminados con *Mycoplasma*.

Para el tratamiento del cultivo de HEPG2, se inició preparando dos medios MEM suplementado + BM Ciclina 1 y 2 (Roche). Para ello, se diluyeron los antibióticos BM-Ciclina 1 y BM-Ciclina 2, siguiendo las instrucciones del manual, en 10 ml de PBS cada uno para obtener soluciones stock. Los cálculos de concentración se realizaron de manera que la

concentración de BM-Ciclina 1 en el primer medio fuera de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la de BM-Ciclina 2 en el segundo medio fuera de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Después de filtrar los medios, se almacenaron en refrigeración. Para evaluar la eficacia del antibiótico, se descongelaron las células HEPG2 según los protocolos del laboratorio y se cultivaron en medio con BM-Ciclina 1, incubándolas durante tres días bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Luego, se cambió el medio por el que contenía BM-Ciclina 2 y se incubó durante cuatro días en las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces, controlando el crecimiento celular, y posteriormente se tomaron muestras para realizar la detección molecular de *Mycoplasma* y evaluar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

En la **Figura 1.** se puede observar los resultados de los ensayos de detección de *Mycoplasma* por tinción DAPI. Se puede apreciar que los ensayos fueron realizados en diferentes fechas y con distintos pases celulares, los cuales presentan resultado negativo para *Mycoplasma*, puesto que no presentan tinción de ADN en el citoplasma. Por otro lado, la **Figura 2.** demuestra una morfología anormal en las células HEPG2 posterior a los cambios realizados en las técnicas de cultivo, las cuales contienen vacuolas y no se encuentran adheridas al flask, incrementando la sospecha de contaminación.

De forma adicional, la **Figura 3.** presenta los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en donde se observa el control positivo marcado, el control negativo limpio y las muestras que coinciden con el control positivo, indicando la presencia de *Mycoplasma* resaltado en el amplicón de 425pb. Como se puede observar, el 100% de estas muestras presentan un resultado positivo para *Mycoplasma* spp.

Por otra parte, la **Figura 4.** muestra el resultado de los ensayos posteriores relacionados a la detección de la contaminación. En la **Figura 4A.** se aprecia la evaluación de las líneas celulares con las que se trabaja en laboratorio, además de los reactivos utilizados en cultivo celular. Asimismo, en la **Figura 4B. y 4C.** se observan los resultados de la detección realizada en las líneas celulares stock del tanque de nitrógeno, así como de las superficies del laboratorio.

Adicionalmente, la **Figura 5.** indica los resultados obtenidos posterior al tratamiento con BM Ciclina, tanto en la electroforesis como en el microscopio. En la **Figura 5A.** se observa una comparación visual de morfologías en las células HEPG2 pase 10, en donde se destaca la alta proliferación de las células post tratamiento. Sin embargo, en la **Figura 5B.** se encuentran los resultados de la electroforesis de las mismas muestras antes y después del tratamiento con BM Ciclina, las cuales siguen siendo positivas para *Mycoplasma* spp.

DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, la **Figura 1.** muestra los resultados de la aplicación del protocolo de detección de *Mycoplasma* mediante la tinción citoquímica DAPI en las células HEPG2 los cuales fueron negativos en tres ocasiones diferentes. Con el fin de corroborar la correcta interpretación de estos resultados, se realizó una comparación con los resultados de detección de *Mycoplasma* en células Vero (derivadas de epitelio de riñón de mono) teñidas con DAPI, proporcionados por Alejandra Castañeda (ver **Anexo 1**). En estas muestras positivas, se observan claramente puntos brillantes que representan el ADN de *Mycoplasma* teñido en el citoplasma de las células infectadas, lo cual contrasta con la ausencia de dichos puntos en el citoplasma de las HEPG2. Este fenómeno se debe a que la tinción DAPI tiene afinidad por el ADN de doble cadena, por lo que el colorante fluorescente no solo tiñe el ADN nuclear de las células eucariotas, sino también el ADN de bacterias como *Mycoplasma*, en caso de estar presentes en las regiones extranucleares del citoplasma celular (Medina, 2016).

