

## Revisión sobre el uso de microRNA en la detección temprana de diabetes mellitus en caninos

Franco González V.<sup>1</sup>, Camilo Gálvez<sup>2</sup>, Javiera Marín C.<sup>2</sup>, Matías Maturana M.<sup>2</sup>, Macarena Matus De La Parra C.<sup>2</sup>, Sofía Matus R.<sup>2</sup>, Gabriela Winkler M.<sup>2</sup> y Sergio Bucarey V.<sup>3</sup>

### Review on the use of microRNA in the early detection of diabetes mellitus in canines

*Diabetes mellitus in canines corresponds to a pathology whose etiopathogenesis has not yet been fully understood, since it has a great similarity with human type 1 diabetes mellitus, but the same risk factors have not been found. New diagnostic methods have been investigated in recent years in diabetic murine models, among which microRNAs have been studied as early markers of type 1 and type 2 diabetes mellitus. In canines a homology has been found between microRNAs 21, microRNA 34, microRNA 29, and microRNA 146a with those studied in human and murine diabetics. This would imply that the study of these microRNAs may have a great impact on the early detection of diabetes in canines and be a model for the study of new microRNAs that may be implicated in the development of diabetes in humans.*

**Key words:** Diabetes, canine, microRNA, immunity, cytokines.

<sup>1</sup>Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, sede Bilbao. Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes (SOCHED). Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

<sup>2</sup>Estudiante de pregrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

<sup>3</sup>Centro Biotecnológico Veterinario, Biovetec. Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, La Pintana, Santiago, Chile.

Correspondencia a:

Dr. Franco González Villar

Servicio de Endocrinología Hospital Clínico Veterinario Universidad de Chile.

Francisco Bilbao 2854, Providencia. Teléfono: 29771840. francomedvet@gmail.com

Recibido: 01-03-2017

Aceptado: 11-04-2017

### Introducción

La prevalencia de diabetes mellitus en la población alcanza en nuestro país cerca de un millón y medio de personas<sup>1</sup>. La incidencia de la diabetes mellitus tipo 1 según datos internacionales, van de 1 a 60 por cada 100.000 habitantes al año en menores de 15 años, mientras que en Chile según datos de la superintendencia de salud, la incidencia fluctúa entre un 5.44 a 8.33 por cada 100.000 habitantes al año<sup>2</sup>.

La diabetes mellitus es una de las alteraciones endocrinas más frecuentes en caninos, afecta a caninos de mediana a avanzada edad, y su prevalencia ha ido en aumento en los últimos años. Hace treinta años, se diagnosticaba diabetes a 19 de cada 10.000 caninos que visitaban las clínicas veterinarias de Estados Unidos<sup>3,4</sup>. En 1999, la prevalencia se había multiplicado por tres, la diabetes afectaba a 58 de cada 10.000 perros que acudían a las clínicas veterinarias<sup>3</sup>. Estudios de prevalencia han mostrado

una frecuencia de 0,32% en caninos del Reino Unido<sup>5</sup>, y 1,33% en hospitales italianos<sup>6</sup>.

En un estudio prospectivo realizado en el hospital clínico de la Universidad de Chile, se encontró que de los 4.470 pacientes nuevos atendidos, 331 fueron diagnosticados con algún tipo de endocrinopatía, correspondiendo a un 8% del total de los pacientes. De estos pacientes endocrinos un 10% fue diagnosticado con diabetes mellitus<sup>7</sup>.

Una característica importante de la diabetes es la gran relevancia del factor ambiental en el desarrollo de la enfermedad, pues si comparamos a dos gemelos idénticos de los cuales uno desarrolla diabetes tipo 1, la posibilidad de que esa misma enfermedad se desarrolle en el otro es sólo de un 45%, porcentaje que se encuentra muy por debajo del 100% que se esperaría al tener ambos los mismos genes<sup>8</sup>.

