

INFLUENCIA DE CONTAMINACIONES CAUSADAS POR MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS EN RATONES DE LA CEPA BALB/C.FOX1^{NU} TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549

Ayala M, Cagliada P, Milocco S, Carriquiriborde M, Laborde J, Gentil F, Resasco A, Maschi F, Principi G, Carbone C.

Laboratorio de Animales de Experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Entre las cepas de ratones inmunodeficientes se encuentra la BALB/c.Fox1^{nu} la cual se utiliza 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; entre ellos, los oportunistas más frecuentes son *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter spp.* El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que causan los agentes patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp.* en ratones BALB/c.Fox1^{nu} trasplantados con la línea tumoral humana A549. Cien ratones hembras BALB/c.Fox1^{nu} de 4 a 6 semanas se dividieron en diez grupos (G) de 10 animales cada uno: G1, trasplantados con la línea tumoral A549; G2 inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*; G3, inoculados con *K. oxytoca*; G4, inoculados con *P. mirabilis*; G5, inoculados con *Citrobacter spp.*, G6 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*, G7 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Klebsiella oxytoca*, G8 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Proteus mirabilis*, G9 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Citrobacter spp.* y G10 control. Siete de los 10 animales del G1 presentaron crecimiento tumoral, los ratones de los G2 al G 5 no mostraron signos clínicos; los de G6 al G9 no mostraron signología clínica y el desarrollo tumoral se comportó como en los 7 ratones del grupo el G1. Se concluyó que las infecciones por estos patógenos oportunistas no son fatales en ratones BALB/c.Fox1^{nu} y no interfieren en el desarrollo del tumor.

Palabras claves: Contaminaciones, causadas, línea, tumoral, ratones.

INFLUENCE CONTAMINATION CAUSED BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN BALB/C.FOX1^{NU} MICE TRANSPLANTED WITH THE HUMAN TUMOR LINE A549

ABSTRACT Among immunodeficient mouse strains there is the BALB/c.Fox1^{nu} which is used as animal model for transplantation of human tumors. These mice are produced under strict sanitary barriers and should be free of their specific pathogens, among them, the most frequent opportunistic are *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Citrobacter spp.* The aim of this study was to evaluate the interference caused by opportunistic pathogens *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* and *Citrobacter spp.* BALB/c.Fox1^{nu} hundred female mice of 4 to 6 weeks were divided into ten groups (G) of 10 animals each: G1, transplanted with tumor cell line A549, G2 inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*, G3 inoculated with *K. oxytoca*; G4 inoculated with *P. mirabilis*, G5, inoculated with *Citrobacter spp.*, G6 tumor line transplanted and inoculated with *P. aeruginosa*, G7 transplanted tumor line and inoculated with *K. oxytoca*, G8 transplanted tumor line and inoculated with *P. mirabilis*, G9 transplanted tumor line and inoculated with *Citrobacter spp.* and G10 control. Seven of the 10 animals showed tumor growth in G1, G2 and G 5mice showed no clinical signs, animals from G6 to G9 showed no clinical symptoms and behaved as tumor growth in the 7 mice of G1. It was concluded that these infections are not fatal opportunistic pathogens in mice BALB/c.Fox1^{nu} and do not interfere with tumor development.

Key words: contamination, caused, line, tumor, mice.

Fecha de recepción: 12/08/13

Fecha de aprobación: 10/10/13

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

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

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de modelos animales destinados a investigaciones científicas continúa siendo un tema de vanguardia en las ciencias biomédicas. El ratón es el modelo más utilizado debido a sus características biológicas, al conocimiento de su genoma, y a las posibilidades que brinda esta especie cuando se modifican genéticamente o se reproducen en forma dirigida.

Entre las cepas que se utilizan para diferentes estudios experimentales se encuentran las inmunodeficientes (1). Los ratones pertenecientes a esta categoría son muy importantes ya que se emplean en estudios oncológicos, enfermedades autoinmunes y en aquellas que provocan deficiencias en el sistema inmunitario. Estos individuos constituyen un modelo animal valioso para el trasplante y mantenimiento de tumores de otras especies incluyendo los humanos.¹ Entre las cepas de ratones inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la BALB/c.Fox1^{nu}, 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) donde se los utiliza como modelo animal (2). Estos ratones, por sus características, se deben mantener bajo estrictas barreras sanitarias para evitar que se infecten con microorganismos específicos (3).