Tras obtener resultados negativos para la presencia de *Mycoplasma*, se implementaron cambios en las técnicas de cultivo celular, debido a que el estrés puede interferir con el crecimiento y proliferación normal de las líneas celulares (Rada, et al., 2010). Sin embargo, la **Figura 2.** evidencia claramente que la ausencia de crecimiento observada no se debía a factores relacionados con las técnicas de cultivo empleadas, puesto que, a pesar de los cambios realizados, la morfología y la tasa de proliferación de las células no mostraron ninguna mejora significativa. Esto sugiere que los problemas de crecimiento celular encontrados tenían un origen distinto al de las condiciones de cultivo. Al comprobar que los problemas de crecimiento celular no se debían a factores relacionados con las técnicas de cultivo empleadas, se decidió llevar a cabo ensayos moleculares más sensibles para descartar de forma definitiva la presencia de *Mycoplasma* en el cultivo. En la **Figura 3.** se muestran los resultados de la implementación

del protocolo de detección molecular de *Mycoplasma* spp. en muestras de células HEPG2, así como en células utilizadas en virología. El gel de electroforesis revela la presencia de amplicones de 425 pb, correspondientes a los primers universales diseñados para detectar una región conservada de las regiones espaciadoras intergénicas del 16S. Estos cebadores tienen la capacidad de detectar todas las especies de *Mycoplasma* (Kazemiha, et al., 2009), lo cual representó una ventaja, dado que no se conocía la especie causante de la posible contaminación. La visualización de estas bandas indica una amplificación positiva y sugiere la presencia de *Mycoplasma* spp. en las muestras analizadas.

Esta inferencia coincide con los resultados plasmados en la **Figura 4.**, donde se muestra que diversas líneas celulares, medios de cultivo, reactivos y superficies de laboratorio también presentaron un resultado positivo para la presencia de *Mycoplasma*. Sin embargo, es importante destacar que el efecto provocado por una infección por esta bacteria puede variar entre líneas celulares. Mientras que en algunos casos puede causar problemas graves como una disminución drástica del crecimiento y muerte celular, en otros casos puede pasar desapercibida durante largos períodos sin alterar aparentemente el metabolismo celular (Rodríguez, et al., 1987). En la **Figura 4A.**, se evaluaron las líneas celulares RAW 264.7 y *Leishmania mexicana*, utilizadas en el laboratorio, las cuales resultaron estar infectadas por *Mycoplasma*. No obstante, al momento de realizar estos ensayos, no se observaron cambios evidentes en el comportamiento celular de estas líneas, a diferencia de lo ocurrido con las células HEPG2. Esta variación en la respuesta al patógeno se puede atribuir a que las diferentes líneas celulares poseen distintos mecanismos de respuesta y sensibilidad frente a la infección por *Mycoplasma*, lo que puede provocar alteraciones metabólicas más o menos severas dependiendo de la línea celular afectada (Rivera, et al., 2011).

Ahora bien, estos resultados positivos, no solo indicaron que la bacteria está dentro de los cultivos, sino que el protocolo de detección DAPI existente debía ser estandarizado. Este

falso negativo obtenido tres veces en los ensayo de tinción se puede deber principalmente a dos factores; una concentración inadecuada de colorante DAPI y un tiempo insuficiente entre pasos en la tinción. Se puede descartar la concentración inadecuada, puesto que en la literatura se realizan desde una concentración molar de 142.6 nM hasta 300 nM, por lo que incluso se estaría utilizando una concentración inicial mayor (570 nM) a la mínima necesitada según el protocolo general de laboratorio (Ligasová et al, 2019; Ferrucho, 2023). Sin embargo, el tiempo entre la aplicación del PFA, el agente impermeabilizante y el DAPI no fue el adecuado, puesto que este no se encontraba detallado comparado con otros protocolos de la literatura (Ferrucho, 2023; Young et al, 2010).

