

# **Study of the microRNA expression profile dysregulation by hydrogen peroxide on the retinal pigment epithelium cells: role of miR-205-5p**

## **Estudio del perfil de expresión de microRNAs desregulados por el peróxido de hidrógeno en las células de epitelio pigmentario de la retina: papel del miR-205-5p.**

### **Introducción**

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes (21-25 nucleótidos) capaces de regular la expresión de uno o más mRNA<sup>1-3</sup>. Los miRNAs regulan la traducción de proteínas al unirse de forma complementaria al mRNA diana capaz de regular diferentes procesos incluyendo proliferación celular<sup>4</sup>, supervivencia celular<sup>5</sup>, inflamación<sup>6</sup>, angiogenesis<sup>7</sup> y estrés oxidativo<sup>8</sup>. Los miRNAs inducen la degradación o represión del mRNA diana. Diferentes campos clínicos se centran en el estudio de los miRNAs para el diagnóstico o ser propuestos como posibles agentes terapéuticos<sup>9,10</sup>.

La mayoría de las células son capaces de liberar vesículas extracelulares (EVs), que pueden interactuar con las células vecinas o incluso con células alejadas<sup>11,12</sup>. Las EVs son capaces de transportar en su interior material genético y proteínas, convirtiéndolas en elementos clave para la comunicación entre células. Existen EVs de diferentes tamaños, entre las que se encuentran las de menor tamaño denominadas pequeñas EVs (small EVs: sEVs de sus siglas en inglés) con un diámetro menor a 100 nm<sup>13</sup>. Entre el material genético que transportan las sEVs se pueden encontrar miRNAs<sup>14</sup>, cuya expresión varía en función del origen celular y el estado homeostático de la célula de procedencia<sup>15</sup>.

La degeneración macular asociada con la edad (AMD) y la retinopatía diabética (RD) son alteraciones de la retina que llevan a la pérdida de la visión. El epitelio pigmentario de la retina (RPE) es esencial para la visión, de hecho está bien documentado que el estrés oxidativo generado en el RPE y la neovascularización de la coroides están relacionados con el origen de estas alteraciones<sup>16,17</sup>. Estudios recientes analizan el perfil de expresión de los miRNA asociados a la progresión de la degeneración de la retina<sup>3,18-21</sup> ya que, uno de los principales retos del campo de la oftalmología es la identificación de marcadores tempranos para la AMD y RD con la intención de prevenir su evolución clínica.

El factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF, de sus siglas en inglés) es uno de los factores angiogénicos más importantes, involucrado en diferentes tipos de cáncer<sup>22</sup>. De hecho, las terapias anti-VEGF están extensamente utilizadas como terapia contra el cáncer<sup>23-25</sup>. La sobreexpresión de VEGFA está asociada con el incremento de los procesos neovasculares y por tanto con la progresión de las alteraciones asociadas a la retina como la AMD<sup>26</sup> y la RD<sup>27</sup>.

Por otra parte, el estrés oxidativo es uno de los factores de riesgo que subyace a la progresión de alteraciones de la retina<sup>28,29</sup>. Por diferentes razones (luz, alta tasa metabólica, interacción celular...) el RPE está continuamente expuesto a estrés oxidativo<sup>30,31</sup>, incrementando la liberación de factores angiogénicos, como el VEGF<sup>17,32,33</sup>, promoviendo la formación de nuevos vasos sanguíneos<sup>34-36</sup>. El estrés oxidativo está relacionado con los desordenes de la retina y la angiogénesis mediada por el VEGF juega un papel importante en la evolución de estas alteraciones<sup>37,38</sup>.

Tanto la RD y la AMD están directamente relacionadas con los procesos neovasculares y el estrés oxidativo<sup>28,29,39</sup>. Además, las sEVs juegan un papel importante en la comunicación celular y en el mantenimiento de la homeostasis visual. La exposición a estrés oxidativo aumenta la liberación de sEVs por parte del RPE. Diferentes estudios analizan el perfil de expresión de miRNAs relacionados con la progresión de enfermedades relacionadas con la degeneración de la retina. Sin embargo, pocos analizan los perfiles de expresión de miRNAs contenidos en las sEVs, que podrían ser de gran utilidad para identificar marcadores tempranos circulantes o incluso para explicar algunos de los mecanismos responsables de la progresión de la degeneración de la retina.

