

Por qué muchos ensayos con ratones no son extrapolables a humanos?. Importancia del ciclo circadiano, la alimentación y la microbiota intestinal.

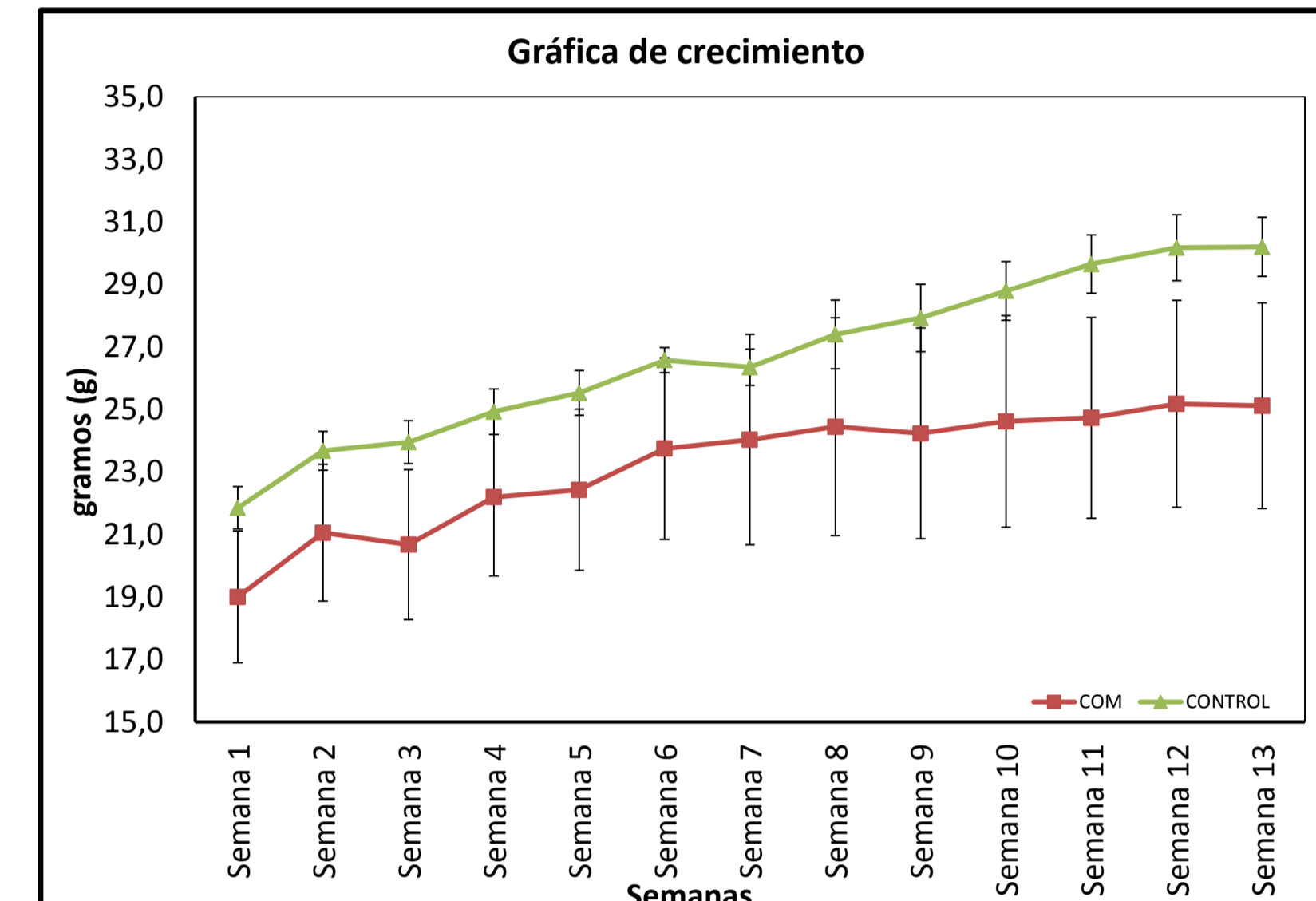
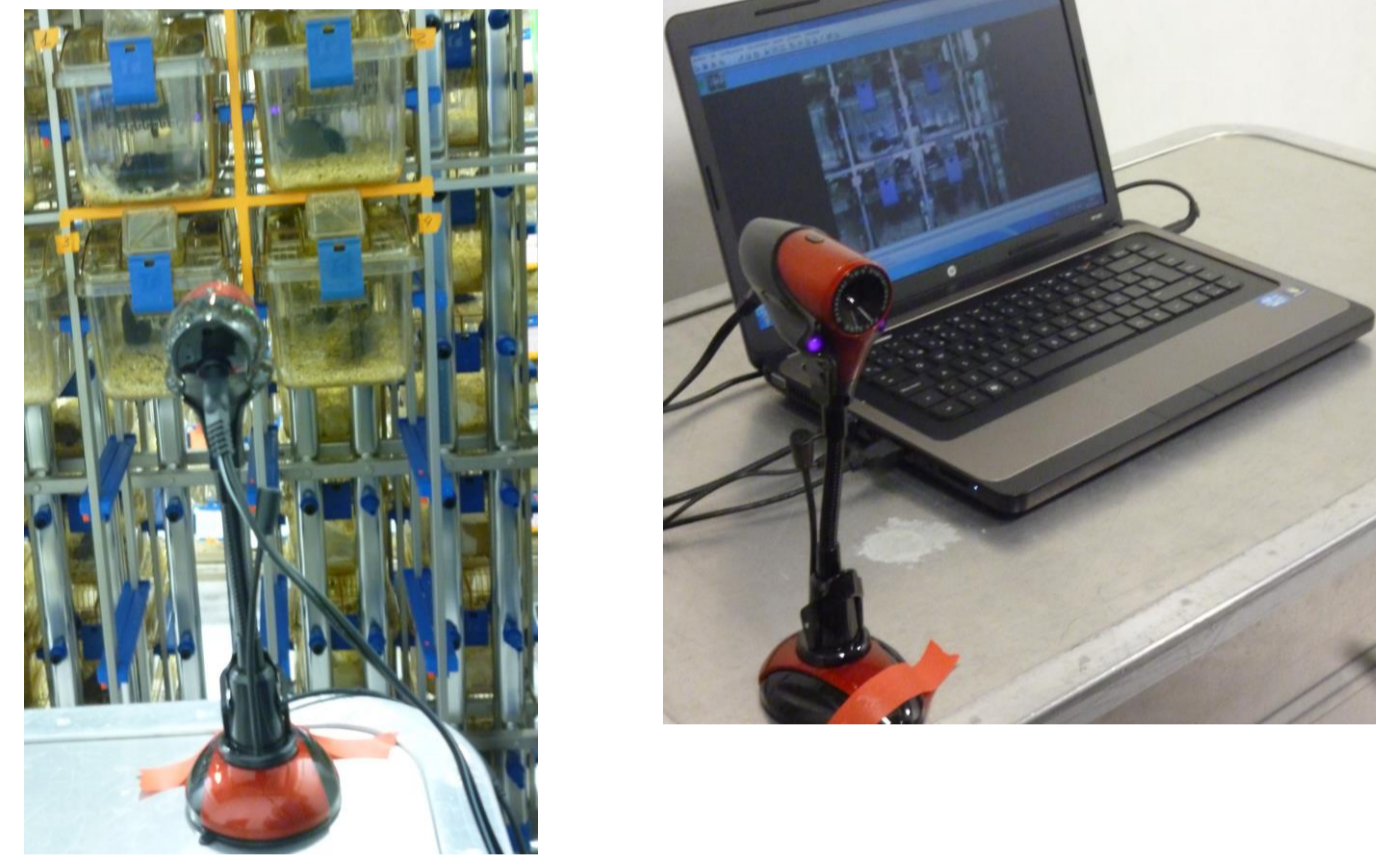
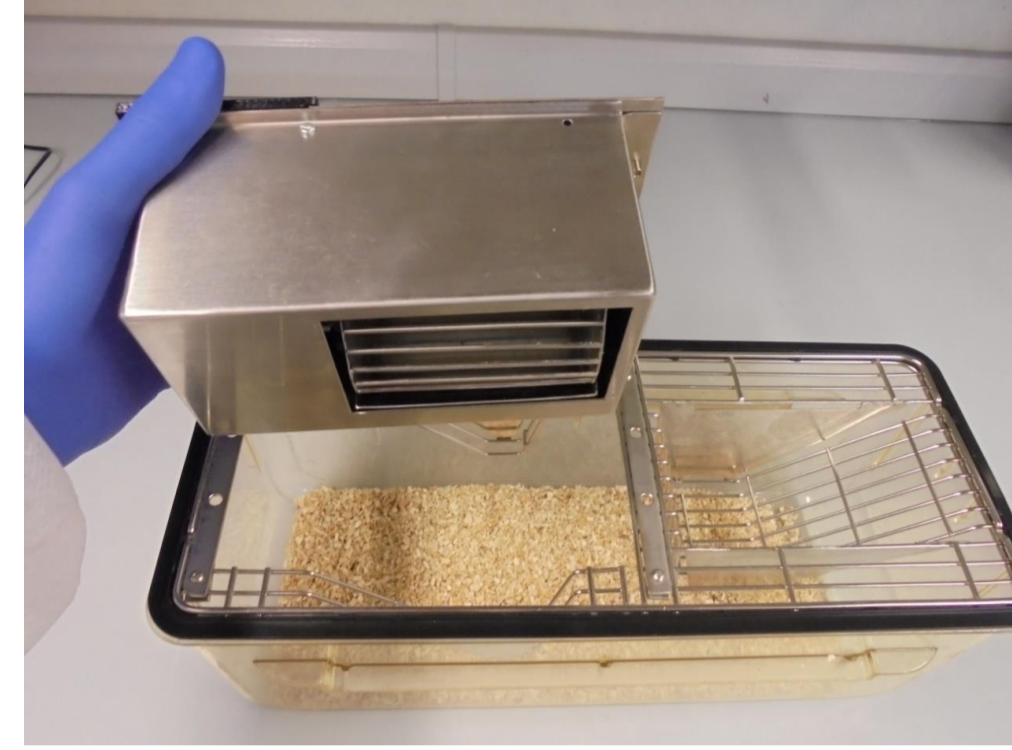
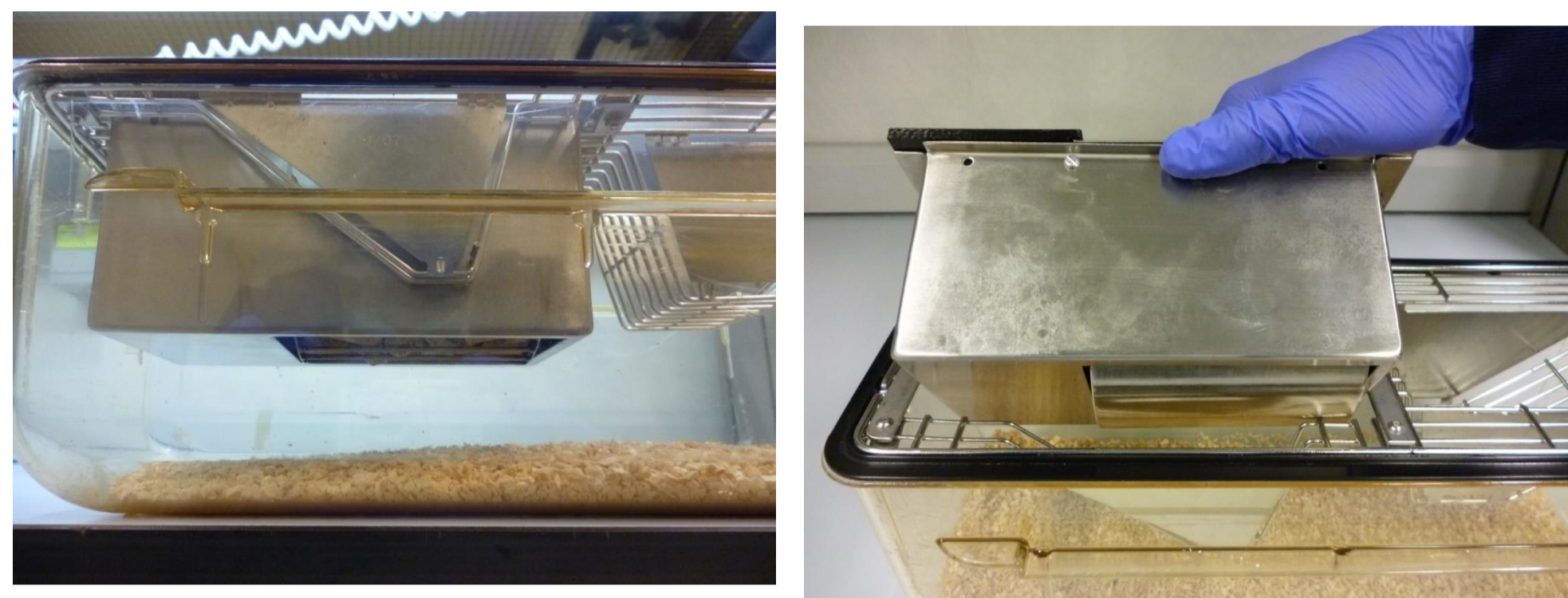
“Why many research with mice are not extrapolated to human?. Importance of the circadian cycle, feeding and intestinal microbiota”