Dado que se confirmó la presencia de contaminación por *Mycoplasma* en el laboratorio, se implementaron medidas rigurosas de bioseguridad. En primer lugar, se incorporó el uso de filtros de 0.1 μm para filtrar todos los reactivos, incluyendo el suero fetal bovino (FBS), ya que *Mycoplasma* puede pasar a través de los filtros estándar de 0.22 μm utilizados comúnmente en la preparación de medios de cultivo, debido a su pequeño tamaño (Enciso, 2023). Es importante destacar que el FBS puede ser una fuente potencial de contaminación de *Mycoplasma* hemotrópico (Rivera, et al., 2011), por lo que, el filtrado adecuado de este reactivo es crucial para evitar la introducción de estas bacterias en los cultivos celulares. Además, se implementó el uso obligatorio de mascarillas, cofias y zapatones dentro del laboratorio, y se tomó la decisión de no trabajar con sangre dentro de este con el fin de reducir las probabilidades de contaminación. Por último, se realizó una descontaminación profunda del laboratorio y de las cabinas de bioseguridad, y se instaló una luz UV adicional para evitar la proliferación bacteriana.

Finalmente, la **Figura 5.** presenta una comparación visual y molecular de las células HEPG2 antes y después del tratamiento con BM-Ciclina. Como se puede visualizar en las **Figuras 5A. y 5B.**, el cambio en el crecimiento y proliferación celular es radical después del

tratamiento. Esto ocurre porque la composición sinérgica de minociclina y fumarato de tiamulina en este antibiótico inhibe eficazmente la síntesis de proteínas bacterianas y su proliferación (Acosta et al., 2011; MedChemExpress, s.f.). No obstante, es importante recalcar que BM-Ciclina debe ser usado como tratamiento, más no como medida preventiva, ya que su uso continuo podría provocar efectos citotóxicos adversos. Por lo tanto, solo debe incorporarse en los medios de cultivo al existir una contaminación confirmada, por lo que la implementación de protocolos de detección temprana resulta crucial para aplicar el tratamiento a tiempo y evitar la pérdida de la línea celular (Roche, 2011). Sin embargo, la **Figura 5C.** presenta resultados positivos para *Mycoplasma*, lo que parece contradecir los resultados visuales de las figuras mencionadas anteriormente. Esto pudo ocurrir debido a que la muestra de células se tomó de forma inmediata al culminar el tratamiento con BM-Ciclina. La literatura indica que, después del tratamiento, es recomendable realizar lavados con PBS y un subcultivo a un medio sin BM-Ciclina, de forma que se eliminen los restos de *Mycoplasma* (Kazemiha et al., 2009). Acorde a esta información, se infiere que el *Mycoplasma* observado en el gel de la **Figura 5C.** se trata de restos de la bacteria muertos por el antibiótico, dado que el crecimiento y proliferación celular mejoraron significativamente. Por otro lado, se recomienda realizar lavados y subcultivos en ensayos futuros de forma que se eviten estos falsos positivos dentro de los protocolos de detección molecular.

