

PASTEURELLA PNEUMOTROPICA CAUSA LA REGRESION DE TUMORES HUMANOS TRASPLANTADOS EN RATONES INMUNODEFICIENTES

MARTIN CARRIQUIRIBORDE, SILVANA N. MILOCCO, GUIDO PRINCIPI, PILAR CAGLIADA, CECILIA CARBONE

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

Resumen La técnica de trasplante de tumores humanos en ratones inmunodeficientes es muy utilizada como modelo en investigaciones sobre el cáncer. De acuerdo con las recomendaciones internacionales, los animales de experimentación deben estar libres de los microorganismos que interfieren en los resultados finales de las investigaciones, dentro de los cuales se encuentra *Pasteurella pneumotropica*. En el presente trabajo se evaluó la interferencia que produce esta bacteria en el crecimiento de la línea celular A549 de adenocarcinoma humano trasplantada en ratones de la cepa nude N:NIH (S)-*nu*. Se utilizaron 40 ratones divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno. Grupo 1: inoculados con la línea celular; grupo 2, con la bacteria; grupo 3, con la línea celular y la bacteria y grupo 4, el control sin inoculaciones. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre los animales de los grupos 1 y 3. Si bien este microorganismo es un patógeno oportunista no letal, los ratones trasplantados con la línea celular A549 e infectados con *P. pneumotropica* no son aptos para utilizarse como modelo animal en estudios sobre el cáncer debido a que esta bacteria interfiere en el desarrollo de la línea tumoral, con la consecuente interpretación errónea de los resultados. Pero el hecho que la bacteria haya causado la regresión de un tumor en pleno crecimiento es inesperado y el mecanismo de acción será objeto de futuros experimentos.

Palabras claves: ratones *nude*, *Pasteurella pneumotropica*, línea celular tumoral A549

Summary *Pasteurella pneumotropica* produces regression of human tumors transplanted in immunodeficiency mice. The technique of human tumor cell line transplantation in immunodeficient mice is used worldwide as a model for cancer research. In accordance with international recommendations, animals used in biomedical research should be free of microorganisms which can interfere in experimental results; including *Pasteurella pneumotropica*. The object of this study was to evaluate the interference produced by *P. pneumotropica* in the human adenocarcinoma cell line A549 transplanted in N:NIH(S)-*nu* mice. A total of 40 mice divided into 4 groups of 10 animals each was used to perform this study. Group 1: inoculated with the cell line; group 2, with the bacteria; group 3, with the cell line and the bacteria; group 4, as control with no inoculations. Significant differences were observed in tumor growth in groups 1 and 3, infected and not infected with *P. pneumotropica*. Although this microorganism is non lethal and only opportunistic, the infected animals are to be considered not suitable to be transplanted with the tumor cell line A549 for experimental studies since these bacteria interfere with tumor growth. However, the fact that a growing tumor regresses in the presence of the bacteria is an interesting observation which deserves further exploration in order to elucidate the mechanism involved.

Key words: Nude mice, *Pasteurella pneumotropica*, tumor cell line A549

El uso de animales de experimentación como modelos en la investigación del cáncer, es esencial para el estudio de procesos fisiológicos complejos tales como el crecimiento tumoral, las metástasis y el desarrollo de nuevas drogas antitumorales, muchas de las cuales no pueden probarse *in vitro* y por ello requieren de ensayos *in vivo*. En las últimas décadas se han desarrollado cepas de ratones que debido a sus características genéticas

aceptan el trasplante de tejidos alogénicos. El modelo animal más utilizado para el trasplante de diferentes líneas tumorales humanas son los ratones atímicos inmunodeficientes¹, dentro de los cuales se encuentra el ratón de la cepa N:NIH(S)-*nu*.