## **Objetivos**

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la identificación de patrones de expresión de miRNAs en las células ARPE-19 y en las sEVs liberadas bajo condiciones de estrés oxidativo con la intención de identificar marcadores tempranos para la degeneración de la retina. Con la intención de alcanzar el objetivo principal se plantean los siguientes objetivos específicos:

## **Aportaciones fundamentales de la tesis doctoral**

En la presente tesis doctoral se analizaron por primera vez los perfiles de expresión de los miRNAs de las células ARPE-19 y de las sEVs liberadas por las ARPE-19 bajo condiciones oxidantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Observándose un perfil de expresión de miRNAs diferente entre células ARPE-19 sometidas a estrés oxidativo y control y entre las sEVs liberadas por estas.

Entre los 7 miRNA de las células ARPE-19 desregulados se encontró el miR-205-5p cuya expresión estaba modulada por la exposición a estrés oxidativo. Diferentes estudios señalan al miR-205-5p como regulador de la expresión del VEGFA<sup>22,40,41</sup>. Concretamente, la expresión del miR-205-5p se ve reducida tras la exposición a estrés oxidativo favoreciendo la expresión del VEGFA. Estos cambios en la expresión del miR-205-5p y VEGFA debidos al estrés oxidativo se reestablecen tras la administración de antioxidante N-acetylcisteína, confirmando la sensibilidad del miR-205-5p a los estímulos oxidativos, tal y como confirman otros estudios<sup>42</sup> y su implicación en la progresión de las alteraciones de la retina.

La liberación de sEVs está estimulada por el estrés oxidativo. Sorprendentemente, la carga de miRNAs es menor en las sEVs liberadas por ARPE-19 sometidas a estrés oxidativo que en las sEVs liberadas por células control. De todos los miRNAs analizados en las sEV, solamente 2 de ellos estaban significativamente infraexpresados. Entre las propiedades más importantes de estos miRNAs se encuentra su capacidad de regular dianas vasculogénicas.

Además, se observó que las sEVs procedentes de ARPE-19 sometidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eran capaces de inducir cambios en las células sanas aumentando el estrés oxidativo y disminuyendo su viabilidad celular. Por si solas estas sEVs son capaces de aumentar la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Los miRNAs desregulados sugieren su implicación en los desordenes de la retina tras la exposición a estrés oxidativo. Entre los miRNAs desregulados, el miR-205-5p se propone como un candidato contra los procesos proliferativos relacionada con las alteraciones de la retina. Por otra parte, nuestros resultados demuestran la influencia de las sEVs en las células vecinas y su participación en la progresión de los desordenes de la retina.

## **Conclusiones**

La exposición a concentraciones superiores a 600  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce estrés oxidativo en las células ARPE-19. Tras el análisis de los perfiles de expresión de miRNAs de las células ARPE-19 se observa una represión generalizada tras la exposición a 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Concretamente, el hsa-let-7a, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-521, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-205-5p y hsa-miR302c-3p se encuentran reprimidos en las células ARPE-19 sometidas a estrés oxidativo.

Por otra parte, la exposición a 600  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la liberación de sEVs de forma significativa respecto a las células control. Paradójicamente, el contenido de miRNAs es significativamente más bajo en las sEVs liberada por ARPE-19 tratadas con 600  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que en las células control. Los miRNAs detectados en el interior de las sEVs son el hsa-miR-302a-3p y hsa-miR-122-5p.

El análisis de enriquecimiento de dianas muestra que los miRNAs desregulados en las células ARPE-19 están relacionados con el ciclo celular, las uniones adherentes, la ruta de señalización p53, la ruta de señalización del HIF-1 y rutas relacionadas con el cáncer. Sin embargo, los miRNAs desregulados en las sEVs están relacionados con la regulación de la ruta TGF-beta, FoxO y el ciclo celular.