CONCLUSIONES

Acorde a lo descrito a lo largo del proyecto, se puede concluir que se cumplieron de forma parcial pero satisfactoria los objetivos planteados, al lograr validar un método de detección y tratamiento viable para *Mycoplasma* spp. en cultivos celulares, aunque se identificaron áreas de mejora para optimizar los protocolos implementados. En primer lugar, se logró validar un protocolo molecular basado en la técnica de PCR como un método altamente sensible y específico para detectar la presencia de *Mycoplasma* spp. en los cultivos celulares. Este enfoque demostró ser más confiable que la tinción citoquímica DAPI inicialmente utilizada, la cual arrojó falsos negativos, evidenciando la necesidad de pulir y estandarizar este protocolo para mejorar su eficacia en la detección temprana de contaminaciones. Además, se evaluó exitosamente el uso del antibiótico sinérgico BM-Ciclina como tratamiento para erradicar *Mycoplasma* de los cultivos celulares afectados, particularmente en la línea celular HEPG2. Tras la aplicación del tratamiento, se evidenció una mejora radical en el crecimiento y proliferación celular, demostrando la eficacia de este compuesto. No obstante, se recomienda implementar lavados y subcultivos adicionales después del tratamiento con BM-Ciclina para eliminar por completo los restos de la bacteria y evitar falsos positivos en los ensayos de detección molecular posteriores. Finalmente, se implementaron medidas correctivas y de bioseguridad en el laboratorio, que se recomienda aplicar de forma permanente al realizar cultivo celular puesto que estas acciones ayudan a prevenir futuras contaminaciones y promueven el buen manejo de cultivos celulares.

FIGURAS

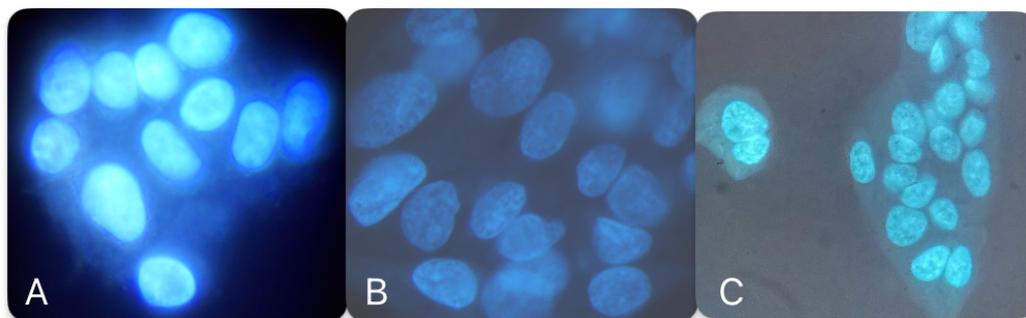


Figura 1. Ensayo de detección de *Mycoplasma* por tinción DAPI.

Descripción: La figura plasma los resultados de la aplicación del protocolo de detección basado en tinción DAPI, donde **A.** Células HEPG2 pase 12 negativas para *Mycoplasma*, julio 2023. **B.** Células HEPG2 pase 16 negativas para *Mycoplasma*, agosto 2023. **C.** Células HEPG2 pase 7 negativas para *Mycoplasma*, agosto 2023.

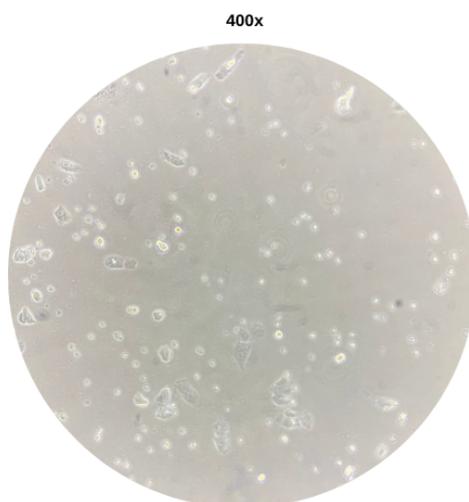


Figura 2. Células HEPG2 posterior a cambios en técnicas de cultivo.

Descripción: Se observan anomalías en la morfología de las células HEPG2 después de aplicar cambios en los protocolos y técnicas de cultivo celular. Se destaca la poca adherencia al flask y proliferación celular.