Este ratón, a partir de ahora *nude*, surge como consecuencia de una mutación ocurrida en el año 1962 en una colonia de ratones albinos Swiss y se describe con el símbolo *nu* de acuerdo con la nomenclatura internacional; el gen responsable de esta mutación es autosómico y recesivo. Las características que describen a esta cepa son ausencia de pelo y aplasia del timo, el que permanece rudimentario produciendo un número reducido de células T maduras; esto hace que los ratones

Recibido: 1-III-2006

Aceptado: 22-III-2006

Dirección postal: Lic. Martín Carriquiriborde, Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, Calle 60 y 118 s/n, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-0221) 421-1276

e-mail: mcarriq@fcv.unlp.edu.ar

nude homocigotas no rechacen tejidos alogénicos ni xenogénicos, por lo que es el principal modelo animal de inmunodeficiencia grave. Este gen induce a una disgenesia gonadal y un aumento de la susceptibilidad a infecciones y a variaciones ambientales. Las colonias de ratones *nude* deben mantenerse bajo estrictos procedimientos de aislamiento y técnicas especiales de manejo, ya que se deben minimizar las posibilidades de introducción de microorganismos en las habitaciones donde se alojan². Asimismo, estos individuos son muy susceptibles a contraer infecciones, entre las que se han observado frecuentemente abscesos producidos por *Pasteurella pneumotropica*^{3,4}. Debido a contaminaciones de este tipo es común que se produzcan fracasos en la evaluación de los resultados de los experimentos cuando se utilizan estos animales trasplantados con tumores humanos en investigaciones oncológicas.

De acuerdo con las recomendaciones internacionales de estandarización microbiológica⁵ *P. pneumotropica* debe estar ausente en las colonias de ratones inmunodeficientes. Este bacilo Gram negativo, no móvil, no hemolítico, produce colonias grisáceas, húmedas y planas de 1 milímetro de diámetro cuando se cultiva en agar sangre; no crece en agar Mc Conkey y produce hidrólisis de la urea; estas dos últimas características la diferencian de *Pasteurella multocida*⁶. Tiene una amplia distribución en colonias de ratas y ratones en general con ausencia de signos clínicos, aun en animales inmunocomprometidos. Puede estar presente en forma inaparente en huéspedes como el hombre, carnívoros y ratas silvestres, siendo estas últimas reservorios del microorganismo. Se la ha asociado principalmente con enfermedades del tracto respiratorio en ratas, ratones, hámsters y conejos de laboratorio⁷. En infecciones espontáneas en el ratón, *P. pneumotropica* se encuentra en fosas nasales, conjuntiva, conductos lagrimales, tráquea, pulmones, útero y con menor frecuencia en hígado, bazo y riñón. En infecciones con manifestaciones clínicas se puede presentar afectando el tracto respiratorio superior, produciendo rinitis, sinusitis, conjuntivitis y otitis media; en pulmones como bronconeumonía; y como infecciones piógenas desarrollando abscesos, mastitis y furúnculos^{8,9}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que produce *P. pneumotropica* en el crecimiento de la línea celular A549 transplantada en ratones de la cepa *nude* N:NIH (S)-*nu* inoculados experimentalmente con esta bacteria.

El presente trabajo fue realizado bajo las normativas internacionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio^{11,13}, habiéndose aprobado por la comisión de ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), UNLP.

Para tal fin se utilizaron 40 ratones hembra *nude* libres de patógenos específicos (SPF) de 4 a 6 semanas de edad producidos bajo estrictas barreras sanitarias en el Bioterio de la FCV, UNLP. Durante la experiencia to-

dos los animales se alojaron en microaisladores con lecho de viruta estéril en una cabina ventilada, con presión positiva 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 y *ad libitum*. Los cambios de lecho se realizaron dos veces por semana^{10,11}.

Los ratones se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno, los que se conformaron de la siguiente manera:

Grupo 1: animales con trasplante tumoral subcutáneo, únicamente. En este caso, 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 únicamente con *Pasteurella pneumotropica* por vía subcutánea. Los ratones se sacrificaron a los 10 días post inoculación (PI) y se les realizó la necropsia, se tomaron muestras de la zona de inoculación, las que se sembraron en placas de agar sangre al 5% (*Britania*, AS) y se incubaron a 37 °C durante 18 hs.

Grupo 3: animales con trasplante de tumor e inoculados con *P. pneumotropica* por vía subcutánea. Los animales fueron sacrificados a los 10 días PI y se les realizó la necropsia. De la zona de inoculación se tomaron muestras las cuales se sembraron en AS y se incubaron a 37 °C durante 18 hs. Para realizar estudios histopatológicos se tomaron muestras de tejido subcutáneo de la zona del trasplante.

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

Todos los animales fueron sacrificados con una mezcla de CO₂/O₂¹².