Esta diferencia puede ser explicada mediante la epigenética, ciencia que estudia los cambios en la expresión de genes que conllevan a una variación fenotípica,

## Artículo Original

sin existir un cambio en la secuencia de DNA<sup>9</sup>. Se han descrito diferentes mecanismos que regulan la expresión génica bajo este marco (mecanismos epigenéticos), entre los cuales se encuentran la metilación del DNA, su modificación de histonas y el accionar de RNA no codificantes (ncRNAs); de estos últimos se pueden distinguir los microRNAs (miRNAs) y los RNAs interferentes pequeños (siRNAs)<sup>9,10</sup>.

El descubrimiento de los microRNA (miRNA) en 1993, ha redefinido la forma en cómo se practica e investiga la regulación génica. Los microRNA son pequeñas secuencias de RNA no codificante, de 19-30 nucleótidos de longitud, descubiertos a partir del nemátodo *Caenorhabditis elegans*<sup>11</sup>, cumplen un rol importante en la modulación a nivel post-transcripcional de un amplio número de genes, y no tan sólo en nemátodos, ya que su presencia se ha descrito a nivel transversal en todos los reinos, encontrándose desde plantas hasta animales mayores (secuencias altamente conservadas).

La ubicación de los genes que codifican para los miRNA puede variar ampliamente entre las especies. Estos pueden o no ubicarse a nivel de intrones, lo que va a definir la existencia de una etapa previa de maduración. Inicialmente, los miRNA se ensamblan en el núcleo como una secuencia bicatenaria a partir de la enzima RNA polimerasa II, la cual es altamente conservada entre animales. Luego éste es transportado al citoplasma, donde va a ocurrir el proceso de maduración por la enzima RNAasa III. Posteriormente, las cadenas son separadas, quedando una estable y otra inestable, siendo esta última generalmente degradada<sup>12</sup>.

Una forma de funcionamiento de los miRNA es unirse a secuencias de RNA mensajero, interfiriendo con la traducción génica y evitando así la producción proteica. Otra forma descrita posteriormente, es que la unión de los miRNA al RNA mensajero, genera una desestabilización de este complejo, resultando en la degradación de este y evitando así la formación del producto proteico<sup>13</sup>.

Las células del sistema inmune, principalmente los linfocitos T CD4+, CD8+, linfocitos B y macrófagos, liberan una gran cantidad de citoquinas inflamatorias, dentro de las cuales las más importantes son la interleuquina 1 beta, el factor de necrosis tumoral alpha, y el interferón gamma, entre otros. Estas citoquinas pueden generar un aumento en los niveles del microRNA 21, microRNA 34, microRNA 29, y microRNA 146a, los cuales son algunos de los microRNA cuya sobreexpresión tiene un papel relevante en el desarrollo de diabetes mellitus a nivel epigenético<sup>14</sup>.

La etiología de diabetes mellitus en el canino es discutible hasta el día de hoy, algunos estudios han establecido la presencia de anticuerpos GAD 65 e IA-2 (Davison, 2008), al igual que anticuerpos antinsulínicos (Jong-

Hyuk, 2016) en pacientes diabéticos, los cuales han sido caracterizados en la diabetes tipo 1 del humano. Entre los factores desencadenantes, se han encontrado la predisposición genética, infecciones, medicamentos que producen resistencia a la insulina, obesidad, y la pancreatitis. Finalmente el resultado es una pérdida irreversible en la función de las células  $\beta$  pancreáticas, en conjunto con un estado de insulino resistencia<sup>15</sup>.

La obesidad y su rol en la insulino resistencia en el canino son controversiales, pero los últimos estudios han demostrado que la grasa visceral a diferencia del humano, no afecta la sensibilidad de la célula a la insulina<sup>16</sup>, esto lo explica Verkest en sus estudios, probando que en el canino con obesidad visceral no disminuiría la Adiponectina, la cual es una de las principales apolipoproteínas insulinosensibilizantes, y uno de los principales factores de insulinoresistencia involucrado en las personas obesas<sup>17</sup>.