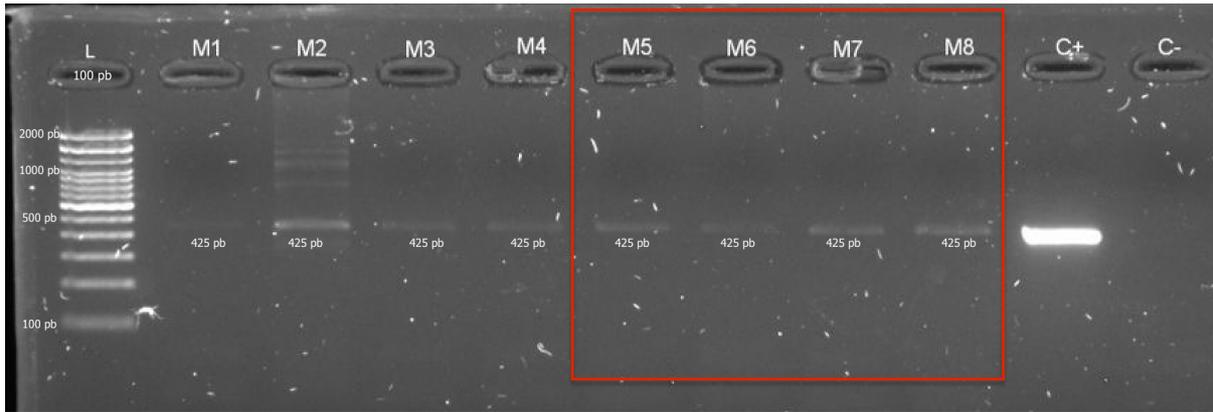


Figura 3. Primer ensayo de detección de *Mycoplasma* a nivel molecular.

Descripción: Se observan los resultados de la detección realizada en 8 muestras a través de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, con un tamaño de amplicón de 425 pb, donde: (M1-M4) células y sobrenadante de cultivo celular del laboratorio de virología; y (M5-M8), células y sobrenadante de células HEPG2.



Figura 4. Ensayos de detección de *Mycoplasma* en líneas celulares, medios, reactivos y superficies del laboratorio.

Descripción: La figura presenta los resultados de la detección molecular de *Mycoplasma* a través de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, con un tamaño de amplicón de 425 pb.

La **Figura 4A.** representa las líneas celulares, medios y reactivos de uso común en el

laboratorio, siendo: (1-8) células y reactivos para trabajo con RAW 264.7 y *Leishmania mexicana*; (9-11) células HEPG2; (12-18) reactivos para trabajo con HEPG2 (FBS, penstrep, glutamax, piruvato de sodio, MEM, aminoácidos no esenciales) y (19-21) células y reactivos para trabajo en virología. Por otro lado, la **Figura 4B.** y **4C.** plasman los resultados de las muestras de superficies de laboratorio y del stock general de células provenientes del tanque de nitrógeno, donde: (1) Tanque de nitrógeno pequeño; (2) Refrigeradora pequeña; (3) Tanque de nitrógeno grande; (4) Vitrina; (5) Centrifugadora grande; (6) Cabina de bioseguridad virología; (7) Cabina de bioseguridad cultivo celular; (8) Centrifugadora pequeña; (9) Mesón bajo el aire acondicionado; (10) Agitador; (11) Mesón II; (12) Incubadora; (13) Microscopio; (14) Incubadora; (15) CaCO₂; (16) C2C12; (17) H411; (18) 3T3-L1; (19) HT24; (20) *L. mexicana* Hermina; (21) THP1; (22) RAW 264.7; (23) HEPA 7; (24) HEP-G2; (25) 7774; (26) HUVEC; (27) HHC1.2; (28) Cabina de bioseguridad laboratorio de enseñanza y (29) Cabina de bioseguridad laboratorio de cultivo celular.