Juan Martín-Caballero, Carol Zamora, Rebeca Sánchez, Manuel García y Josep Moreno. PCB-PRBB. Animal Facility Alliance. Barcelona. Spain

The goal of this communication is to show by a pilot assay how experimental designs should be addressed with mice to improve the extrapolation to human. Focusing on three main components: circadian rhythm, feeding time, and intestinal microbiota. We show the results of this preliminary study in which a group of animals have been eating ad libitum, (control), and another group has eaten three times at interval of four hours only during the dark cycle. We have recorded video of the mice with infrared web camera to evaluated the welfare and behaviour, we have analyzed grow graphics and we perform haematology and biochemistry analysis, as well as a study of the intestinal microbiota by metagenomic sequencing.

Material y Método

Los dieciséis ratones C57BL/6J, origen Charles River Francia, (8 Hembras y 8 Machos), fueron alojados en la zona de barrera, en microaisladores individualmente ventilados de Tecniplast Blue Line, con 440 cm² de superficie, en grupos de cuatro por cubeta. Grupo control con comida ad libitum, cuatro machos y cuatro hembras, grupo comederos con temporizador, cuatro machos y cuatro hembras, todos de seis semanas de edad. Se cambiaron a cubetas limpias una vez a la semana en cabinas de flujo laminar. Todos los materiales que entran en la barrera se autoclavan o se desinfectan completamente. Se mantuvieron en ciclo de luz-oscuridad de 12horas, (8ha.m.-20ha.m.). Las condiciones ambientales fueron de 22°C +/- 2°C, y HR% 40%-75%.Fueron alimentados con un pienso de mantenimiento en pellets con un 14% de Proteína. Mouse and Rat SDS N° I Maintenance .



Cibertec S.L.

El control temporal de ingesta durante la noche, fase de máxima actividad en roedores, se estableció con un grupo de cuatro hembras y un grupo de cuatro machos de seis semanas de edad. Durante trece semanas solo tuvieron acceso a la comida durante ciclo de oscuridad durante una hora a intervalos de cuatro horas, (20h a 21h, 01h-02h, 6h-7h). El aparato de apertura controlada del comedero con temporizador programable se ubica en la rejilla metálica. Sistema automático de privación de alimento “SMART WAITER v2.0” (Cibertec s.l.). El grupo control formado por cuatro machos y cuatro hembras fueron alimentados con el mismo tipo de pienso ad libitum. Estuvieron situados en el mismo racks ventilado a la misma altura. Los ratones se pesaron semanalmente para configurar curvas de crecimiento. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena safena para análisis hematológicos y bioquímicos completos, mediante equipos Abacus JunVet de hematología y VetScan para bioquímica. Datos no mostrados.

Con el objetivo de analizar el comportamiento de los ratones durante el ciclo nocturno se instaló una Cámara con infrarrojos. 10x Megapíxel Digital zoom F=3.85MM, que permitía a través de internet visualizar las imágenes en tiempo real con el programa de grabación “Active Webcam Deluxe”.