Se han realizado algunos estudios tratando de establecer métodos para evaluar la resistencia a la insulina en caninos, entre estos métodos se encuentra la medición de insulinoresistencia por medio de un modelo conocido como HOMA (Homeostatic model assesment) con valores de insulinoresistencia establecidos en caninos sobre 2,4<sup>18</sup>.

Respecto a la prevalencia de edad, la mayoría de los caninos al momento de ser diagnosticados se sitúa entre los 4 y los 14 años, con un pico de prevalencia entre los 7 y 9 años de edad<sup>16</sup>, lo que sumado a la presencia de autoinmunidad, hace que la diabetes mellitus del canino sea similar a la Diabetes tipo LADA (Diabetes latente autoinmune del adulto).

Un reciente estudio de la Universidad de Pensilvania encontró que los islotes de Langerhans de humanos y perros son distintos, en humanos el 54% corresponde a células  $\beta$ , el 35% a células  $\alpha$  y el 11% a otro tipo de células, en cambio en el perro el 80% corresponde a células  $\beta$ , el 10% a células  $\alpha$  y el 10% a PP y somatostatina. Así mismo encontró una pérdida de estas células  $\beta$  en diabéticos, encontrando una similitud entre el diabético tipo 1 canino y humano<sup>19</sup>. Este hallazgo podría explicar el número de pacientes caninos insulino dependientes encontrados en nuestro país.

Entre los distintos microRNA estudiados que pudieran tener implicancia en la diabetes mellitus canina, podemos encontrar el microRNA 21, el cual actúa inhibiendo a la proteína VAMP2. Esta proteína está relacionada entre otros procesos, con la exocitosis de insulina, y con la inhibición de la proteína PDCD4 que es pro apoptótica. Cabe destacar que este microRNA tiene un rol protector en la célula con respecto a la apoptosis, mientras que su expresión aumenta en presencia de la interleuquina 1<sup>20</sup>.

Los microRNA 29 actúan inhibiendo a la proteína OC2, la cual es un inhibidor de la granulina 4, que a su vez es inhibidora de la exocitosis de insulina. Por lo tan-

to, al inhibir OC2, aumenta la expresión de granulina 4, y por ende disminuye la secreción de insulina<sup>18,21,22</sup>. Así también suprime el Mcl-1, llevando a la muerte de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que marca un estadio inicial en la diabetes mellitus tipo 1<sup>23</sup>.

Existen 3 tipos de microRNA 29: microRNA 29a, microRNA 29b, y microRNA 29c. Se han encontrado aumento de niveles en ratones y humanos diabéticos, tanto en pacientes diabéticos tipo 1, como tipo 2. Está sobreexpresado por citoquinas proinflamatorias e hiperglicemia<sup>24</sup>. Se ha descrito en los primeros estadios de ratones diabéticos tipo 1 no obesos<sup>25</sup>.

El microRNA34 también actúa inhibiendo a VAMP2, y además actúa inhibiendo directamente a bcl2 que es una proteína antiapoptótica, por lo que este microRNA es de especial relevancia en el proceso de apoptosis<sup>20</sup>.

Estudios han mostrado una correlación de aproximadamente el 50% entre los microRNA caninos y humanos relacionados con diversas enfermedades. Análisis filogenéticos de los precursores de microRNA humano han mostrado una similitud aproximada de un 85% en los caninos, mostrando menos de un 5% de sustitución a nivel de nucleótidos. Este mismo estudio, mostró una homología entre el microRNA 146, 29, y 21 entre humanos, caninos y ratones<sup>26</sup>, lo que permitiría su estudio en caninos diabéticos.

## Discusión

Un método de detección temprana de la diabetes en caninos sería la utilización de los microRNA que han sido encontrados en humanos y ratones con esta patología, lo importante es evaluar cuál de los diversos microRNA tendría una buena correlación en los caninos, ya que la etiología de la diabetes aún no está clara.

Los microRNA 29 serían buenos marcadores para la detección de diabetes mellitus en caninos, ya que se encuentran aumentados tanto en diabetes mellitus tipo 1 como tipo 2, por lo cual a pesar de no discriminar la etiopatogenia de la diabetes, permite el diagnóstico de la patología de manera temprana.