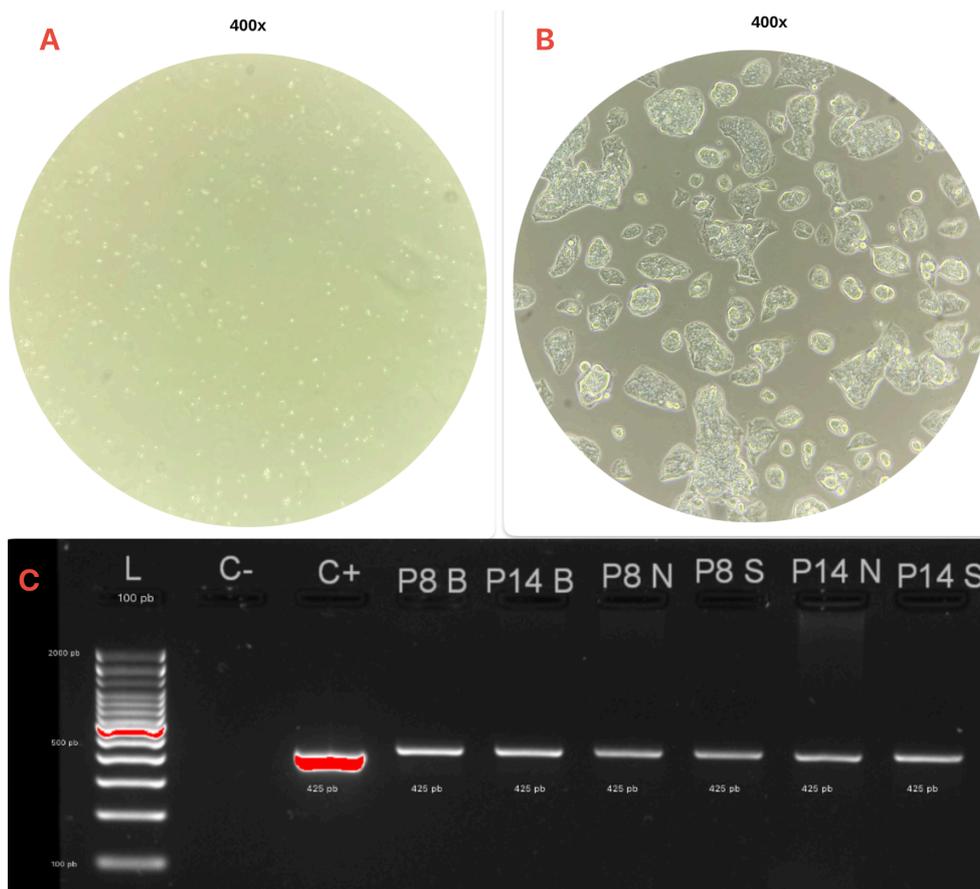


Figura 5. Comparación de muestras de células HEPG2 antes y después de tratamiento con BM-Ciclina.

Descripción: Se observan los resultados del ensayo de detección de *Mycoplasma* con muestras de células y sobrenadante antes y después del tratamiento con el antibiótico BM-Ciclina. La **Figura 5A**, muestra las células HEPG2 P10 descongeladas en diciembre del 2023, mientras que la **Figura 5B** presenta células HEPG2 del mismo pase tratadas con BM-Ciclina en marzo del 2024. Se destaca la diferencia de proliferación y adherencia de las células. Por otro lado, en la **Figura 5C** se pueden observar los resultados moleculares de células descongeladas para estandarización de tratamiento, en donde los carriles indican el pase celular, y las letras significan: *(B)* antes de tratamiento, *(N)* post-tratamiento, *(S)* sobrenadantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, B., Meseguer, M. A., Matas-Andreu, L., & Codina-Grau, G. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Mycoplasma. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 500-504. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.10.020>
- Arfi, Y., Lartigue, C., Sirand-Pugnet, P., & Blanchard, A. (2021). Beware of mycoplasma anti-immunoglobulin strategies. *Mbio*, 12(6), e01974-21. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.01974-21>
- Biological Industries. (2016, 2 septiembre). *Contaminación por Mycoplasma en cultivo celular*. weblab.immograf.com. <https://www.labclinics.com/2017/12/11/deteccion-mycoplasma/>
- Carrillo, J., Fj, F., & Rodríguez-Alcocer, A. (2018). Medicina Interna de México. *Medicina Interna de México*, 34(1). <https://doi.org/10.24245/mim.v34i1.1429>
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. En *Methods in molecular biology* (pp. 77-93). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Enciso, N. E. (2023, 2 mayo). Contaminación por Mycoplasma en Cultivos Celulares: Causas, Problemas y Soluciones.
- Ferrucho, M. (2023). Tratamiento de Mycoplasma sp. presente en líneas celulares animales [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84923>

García, J. (2013). *Introducción al cultivo de tejidos*.