Entre los miRNAs desregulados en las células ARPE-19 destaca el miR-205-5p cuya expresión esta reducida bajo la exposición a 600  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto en células maduras como inmaduras. Este miRNA es sensible al estrés oxidativo ya que su expresión se restablece tras la administración del antioxidante N-acetylcysteina. Las dianas identificadas del miR-205-5p son

capaces de regular de forma positiva la migración celular y la angiogénesis. Una de las dianas más importantes del miR-205-5p es el VEGFA, cuya expresión está regulada no solo por el miR-205-5p sino también por el estrés oxidativo. La sobreexpresión del miR-205-5p disminuye la formación de tubos de células HUVEC al inhibir la expresión del VEGFA.

Por último, el estudio del efecto de las sEVs liberadas por ARPE-19 sometidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células vecinas mostró un aumento del estrés oxidativo y una disminución de la viabilidad celular en las células sanas. Además, se observó la capacidad de estas sEVs de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos al promover la expresión del VEGFA.

El presente trabajo supone una aproximación completamente nueva en el campo de la oftalmología ya que es la primera vez que se identifican miRNA de regulación vascular en el epitelio pigmentario. Este trabajo supone un primer paso para una novedosa terapia basada en el uso de miRNA para frenar la neovascularización en el ojo.

## Referencias

1. Kumar, S., Vijayan, M., Bhatti, J. S. & Reddy, P. H. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. in *Progress in molecular biology and translational science* **146**, 47–94 (2017).
2. Bhaskaran, M. & Mohan, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet. Pathol.* **51**, 759–74 (2014).
3. Ren, C. *et al.* Circulating miRNAs as potential biomarkers of age-related macular degeneration. *Cell. Physiol. Biochem.* **41**, 1413–1423 (2017).
4. Wang, L. *et al.* MicroRNA-182 Suppresses HGF/SF-Induced Increases in Retinal Pigment Epithelial Cell Proliferation and Migration through Targeting c-Met. *PLoS One* **11**, e0167684 (2016).
5. Tasharrofi, N. *et al.* Survival Improvement in Human Retinal Pigment Epithelial Cells via Fas Receptor Targeting by miR-374a. *J. Cell. Biochem.* **118**, 4854–4861 (2017).
6. Hao, Y., Zhou, Q., Ma, J., Zhao, Y. & Wang, S. miR-146a is Upregulated During Retinal Pigment Epithelium (RPE)/Choroid Aging in Mice and Represses IL-6 and VEGF-A Expression in RPE Cells. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* **7**, (2016).
7. Zhou, Q. *et al.* Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 8287–92 (2011).
8. Lin, H. *et al.* Effect of miR-23 on Oxidant-Induced Injury in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **52**, 6308 (2011).
9. Elbay, A., Ercan, Ç., Akbaş, F., Bulut, H. & Ozdemir, H. Three new circulating microRNAs may be associated with wet age-related macular degeneration. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1–7 (2019). doi:10.1080/00365513.2019.1637931