Los chequeos sanitarios realizados a estos ratones, (dos ratones de cada cubeta), constatan que son ratones libres de patógenos. Estos completos chequeos se realizaron por Dynamimed S.L. Tres Cantos Madrid. Al mismo tiempo se tomaron muestras para el estudio de la microbiota intestinal mediante secuenciación. Las muestras se procesan en una campana de extracción de DNA con flujo laminar y UV, homogeneizándose mediante el “Tissuelyser” (Qiagen®).Seguidamente se procede a la extracción del DNA en la campana de extracción mediante un Kit comercial de columnas. Una vez obtenido el DNA se procede a realizar las correspondientes PCRs con los primers que amplifican la región V3-V4 conservada del rDNA16S, para obtener las secuencias (Illumina MiSeq).Para concluir, se procede al análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.



Servicios de Diagnóstico y Monitorización de Salud de Animales de Laboratorio

Nº de Muestra: A / 355

Identificación del Cliente		
Nombre	PRBB. PARC RECERCA BIOMEDICA BARCELONA	Dirección
Contacto	JUAN MARTÍN CABALLERO	Carrer del Doctor Aiguader, 88
Teléfono	933160008	Barcelona
E-mail	jmcballero@prbb.org	

Identificación de la Muestra								
Tipo de muestra	Ratón inmunocompetente			Fecha Recepción	27/05/2015			
Referencia Cliente	150006643			Fecha Inicio Análisis	27/05/2015			
				Fecha Final Análisis	01/06/2015			
				Fecha Emisión Informe	01/06/2015			

CAJA	COMP	JAVIA	ID	LÍNEA	SEXO	MARCA	COLOR
2	B	Control	150006643	CUI/C37B/6J	Macho	EB	BI

FELASA ANUAL RATÓN IC

ESTUDIO PATOLÓGICO COMPLETO
Necropsia completa, inclusión en parafina y estudio histopatológico, incluyendo múltiples preparaciones por animal abarcando todos los órganos (piel, pulmón, corazón, hgado, bazo, riñón, intestino delgado y grueso).



16S Metagenomics Aggregate Report

SEROLOGÍA ANUAL FELASA RATÓN		
VIRUS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Ectromelia virus (ECTRO)	-	
Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM)	-	
Hantaan virus	-	
K virus (Kv)	-	
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	-	
Murine adenovirus FI (MAD-1)	-	
Murine adenovirus K87 (MAD-2)	-	
Mouse citomegalovirus (MCMV)	-	
Mus mus hepatitis virus (MHV)	-	
Mus mus parvovirus (MPV) (S, 2), VP2	-	
Mus mus parvovirus (NS1)	-	
Murine norovirus (MNV)	-	
Minute virus of mice (MVM)	-	
Polyoma virus (Poly)	-	
Pneumonia virus of mice (PVM)	-	
Reovirus type 3 (REO-3)	-	
Sandax virus	-	
Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	-	
BACTERIAS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Cilia-Associated Respiratory Bacillus (CARB)	-	
Mycoplasma pulmonis (Mpu)	-	
Clostridium piliforme - Tizzer's (Cpil)	-	
PARÁSITOS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Encephalitozoon cuniculi (ECUN)	-	

ARTROPODOS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Artropodos (ácaros, pulgas, piojos)	-	
PROTOZOOS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Spiromucium muris	-	
Giardia muris	-	
Trichomonas	-	
Eimeria muris	-	
Eimeria spp	-	
HELMINTOS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Syphacia obvelata	-	
Aspiculuris tetraptera	-	
VIRUS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Murine thymic virus (MTLV)	-	
BACTERIAS		
Pruebas/Ensayos	Resultados	
Helicobacter spp	-	
RECOMENDACIONES FELASA		
Pruebas/Ensayos	HISPO OBRAFÍNICO	HISPO CECAL
Bordetella bronchiseptica	-	-
Citrobacter rodentium	-	-
Corynebacterium kutscheri	-	-
Pasteurella pneumotropica	-	-
Salmonella spp	-	-
Streptococcus beta-haemolyticus (incl. group D)	-	-
Streptococcus pneumoniae	-	-

Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	115,063	59.29 %
Parabacteroides goldsteinii	36,641	18.88 %
Dysgonomonas wimpennyi	26,346	13.58 %
Microvirus Enterobacteria phage PhiX174	2,629	1.35 %
Parapedobacter koreensis	1,674	0.86 %
Pedobacter kwangyangensis	1,538	0.79 %
Akkermansia muciniphila	1,264	0.65 %
Porphyromonas canis	934	0.48 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 405. This table shows the top 8 of 405 classifications.