<http://histologia.ugr.es/descargas/Introduccion-v-1.3.pdf>

Gómez, D. G., Sánchez, E. G., Sánchez, J. E. G., & Moro, M. G. (2021). Clinical implications of the genus *Mycoplasma*. *Revista Española de Quimioterapia*, 34(3), 169-184. <https://doi.org/10.37201/req/014.2021>

Hammerschlag, M. R. (2023, 3 agosto). Mycoplasmas. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/clamidia-y-mycoplasmas/mycoplasmas>

Kazemiha, V. M., Shokrgozar, M. A., Arabestani, M. R., Moghadam, M. S., Azari, S., Maleki, S., Amanzadeh, A., Jeddi-Tehrani, M., & Shokri, F. (2009). PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology*, 61(3), 117-124. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9252-6>

Krzysztoń-Russjan, J., Chudziak, J., Bednarek, M., & Anuszevska, E. L. (2021). Development of new PCR assay with SYBR green I for detection of *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, and *Ureaplasma* sp. in cell cultures. *Diagnostics*, 11(5), 876. <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/5/876>

Lai, M., Iacono, E., Spezia, P. G., Lottini, G., La Rocca, V., Quaranta, P., Pistello, M. & Freer, G. (2022). A low-cost simple test for weekly detection of *Mycoplasma hyorhinis* and *arginini* contaminations in cell cultures and viral preparations. *Journal of Virological Methods*, 299, 114327. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093421002664?casa_token=

M2IHOcN8azYAAAAA:FgcmNXUVpyvbtusuNYbrbLkH99nGYs7YJiBlxgmeXvPJ
owdTnAtktsMIcDyKwWhuaj2u0ibTXQ

Ligasová, A., Vydřalová, M., Buriánová, R., Brůčková, L., Večeřová, R., Janošťáková, A., & Koberna, K. (2019). A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy. *Cells*, 8(12), 1510.

<https://doi.org/10.3390/cells8121510>

Lobo, E. & Bugher, Y. (2017). Detección, Identificación y genotipificación de micoplasmas en procesos respiratorios. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*.

<https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/464/454>

MedChemExpress. (s. f.). *BM Cyclin*. <https://www.medchemexpress.com/inhibitor-kit/bm-cyclin.html>

Medina, A. S. (2023, noviembre 14). *Ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos para la detección de micoplasma*. On Science. <https://onscience.es/comparar-metodos-deteccion-micoplasma/>

Molina, V. M., & Pacheco, C. (2016, 10 septiembre). *Manejo terapéutico de lipidosis hepática felina por Mycoplasma haemofelis*.

<https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/3965>

Pérez, A., Lobo-Rivero, E., Ramón-Martínez, A., Arias, M. B., & Espinosa-Castaño, I. (2020). Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares. *Revista de Salud Animal*, 42(1).

