

ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA CAUSADA POR *Mycoplasma pulmonis* EN RATONES DE LA CEPA N:NIH (S)-Fox1nu TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549

**Milocco S, Carriquiriborde M, Laborde J, Ayala M,
Cagliada M, Carbone C**

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Entre las cepas de ratones inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la N:NIH (S)-Fox1nu. Se utiliza fundamentalmente como modelo animal para el trasplante de tumores humanos. Estos ratones se producen bajo estrictas barreras sanitarias y deben estar libres de sus patógenos específicos; uno de los más frecuentes es *Mycoplasma pulmonis* que afecta el aparato respiratorio, genital, oído medio y articulaciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que causa *Mycoplasma pulmonis* en ratones N:NIH (S)-Fox1nu transplantados con la línea tumoral humana A549. Cuarenta ratones hembra N:NIH (S)-Fox1nu de 4 a 6 semanas se dividieron en cuatro grupos (G) de 10 animales cada uno: G1, transplantados con la línea tumoral A549; G2, inoculados con *Mycoplasma pulmonis*; G3, transplantados con la línea tumoral e inoculados con *Mycoplasma pulmonis* y G4 control. Siete de los 10 animales del G1 presentaron crecimiento tumoral, los ratones de los G2 y G3 murieron durante los 6 primeros días p.i, la necropsia mostró lesiones en pulmón, el G4 no presentó lesiones. Se concluyó que las infecciones por *Mycoplasma pulmonis* son fatales en ratones N:NIH (S)-Fox1nu, interfiriendo en los resultados, debiendo estar ausente de estas colonias.

Palabras claves: ratones nude, *Mycoplasma pulmonis*, línea tumoral

STUDY OF THE INTERFERENCE CAUSED BY *Mycoplasma pulmonis* IN IMMUNODEFICIENT N:NIH (S)-Fox1nu MICE TRANSPLANTED WITH THE HUMAN TUMOR LINE A549

ABSTRACT: N:NIH (S)-Fox1nu is one of the immunodeficient mice strains available in Argentina. It is mainly used for human tumors transplantation. These mice must be kept under strict barrier systems and should be free of specific pathogens infections. One of the frequent contaminations is caused by *Mycoplasma pulmonis*, it affects the respiratory and genital tract and produces otitis and arthritis. The objective of this study was to evaluate the interference produced by *Mycoplasma pulmonis* in N:NIH (S)-Fox1nu mice transplanted with the human tumor line A549. Forty female N:NIH (S)-Fox1nu mice 4-6 weeks old were divided into four groups (G) each of 10 animals. G1 transplanted with the tumor line A549; G2 inoculated with *Mycoplasma pulmonis*, G3 transplanted with the tumor line and inoculated with *Mycoplasma pulmonis* and G4 control. Seven mice from G1 showed tumor growth, mice from G2 and G3 died within the six days after the infection and there were found lung lesions during the necropsy, in G4 no lesions were observed. It was concluded that *Mycoplasma pulmonis* should be considered a fatal infection in nude mice. This microorganism produces interferences in the results, consequently it must be absent in these colonies.

Key words: Nude mice, *Mycoplasma pulmonis*, tumor cell line

Fecha de recepción: 15/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

Dirección para correspondencia: S. Miloco, Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: @fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCION

Actualmente, se dispone de una variada cantidad de cepas de ratones que se utilizan para distintos fines experimentales, las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo con su condición inmunológica: inmunocompetentes e inmunocomprometidas. Los ratones pertenecientes a esta última categoría son muy importantes ya que se emplean en estudios oncológicos, por no rechazar los trasplantes de tumores de otras especies, especialmente los humanos (1). Entre las cepas inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la N:NIH (S)-*Fox1nu*, a partir de ahora *nude*, que se produce en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP) y que se utiliza como modelo animal para el trasplante de tumores humanos (2). Estos ratones, por sus características, se mantienen bajo estrictas barreras sanitarias para evitar que se infecten con microorganismos específicos (3).