Ratón con comedero con temporizador

Sample Number	Sample ID	Shannon Species Diversity	Number of Species Identified
1	DYN2-1trim260	1.395	404
2	DYN2-2trim260	1.489	375
3	DYN2-3trim260	1.711	412
4	DYN2-4trim260	1.752	406
5	DYN2-5trim260	1.318	378
6	DYN2-6trim260	1.071	401
7	DYN2-7trim260	1.709	356
8	DYN2-8trim260	1.862	433

Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	74,620	43.48 %
Lactobacillus hayakitensis	53,977	31.45 %
Lactobacillus gasseri	7,517	4.38 %
Lactobacillus taiwanensis	6,856	3.99 %
Dysgonomonas wimpennyi	4,626	2.70 %
Microvirus Enterobacteria phage PhiX174	2,830	1.65 %
Parabacteroides goldsteinii	2,660	1.55 %
Lactobacillus reuteri	2,583	1.50 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 434. This table shows the top 8 of 434 classifications.

Ratón con comida ad libitum

Resultados

Los ratones que comen tres veces, solo durante el ciclo de oscuridad a intervalos de cuatro horas tienen un desarrollo normal y en la curva de crecimiento se constata una diferencia del 10% de menor peso medio cuando alcanzan el máximo valor, comparándolos con los controles que comieron ad libitum. Tampoco manifiestan alteraciones hematológicas o bioquímicas.

A través de las cientos de horas de grabaciones nocturnas y controles diarios en la fase diurna se ha comprobado que los ratones no manifiestan alteraciones en su conducta al restringir el acceso temporal al alimento, y desde el punto de vista del bienestar animal no hubo incidencias ni aumento de la agresividad.

El análisis metagenómico de la microbiota intestinal pone de manifiesto diferencia en las poblaciones de especies bacterianas identificadas en los ratones con alimentación controlada comparando con la microbiota intestinal de los ratones con alimentación ad libitum. Reflejándose también diferencias entre machos y hembras en ambos grupos.

Discusión

Los ratones son roedores de actividad nocturna con lo que su ritmo circadiano es diferente al de los humanos y los genes que se regulan en las distintas fases del ciclo, (Clock genes. Sistema Nervioso Central), y por tanto actúan de manera distinta en humanos y en ratones, si empleamos los roedores en su fase de descanso o lumínica. Igualmente lo que se consume y cuando se consume tiene una gran influencia en el ciclo circadiano metabólico regulándose en este caso a través del hgado la expresión de los genes involucrados. Ambos aspectos tienen un efecto directo sobre la microbiota intestinal en mamíferos, la cual ejerce una gran influencia no solo en los procesos metabólicos, si no también en regulación del sistema inmune y en enfermedades neurodegenerativas o el cáncer.

Bibliografía

- *Axel Kornerup Hnasen et al; "A Review of Applied Aspects of Dealing with Gut Microbiota Impact on Rodent Models". ILAR Journal, 2015, Vol.56.No 2, pp250-264.
- *Alexandria M.Palaferri Schieber et al; "Disease tolerance mediated by microbiome E. coli involves inflammasome and IGF-1 signaling". Science. 30 octubre 2015. pp558-562.
- *Charna Dibner and Frédéric Gachon. "Circadian Dysfunction and Obesity: Is Leptin the Missing Link?. Cell Metabolism. 22 Septiembre 2015, pp, 359.
- *Amir Zarrinpar, Amandine Chaix, Shibu Yoosheph, and Satchidananda."Diet and Feeding Pattern Affect the Diurnal Dynamics of the Gut Microbiome". Cell Metabolism20, pp 1006-1017. December 2, 2014.
- *Elaine Y.Hsiao, et alt. " Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. Cell 155, pp 1451-1463. December 19.2013
- *Meumi Hatori, et al; " Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet". Cell Metabolism 15, pp 848-860. June 2012.