Debido a su condición de inmunodeficientes, es importante no solo el control de los microorganismos patógenos que deben estar ausentes en las colonias de ratones inmunocompetentes, sino también de aquellos que se consideran oportunistas, los que en estos animales pueden provocar infecciones graves capaces de diezmar las colonias (4, 5). Entre los patógenos oportunistas que infectan más frecuentemente a esta especie se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter spp*. Estos causan inconvenientes a nivel mundial y producen pérdidas importantes tanto en la industria farmacéutica como en los centros de investigación.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa que forma parte de la flora normal del ratón (6, 7), tiene motilidad unipolar, es aeróbica, es capaz de crecer a 42 °C y no son exigentes ya que desarrollan fácilmente en los medios de cultivos comunes. Esta bacteria es un patógeno oportu-

nista en individuos inmunocomprometidos. La vía de contagio se produce a través de aerosoles, agua de bebida y fomites contaminados. Infecta el pulmón, oído medio y externo, coloniza el tracto urinario y heridas.

Klebsiella oxytoca es una bacilo Gram negativo, de doble membrana e indol positivo. Se encuentra colonizando el colon, la nasofaringe y la piel. Produce neumonía en animales inmunodeficientes, pudiendo además provocar septicemia en casos graves.

Proteus mirabilis es una bacteria Gram negativa, móvil, produce aglutinación y un olor característico. Causa infecciones urinarias, contamina heridas, provoca septicemia y neumonía.

Citrobacter spp es un bacilo aerobio Gram negativo que se encuentra en el agua, suelo, alimentos y como flora saprófita en el tracto intestinal del hombre y de los animales. Causa infecciones graves en individuos inmunosuprimidos, especialmente en vías urinarias y en las meninges (8,9).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia que provocan las infecciones causadas por *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp* en ratones inmunodeficientes de la cepa *nude* trasplantados con la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

Todos los procedimientos sobre el cuidado y uso de los animales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones internacionales indicadas por el Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas (CIOMS). Para los trasplantes del tumor se siguieron las recomendaciones del Canadian Council on Animal Care (CCAC) (10, 11).

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron 100 ratones hembras de la cepa BALB/c.Fox1^{nu}, libres de patógenos específicos (SPF) de 4 a 6 semanas de edad producidos bajo 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, dentro de una cabina ventilada (con filtración absoluta de aire a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air 99,97 %), a una temperatura de 23+/-1°C, humedad 50-55 % y un régimen lumínico de 12 h luz/ 12 h oscuridad. Se les suministró alimento balanceado comercial ad libitum, (Cooperación) y agua de bebida autoclavados suplementada con un complejo

vitamínico. Los cambios del lecho se realizaron dos veces por semana (12).

CÉLULAS TUMORALES

La línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 se mantiene desde hace seis años en nuestro laboratorio a través de trasplantes subcutáneos sucesivos en ratones hembras homocigotas de la cepa N:NIH (S)-*Fox1^{nu}*, de donde se obtuvieron las células para realizar la experiencia.

TRASPLANTE TUMORAL

Las células tumorales se trasplantaron por vía subcutánea, según el protocolo del diseño experimental, en los ratones anestesiados con ketamina/xilacina (100/10 mg/kg, i.p.), realizando una incisión en la piel del cuello con un trocar.

MICROORGANISMOS

Se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Animales de Experimentación de la FCV-UNLP, una suspensión de cada una de estas bacterias se sembró en caldo cerebro corazón (Lab. Britania, Los Patos, Argentina), se incubó a 37 °C durante 24 horas, se realizó el recuento de bacterias repicando 0,1 ml en placas de agar Cetrimide en el caso de *P. aeruginosa* y *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp* en agar MacConkey (Lab. Britania, Argentina); incubándolas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (6, 7, 13). Luego, se realizó el recuento de las colonias por placa determinándose una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml. Seguidamente se fraccionó en tubos de centrifuga 1 ml de la suspensión del caldo, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para realizar las inoculaciones por vía oral.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los ratones se dividieron en 10 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 estudios histopatológicos.