El microRNA 146a si bien promueve la apoptosis, al ser el mecanismo desconocido, permite la identificación de la patología, aunque dificulta la sensibilidad de este análisis por su posible aumento en diversas enfermedades.

El microRNA 21 tiene un factor protector ante la apoptosis, y se ha encontrado alterado en la diabetes tipo 2, por lo tanto, podría no ser un buen candidato como marcador en caninos, ya que la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en esta especie es baja.

Un marcador epigenético con proyección en caninos

sería el microRNA 34, pues actúa directamente sobre la proteína bcl2, por ende es uno de los principales causante de la apoptosis de las células beta pancreáticas, relacionándose directamente con la diabetes tipo 1 en ratones y humanos, lo que se pudiera extrapolar a caninos.

Otros métodos de detección temprana de la enfermedad, son estudiar los niveles de microRNA asociados con linfocitos T reguladores presentes en el suero de los pacientes, ya que al ser la diabetes tipo 1 una enfermedad autoinmune, como característica presenta una deficiencia y/o ineficacia de los linfocitos T reguladores.

Los microRNA son de suma importancia en el desarrollo y mantención del sistema inmune, al existir un déficit o alteración de los niveles de ciertos microRNA, se genera una alteración a nivel inmunológico. Un ejemplo de esto es el microRNA 146a que juega un importante rol en la destrucción de células beta pancreáticas, también es un factor importante en la regulación de la homeostasis de los linfocitos T reguladores, pues su deficiencia limita a FOXP3, controlador en la generación y función de las células reguladoras naturales del sistema inmune<sup>27</sup>. Este microRNA es el que se ve más claramente afectado en linfocitos de pacientes que padecen diabetes tipo 1, lo que sería también un marcador adecuado de investigar en diabetes canina.

## Conclusiones

La diabetes canina es una enfermedad endocrina que va en aumento en nuestro país, hasta el día de hoy la etiopatogenia no está del todo clara, pero se sospecha que los mecanismos epigenéticos son uno de los factores de riesgo involucrados en la patología.

Entre los marcadores epigenéticos, los microRNA son de una gran utilidad, ya que a medida que pasa el tiempo se han identificado nuevos microRNA involucrados en diversas enfermedades, entre las cuales se encuentra la diabetes mellitus. Estos microRNA han sido principalmente estudiados en ratones y humanos.

La similitud de la diabetes mellitus en diversos aspectos entre el canino y el humano, como es la distribución de las células  $\beta$  pancreáticas, así como también con la etiopatogenia del diabético tipo 1 humano, hace que el estudio de estos marcadores de microRNA puedan ser extrapolados para su análisis en caninos.

Entre los microRNA que presentan una mayor homología entre las ratones, humanos, y caninos, se encuentran el miRNA 34, microRNA 146a, y el microRNA 10, los que se podrían utilizar como marcadores epigenéticos en diabetes mellitus canina, así como también establecer un modelo para estudiar nuevos microRNA involucrados en esta patología.