10. Ménard, C. *et al.* MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget* **7**, 19171–19184 (2016).
11. Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G. & Geraci, F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *AJP Cell Physiol.* **306**, C621–C633 (2014).
12. Février, B. & Raposo, G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 415–421 (2004).
13. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. vesicles* **7**, 1535750 (2018).
14. Creemers, E. E., Tijssen, A. J. & Pinto, Y. M. Circulating MicroRNAs. *Circ. Res.* **110**, 483–495 (2012).
15. Biasutto, L., Chiechi, A., Couch, R., Liotta, L. A. & Espina, V. Retinal pigment epithelium (RPE) exosomes contain signaling phosphoproteins affected by oxidative stress. *Exp. Cell Res.* **319**, 2113–2123 (2013).
16. Kim, J. M. *et al.* Responses of Types 1 and 2 Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment: Optical Coherence Tomography Angiography Analysis. *Semin. Ophthalmol.* **34**, 168–176 (2019).
17. Dong, A. *et al.* Oxidative stress promotes ocular neovascularization. *J. Cell. Physiol.* **219**, 544–552 (2009).
18. Wang, S., Koster, K. M., He, Y. & Zhou, Q. miRNAs as potential therapeutic targets for age-related macular degeneration. *Future Med. Chem.* **4**, 277–287 (2012).
19. Romano, G. L. *et al.* Retinal and Circulating miRNAs in Age-Related Macular Degeneration: An In vivo Animal and Human Study. *Front. Pharmacol.* **8**, 168 (2017).
20. Szemraj, M. *et al.* Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of AMD. *Med. Sci. Monit.* **21**, 2734–2742 (2015).
21. Berber, P., Grassmann, F., Kiel, C. & Weber, B. H. F. F. An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology. *Mol. Diagnosis Ther.* **21**, 31–43 (2017).
22. Yue, X. *et al.* MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A. *Oncol. Rep.* **27**, 1200–6 (2012).
23. Dinç, E., Ayaz, L. & Kurt, A. H. Effects of Bevacizumab, Ranibizumab, and Aflibercept on MicroRNA Expression in a Retinal Pigment Epithelium Cell Culture Model of Oxidative Stress. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **34**, 1–8 (2018).
24. CATT Research Group *et al.* Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-

- Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1897–1908 (2011).
25. Frezzetti, D. *et al.* VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 959–966 (2017).
  26. Penn, J. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **27**, 331–371 (2008).
  27. Li, E.-H., Huang, Q.-Z., Li, G.-C., Xiang, Z.-Y. & Zhang, X. Effects of miRNA-200b on the development of diabetic retinopathy by targeting *VEGFA* gene. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20160572 (2017).
  28. Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D. & Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **45**, 115–34 (2000).
  29. Tangvarasittichai, O. & Tangvarasittichai, S. Oxidative Stress, Ocular Disease and Diabetes Retinopathy. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 4726–4741 (2019).
  30. Jarrett, S. G. & Boulton, M. E. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* **33**, 399–417 (2012).
  31. Shaw, P. X. *et al.* Oxidative stress, innate immunity, and age-related macular degeneration. *AIMS Mol. Sci.* **3**, 196–221 (2016).
  32. Marneros, A. G. Increased VEGF-A promotes multiple distinct aging diseases of the eye through shared pathomechanisms. *EMBO Mol. Med.* **8**, 208–231 (2016).
  33. Marazita, M. C., Dugour, A., Marquioni-Ramella, M. D., Figueroa, J. M. & Suburo, A. M. Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol.* **7**, 78–87 (2016).
  34. Atienzar-Aroca, S. *et al.* Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 1457–1466 (2016).
  35. Simão, S., Santos, D. F. & Silva, G. A. Aliskiren decreases oxidative stress and angiogenic markers in retinal pigment epithelium cells. *Angiogenesis* **20**, 175–181 (2017).
  36. Atienzar-Aroca, S. *et al.* Role of retinal pigment epithelium-derived exosomes and autophagy in new blood vessel formation. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 5244–5256 (2018).
  37. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603–1616 (2010).
  38. Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R. & Liaudet, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.* **395**, 203–30 (2014).
  39. Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews* **85**,

- 845–881 (2005).
40. Zhao, X. *et al.* MicroRNA-205 is downregulated in hepatocellular carcinoma and inhibits cell growth and metastasis via directly targeting vascular endothelial growth factor A. *Oncol. Lett.* **16**, 2207–2214 (2018).
  41. Cao, W., Zhao, Y., Wang, L. & Huang, X. Circ0001429 regulates progression of bladder cancer through binding miR-205-5p and promoting VEGFA expression. *Cancer Biomarkers* 1–13 (2019). doi:10.3233/CBM-182380
  42. Patil, K. S. *et al.* A Proteomics Approach to Investigate miR-153-3p and miR-205-5p Targets in Neuroblastoma Cells. *PLoS One* **10**, e0143969 (2015).