Grupo 2: ratones inoculados por vía oral con una suspensión de *P. aeruginosa* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL

Grupo 3: ratones inoculados por vía oral con una suspensión de *K. oxytoca* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL.

Grupo 4: ratones inoculados por vía oral con una suspensión de *P. mirabilis* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL.

Grupo 5: ratones inoculados por vía oral

con una suspensión de *Citrobacter spp* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL.

Grupo 6: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *P. aeruginosa* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 7: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *K. oxytoca* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 8: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *P. mirabilis* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 9: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *Citrobacter spp* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 10: grupo control inoculados con solución fisiológica.

Todos los animales de sacrificaron con una mezcla de CO₂/O₂ (13) a los 10 días post-inoculación (PI) para realizar la necropsia.

RESULTADOS

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

Los ratones de los grupos 2, 3, 4 y 5 no desarrollaron signos clínicos de la enfermedad, habiéndose aislado *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*. del ciego.

En los animales de los grupos 6, 7, 8 y 9, el tumor creció de la misma manera que en los animales del grupo 1 y al realizarles la necropsia se aislaron los microorganismos inoculados experimentalmente del ciego de todos los individuos.

En los ratones del grupo control no se aislaron microorganismos ni se observó manifestación clínica de enfermedad.

DISCUSIÓN

Los animales inoculados con *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*. no desarrollaron signos clínicos producidos por la infección de estas bacterias. El crecimiento tumoral no se vio afectado por la presencia de los microorganismos oportunistas utilizados en el presente estudio ya que no se observaron diferencias en las respuestas entre los animales trasplantados con el tumor e inoculados con las bacterias y los que solamente tenían el tumor. Por lo tanto, se puede inferir que *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*. son microorganismos que no interfieren en el desarrollo del tumor A549 trasplantado en ratones BALB/c.*Fox1^{nu}*.

Sin embargo, estos microorganismos deben estar ausentes en las colonias ya que su grado de patogenicidad puede variar ante situaciones de estrés y por los cambios que se produzcan en el macro y microambiente o cuando se llevan a cabo procedimientos experimentales en los animales.

BIBLIOGRAFIA

1. Dooley, TP, Stamp-Cole M, Ouding R. Evaluation of a *Nude* Mouse Tumor Model Using b-Galactosidase-expressing Melanoma Cells. *Lab Anim Sci*. Vol. 43 (1): 48-57; 1993.
2. Carriquiriborde M, Milocco SN, Principi G, Cagliada P, Carbone C. *Pasteurella pneumotropica* causa la regresión de tumores humanos trasplantados en ratones inmunodeficientes. *Revista Medicina (Buenos Aires)*. Vol. 66: 242-244; 2006.
3. Flynn RJ, Brennan PC, Fritz TE. Pathogen Status of commercially produced laboratory mice. *Lab. Anim. Care*. vol. 15: 440-448; 1965.
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*. Vol. 28 (1): 1-12; 1994.
5. Won YS, Jeong ES, Park HJ, *et al.* Microbiological contamination of laboratory mice and rats in Korea from 1999 to 2003. *Exp Anim*. Jan;55(1):11-6; 2006.
6. Axel Fornerup Hansen. *Handbook of Laboratory Animal Bacteriology*, CRC Press LLC. 200.
7. Williams & Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA. 1984.
8. Weisbroth SH, Beker HJ, Lindsey RJ. *Bacterial and micotic diseases. The Laboratory Rat*. Vol I. New York. Academic Press. 1979.
9. Canadian Council on Animal Care "Guide to the care and use of experimental animals". CCPA, Manual Vol. 1. (2nda edición) 1998.
10. 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. Vol. 16: 172-192. 1976.
12. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals*. NIH publication USA. 1986.
13. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) "Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals", Columbia Inn, Columbia, MD, 1990.