<http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v42n1/2224-4700-rsa-42-01-e09.pdf>

Prieto, O. (2008). PERFIL DE SENSIBILIDAD DE HEP-G2 COMO MODELO PARA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE XENOBIÓTICOS

BIOACTIVADOS VIA CYP. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815392006.pdf>

Rada, A., Merentes, E., Rodríguez, M., Anselmi, G., & Strauss, M. (2010). Respuesta celular de línea de hepatoma humano (HepG2) al estrés hipotérmico con recuperación: Inducción de la expresión de Hsp60, Hsp70, y Hsf1. *Investigación Clínica*, 51(4), 479-488. [https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332010000400005&script=sci_arttext)

[51332010000400005&script=sci_arttext](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332010000400005&script=sci_arttext)

Rivera-Tapia, J. A., Castillo-Viveros, L. V., & Sánchez-Hernández, J. A. (2020). Detección de micoplasmas en cultivos celulares. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doi.org/10.32997/rcb-2010-3087>

Roche. (2011). BM Cyclin. <https://www.researchgate.net/profile/Manuele-Martinelli/post/Eliminate-mycoplasma-contamination-in-cell-culture/attachment/5cbf0146cfe4a7df4aeaebca/AS%3A750823055319040%401556021574367/download/10799050001bul.pdf>

Rodríguez, B., Otero, A., Alfonso, J., & Rodríguez, A. (1987). Micoplasmas y cultivos celulares. *Interferón y Biotecnología*, 4(2), 95-107. <https://biblat.unam.mx/es/revista/interferon-y-biotecnologia/articulo/micoplasmas-y-cultivos-celulares>

Rodriguez, C., & Obrador, G. (2012). *Antibióticos macrólidos y lincosamidas*. McGraw Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1510&ionid=98008950>

Sigma Aldrich. (s.f.) Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/tech-docs/paper/815940>

Tasker, S. (2020). Hemotropic mycoplasma. *Clinical Small Animal Internal Medicine*, 927-930. [Hemotropic Mycoplasma - Clinical Small Animal Internal Medicine - Wiley Online Library](#)

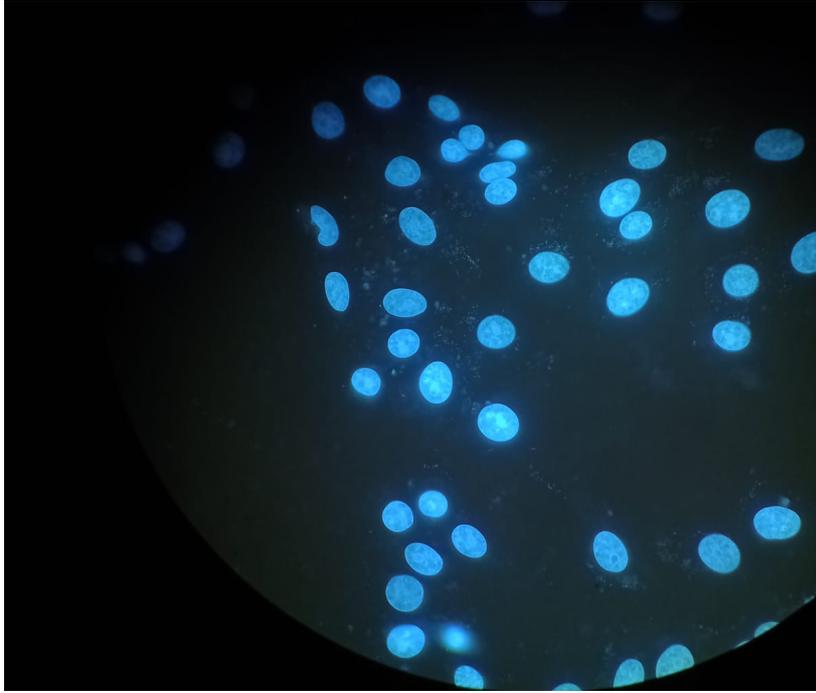
Thermo Fisher Scientific. (2020). *CELL CULTURE BASICS HANDBOOK Master basic cell culture techniques and achieve consistent results.*

Vicente, L., & Pérez, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122-130.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>

Young, L., Sung, J., Stacey, G., & Masters, J. R. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature protocols*, 5(5), 929-934. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43>

ANEXOS

Anexo 1. Resultado positivo para *Mycoplasma* en células vero de acuerdo al protocolo de detección basado en tinción DAPI.



Fuente: Alejandra Castañeda