Los animales de los grupos 1 y 3 fueron trasplantados con células de la línea tumoral A549 por vía subcutánea, previamente anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), realizando una incisión en la piel laxa del cuello con un trocar. Los animales de los grupos 2 y 3 se inocularon con *P. pneumotropica* ATCC 35149 en el mismo lugar de la inoculación de la línea tumoral en el caso del grupo 3 y por vía subcutánea en el grupo 2.

Para la preparación del inóculo se sembró en placas de agar sangre. Se incubó a 37 °C durante 8 hs para que las bacterias conservaran su patogenicidad y se suspendió en solución fisiológica hasta lograr una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml, luego se fraccionó 1 ml de la suspensión por tubo y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para realizar las inoculaciones.

Los resultados fueron los siguientes: 7 de los 10 animales del grupo 1 presentaron crecimiento tumoral visible. A la necropsia no se observó metástasis en los órganos internos.

En el grupo 2, uno de los 10 animales inoculados presentó un absceso en el sitio de la inoculación a los 4 días PI, el cual se reabsorbió 7 días después. El microorganismo no se aisló en ninguno de los animales.

En el grupo 3, ocho de los 10 animales presentaron crecimiento tumoral al cuarto día PI, logrando su máximo desarrollo al sexto día para luego reabsorberse en su totalidad al décimo día PI. A la necropsia no se observó ninguna alteración en los órganos y el cultivo en AS arrojó resultados negativos para *P. pneumotrópica*.

A todos los animales del grupo 4 (control) se les realizó una necropsia de diagnóstico no habiéndose observado ninguna lesión.

Discusión

Evidentemente *Pasteurella pneumotropica* produce interferencias en los estudios en los que se utiliza como modelo experimental el ratón inmunodeficiente N:NIH(S)-*nu* trasplantado con la línea celular de adenocarcinoma humano A549, debido a que se observó que en presencia de este microorganismo hubo regresión de los tumores.

Si bien *Pasteurella pneumotropica* es un microorganismo que en general no causa altos índices de mortalidad en las colonias de ratones de experimentación, las contaminaciones con esta bacteria podrían conducir a interpretaciones erróneas de los resultados. El hecho de que se haya producido la reabsorción tumoral en todos los animales trasplantados con la línea A549 e inoculados con *P. pneumotropica*, es un resultado inesperado y digno de estudio. Será motivo de posteriores estudios con el fin de esclarecer el mecanismo involucrado.

Bibliografía

1. Dooley TP, Stamp-Cole M, Ouding R. Evaluation of a Nude Mouse Tumor Model using β -Galactosidase-expressing melanoma cells. *Lab Anim Sci.* 1993; 43: 48-57.
2. Flynn R.J, Brennan PC, Fritz TE. Pathogen status of commercially produced laboratory mice. *Lab Animal Care* 1965; 15: 440-8.
3. Moore G.J, Alfred P. Treatment of *Pasteurella pneumotrópica* abscesses in nude mice (*nu/nu*). *Lab Animals* 1978; 12: 227-8.
4. Moore G.J. Conjuntivitis in the nude rat (*rnu/nu*). *Lab Animals* 1979; 13: 35.
5. Kraft V, Deeny AA, Blanchet HM, 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. *Lab Animals* 1994; 28: 1-12.
6. Williams & Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1, 1984.
7. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals*. Bethesda: NIH, 1986.
8. Weisbroth SH, Beker HJ, Lindsey RJ. *Bacterial and mycotic diseases. The Laboratory Rat*. Vol I. New York: Academic Press, 1979.
9. Boot R, Bisgard M. Reclassification of 30 *Pasteurella*-ceae strains isolated from rodents. *Lab Animals* 1995; 29: 314-26.
10. Hume CW. *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals*. UFAW. 5o Edition, Edinburgh: Constable Ltd, 1976; 16: 172-92.
11. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the care and use of experimental animals*. CCPA, Manual Vol. 1, 2nd edition, 1998.
12. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, Columbia MD, 1990.
13. *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).

We have no more right to consume happiness without producing it than to consume wealth without producing it.

No tenemos más derecho de gastar felicidad sin producirla que de gastar riquezas sin producirlas.

George Bernard Shaw (1856-1950)

Candida, 1898