La calidad de los animales que se destinan a la investigación científica debe estar definida desde el punto de vista microbiológico. Esto se rige por normativas internacionales (4) mediante un listado de microorganismos que deben estar ausentes de las colonias de ratas y ratones (5), especialmente en los inmunocomprometidos. Entre los patógenos que infectan más frecuentemente a estas especies están los que afectan el aparato respiratorio. El agente etiológico que causa más inconvenientes de este tipo a nivel mundial es *Mycoplasma pulmonis* el cual produce pérdidas millonarias tanto en la industria farmacéutica como en los centros de investigación.

Mycoplasma pulmonis es una bacteria Gram negativa, pleomórfica, de 200 a 300 nm de diámetro y carece de pared celular. Crece en medios de cultivo enriquecidos y es muy sensible al calor, la desecación, a desinfectantes y no sobrevive fuera del organismo vivo (6, 7). No afecta al hombre ni a otros roedores, las únicas especies susceptibles son la rata y el ratón, en estos animales no sólo afecta el tracto respiratorio sino que suele infectar el aparato genital femenino produciendo reabsorción embrionaria, puede también ser causa de artritis y otitis media. La vía de contagio es por aerosoles y si la vagina de la hembra está colonizada por esta bacteria, los animales se infectan al nacer. Cuando el microorganismo ingresa por las vías aéreas se adosa a las células epiteliales del tracto respiratorio fijándose a la membrana celular. En estos casos los animales menores de tres meses no presentan síntomas debido a que la carga bacteriana en esta vía de contagio es pobre y por esta razón los signos clínicos de la enfermedad tardan en aparecer. En ratones la enfermedad tiende a ser más severa que en ratas, causa neumonía aguda

y si el animal sobrevive desarrolla bronconeumonía crónica (8, 9).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que provoca una infección con *M. pulmonis* en ratones inmunocomprometidos o inmunodeficientes de la cepa *nude* trasplantados con la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

El presente trabajo fue realizado respetando las normativas internacionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (10, 11).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 40 ratones hembras de la cepa N:NIH (S)-*nu*, libres de patógenos específicos (SPF) de 4 a 6 semanas de edad producidos bajo estrictas barreras sanitarias en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P.

Durante la experiencia los animales se alojaron en microaisladores con lecho de viruta estéril en una cabina ventilada y filtración absoluta de aire a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air), en condiciones ambientales controladas: temperatura 23+/-1°C, humedad 50-55%, iluminación 12 h luz/ 12 h oscuridad; se les suministró alimento balanceado (Cargil) y agua autoclavados, *ad libitum*. Los cambios de lecho se realizaron dos veces por semana (12).

Células Tumorales

La línea celular A549 se mantiene desde hace dos años en nuestro laboratorio a través de trasplantes subcutáneos sucesivos en ratones hembras homocigotas de la cepa N:NIH (S)-*nu*, de donde se obtuvieron las células para realizar la experiencia.

Trasplante tumoral

Las células tumorales se transplantaron por vía subcutánea, según el protocolo del diseño experimental, en los ratones anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), realizando una incisión en la piel laxa del cuello con un trócar.

Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Mycoplasma pulmonis* perteneciente al cepario de la Cátedra de Animales de Laboratorio de FCV-UNLP, una suspensión de esta bacteria se sembró en caldo PPLO (Lab. Britania, Los Patos, Argentina), se incubó a 37 °C durante 7 días, se realizó el recuento de bacterias repicando 0,1 ml en placas de agar PPLO (Lab. Britania, Los Patos, Argentina) incubándolas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura con el agregado de un 5 % de CO₂ (6, 7, 13), se contaron las colonias por placas y se determinó una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml, luego se fraccionó en cada tubo de centrifuga 1 ml de la suspensión del caldo PPLO, se centrifugó

a 10000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para realizar las inoculaciones por vía intranasal.

Diseño experimental

Los ratones se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno.

Grupo 1: ratones con trasplante tumoral únicamente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 9 x 12 mm los ratones se sacrificaron y se les extrajo el tumor para realizar los estudios histopatológicos correspondientes.