## Artículo Original

### Referencias bibliográficas

1. De los Ríos M, Durruty P. 2016. Desarrollo de la diabetología en Chile. *Revista Médica Clínica Las Condes* 27 (2): 135-45.
2. Carrasco E, Ángel B, Codner E, García D, Ugarte F, Bruzzone ME, Pérez F. 2006. Incidencia de diabetes mellitus tipo 1 en Santiago de Chile: análisis por comunas de la Región Metropolitana en el período 2000-2004. *Rev Med Chile* 134: 1258-64.
3. Biourge V, Elliott D, Pibot P. 2008. *Enciclopedia de la Nutrición Clínica Canina*. Royal Canin. Paris, Editorial Aniwa Pub 514 pp.
4. Guptill L, Glickman L, Glickman N. 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: Analysis of veterinary medical data base records (1970-1999). *Vet J* 165: 240-7.
5. Fall T, Hamlin HH, Hedhammar Å, Kämpe O, Egenvall A. 2007. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. *J Vet Intern Med* 21: 1209-16.
6. Fracassi F, Pietra M, Boari A, Aste G, Giunti M, Famigli-Bergamini P. 2004. Breed distribution of canine diabetes mellitus in Italy. *Vet Res Commun* 28: 339-42.
7. González F, Bucarey S, Molina C, Mora C, Moraga C, Moreno N, Moreno L. 2016. Revisión del uso de insulinas sintéticas en caninos como modelo de diabetes mellitus tipo. *Rev Chil Endocrinol Diabetes* 9 (3): 95-9.
8. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. 2007. Overexpression of Micro Ribonucleic Acid 29, Highly Up-Regulated in Diabetic Rats, Leads to Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Endocrinol* 21 (11): 2785-94.
9. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. 2009. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* 27 (5): 351-7.
10. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. 2011. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* 123 (19): 2145-56.
11. Bhaskaran M, Mohan M. 2014. MicroRNAs History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol* 51 (4): 759-74.
12. Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (8): 509-24.
13. Samir M, Pessler F. Small non-coding RNAs associated with viral infectious diseases of veterinary importance: potential clinical applications. *Front Vet Sci* 2016; 3: 22.
14. Ventriglia G, Nigi L, Sebastiani G, Dotta F. 2015. MicroRNAs: Novel Players in the Dialogue between Pancreatic Islets and Immune System in Autoimmune Diabetes. *Biomed Res Int* 2015: 749734.
15. Couto C, Nelson R. *Medicina Interna de pequeños animales*. España, Editorial Elsevier 2010; 1467 pp.
16. Castro AV, Woolcott OO, Iyer MS, Kabir M, Ionut V, Stefanovski D, Paszkiewicz RL. 2015. Increase in visceral fat per se does not induce insulin resistance in the canine model. *Obesity* 23 (1): 105-11.
17. Verkest KR, Rand JS, Fleeman LM, Morton JM, Richards AA, Rose FJ, Whitehead JP. 2011. Distinct adiponectin profiles might contribute to differences in susceptibility to type 2 diabetes in dogs and humans. *Domest Anim Endocrinol* 41 (2): 67-73.
18. Verkest KR, Fleeman LM, Rand JS, Morton JM. 2010. Basal measures of insulin sensitivity and insulin secretion and simplified glucose tolerance tests in dogs. *Domest Anim Endocrinol* 39 (3): 194-204.
19. Cox A, Hess R, Kushner J, Lam C, Rankin M, Shields E, Van Winkle T. 2015. Extreme Beta-Cell Deficiency in Pancreata of Dog with Canine Diabetes. *PLoS ONE* 10: 1-19.
20. Chen H, Lan H, Roukos DH, Cho WC. 2014. Application of microRNAs in diabetes mellitus. *J Endocrinol* 222: 1-10.
21. Feng J, Xing W, Xie L. 2016. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *Int J Mol Sci* 17 (10): 1729.
22. Lima TI, Araujo HN, Menezes ES, Sponton CH, Araujo MB, Bomfim LHM, et al. 2017. Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle. *J Cell Physiol*; 232 (5): 958-66.
23. Hulsmans M, Holvoet P. 2013. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res* 100: 7-18.
24. Ślusarz A, Pulakat L. 2015. The two faces of miR-29. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 16 (7): 480-90.
25. Roggli E, Gattesco S, Caille D, Briet C, Boitard C, Meda P, Regazzi R. 2012. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic beta-cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes* 61: 1742-51.
26. Buza T, Arick M, Wang H, Peterson DG. 2014. Computational prediction of disease microRNAs in domestic animals. *BMC Res Notes* 7 (1): 1.
27. Zheng Y, Wang Z, Tu Y, Shen H, Dai Z, Lin J, Zhou Z. 2015. miR-101a and miR-30b contribute to inflammatory cytokine-mediated  $\beta$ -cell dysfunction. *Lab Invest* 95 (12): 1387-97.