Grupo 2: ratones inoculados con una suspensión de *M. pulmonis* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL por vía intranasal

Grupo 3: animales con trasplante de tumor e inoculados con *M. pulmonis* con una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml por vía intranasal.

Grupo 4: grupo control inoculados con solución fisiológica. Estos animales se sacrificaron a los 10 días PI y se les realizó la necropsia.

Todos los animales se sacrificaron con una mezcla de CO₂/O₂ (14).

Todos estos procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones para el uso de ratones en investigaciones científicas sobre el cáncer del Canadian Council on Animal Care (CCAC) (10).

RESULTADOS

Siete de los 10 animales del grupo 1 presentaron crecimiento tumoral a los 9 días post-inoculación.

Todos los ratones de los grupos 2 y 3 murieron dentro de los primeros 6 días post-inoculación, no habiéndose podido confirmar el crecimiento tumoral. Al realizarles la necropsia se observaron lesiones pulmonares macroscópicas.

Los ratones del grupo control no presentaron ninguna lesión.

DISCUSIÓN

Todos los animales inoculados con *M. pulmonis* murieron dentro de los 6 días P.I, por lo tanto las infecciones con este microorganismo se pueden considerar fatales, no habiéndose observado diferencias en las respuestas entre los animales con o sin tumor. Se concluyó que *M. pulmonis* es un microorganismo que interfiere en las pruebas produciendo una enfermedad aguda que desemboca en la muerte de los ratones de las cepas inmunodeficientes por lo cual en las investigaciones en las que se los utilizan como modelo, este microorganismo debe estar ausente de la colonia.

BIBLIOGRAFIA

1. Dooley, TP, Stamp-Cole, M. and Ouding, R. Evaluation of a *Nude* Mouse Tumor Model Using β -Galactosidase-expressing Melanoma Cells. *Lab Anim Sci.* Vol. 1993, 43 (1): 48-57.
2. Martín Carriquiriborde, Silvana N. Milocco, Guido Principi, Pilar Cagliada, Cecilia Carbone. *Pasteurella pneumotropica* causa la regresión de tumores humanos trasplantados en ratones inmunodeficientes. *Revista Medicina (Buenos Aires)*. 2006, 66: 242-244.
3. Flynn RJ, Brennan PC, Fritz TE. Pathogen Status of commercially produced laboratory mice. *Lab. Anim. Care.* 1965, 15: 440-448.
4. Kraft V, Deeny AA, Blanchet HM, Boot R, Hannsen AK, Hem A, von Herck H, Kunstyr I, Milite G, et al. Report of the FELASA Working Group on Animal Health: Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. *Laboratory Animals.* 1994, 28 (1): 1-12.
5. Won YS, Jeong ES, Park HJ, et al. Microbiological contamination of laboratory mice and rats in Korea from 1999 to 2003. *Exp Anim.* 2006, Jan;55(1):11-6.
6. Axel Fornerup Hansen. *Handbook of Laboratory Animal Bacteriology*, CRC Press LLC. 2000.
7. Williams & Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA. 1984.
8. Fonseca-Aten M, Rios AM, Mejias A, Chavez-Bueno S, Katz K, Gomez AM, McCracken GH Jr, Hardy RD. *Mycoplasma pneumoniae* induces host-dependent pulmonary inflammation and airway obstruction in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005, 32(3):201-210.
9. Weisbroth S.H., Beker H.J. Lindsey, R.J. 1979. *Bacterial and micotic diseases. The Laboratory Rat. Vol I.* New York. Academic Press.
10. Canadian Council on Animal Care "Guide to the care and use of experimental animals". CCPA, Manual Vol. 1. (2nda edición) 1998: Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996
11. Hume CW. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals.* UFAW. 5^{ta} Edición. UFAW. Great Britain by T. & A. Constable Ltd., Edinburgh. 1976, 16: 172-192.
13. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals.* NIH publication USA. 1986.
14. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) "Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals", Columbia Inn, Columbia, MD, 1990.