

Terapias cardiacas avanzadas con microRNAs basadas en nanoestructuras de DNA

Natalia Hernández-Bellido^{1,2*}, Alejandro Postigo^{3*}, Carol Orrite^{1,2,3}, Elisa Garrido-Huésca^{1,2}, Laura García Mendivil^{1,2}, Esther Pueyo^{1,2,4}, Silvia Hernández-Ainsa^{3,5}, Laura Ordovás^{1,2,5}

¹Biomedical Signal Interpretation and Computational Simulation group (BSICoS)
Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor, s/n, 50018, Zaragoza, Spain. Tel. +34-976762707, e-mail: nhbellido@unizar.es

²BSICoS group, IIS Aragón, Zaragoza, Spain

³Liquid Crystals and Polymers group (CLIP)
Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), Centro superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-
Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor, s/n, 50018, Zaragoza, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería,
Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

⁵Fundación ARAID

*Equally contributed (nhbellido@unizar.es, apostigo@unizar.es)

Resumen

La desregulación de **microRNAs (miRNAs)** se asocia con múltiples procesos incluidos el envejecimiento cardíaco y las enfermedades cardiovasculares (ECV). Por ello, se posicionan como prometedoras dianas terapéuticas. Para superar limitaciones en su uso como tal, se propone la creación de **nanoestructuras de DNA (DNS)** biocompatibles para crear terapias efectivas y seguras.

Objetivo

La baja estabilidad de los miRNAs y sus efectos fuera de diana *in vivo* necesita de sistemas de entrega avanzados que superen estas barreras para desbloquear su potencial terapéutico. Explotando las ventajas de la nanotecnología, el principal objetivo de este trabajo es demostrar la capacidad de las DNS para entregar terapias miRNA en cardiomiocitos humanos para su futuro uso en el tratamiento de dolencias cardiacas.

Materiales y métodos

El grupo BSICoS identificó la sobreexpresión de MIR24-2 con la edad en el ventrículo izquierdo humano y la interacción de miR-24-2-5p con genes relacionados con la función cardíaca, como *SERCA2*¹. Diferentes versiones de DNS (N1 y N2) han sido diseñadas y generadas por autoensamblamiento de cadenas de DNA: Y1, unidad de construcción que contiene la secuencia de captura miR24-2-5p

(antimiR24-2-5p); Y2, unidad de bloqueo y L3, unidad de unión de Y1/Y2) (Figura 1).

La caracterización físico-química de las DNS se ha llevado a cabo para determinar su capacidad de autoensamblado, tamaño, morfología y estabilidad térmica, análisis de desnaturalización, microscopía de fuerza atómica (AFM) y Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

Biológicamente, las DNS han sido también estudiadas *in vitro*, mediante geles de poliacrilamida, y en cultivos de HEK293 y cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas (iCM-hiPSC) para evaluar su citotoxicidad y capacidad de internalización.

Resultados

Los resultados muestran que las DNS se ensamblan correctamente en transportadores de tamaño superior a sus componentes (Figura 2).

Además, *in vitro*, las DNS muestran estabilidad térmica a temperatura fisiológica, estabilidad adecuada en suero y desensamblado específico por miR-24-2-5p (Figura 3).

En cultivos HEK293 y cardiomiocitos derivados de iPSC, las DNS no muestran citotoxicidad, demostrando su biocompatibilidad *in vitro*.

Finalmente, las DNS fueron eficientemente internalizadas por HEK293, aunque la capacidad de internalización en cardiomiocitos es significativamente menor (Figura 4).

Conclusiones

Se han creado y caracterizado DNS anti-miR-24-2-5p que capturan miR-24-2-5p *in vitro*. Las nanoestructuras son internalizadas en cardiomiocitos, aunque con menor eficiencia que en HEK293. Nuestros resultados indican que estas estructuras son posibles transportadores para entregar terapias miRNAs en células cardiacas humanas *in vitro*, pero las diferencias observadas entre tipos celulares sugieren la necesidad de utilizar estrategias adicionales para promover una entrega más eficiente y específica de las DNS *in vivo* en células cardiacas primarias.

Referencias

- Ramos-Marquès, E. *et al.* Chronological and biological aging of the human left ventricular myocardium: Analysis of microRNAs contribution. *Aging Cell* **20**, (2021).

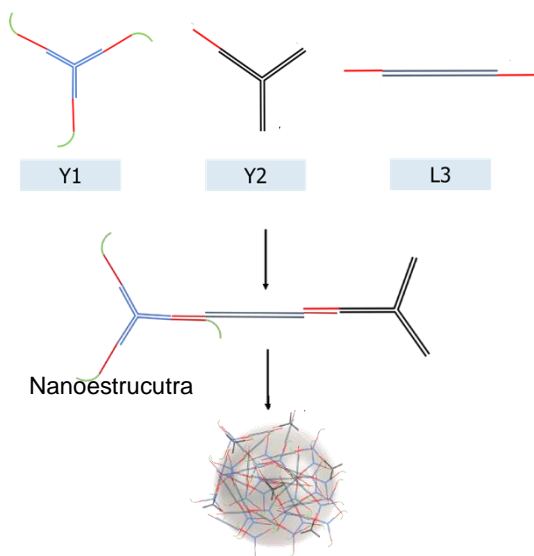


Fig 1. Formación de las nanoestructuras de DNA a partir de las unidades de construcción.

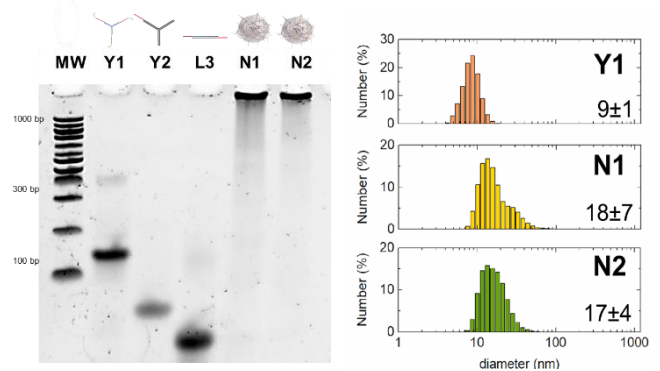


Fig 2. A) Gel PAGE de las unidades de DNA (Y1, Y2, L3) y de las nanoestructuras (N1 y N2). B) Medidas de DLS para analizar los tamaños de Y1, N1 y N2.

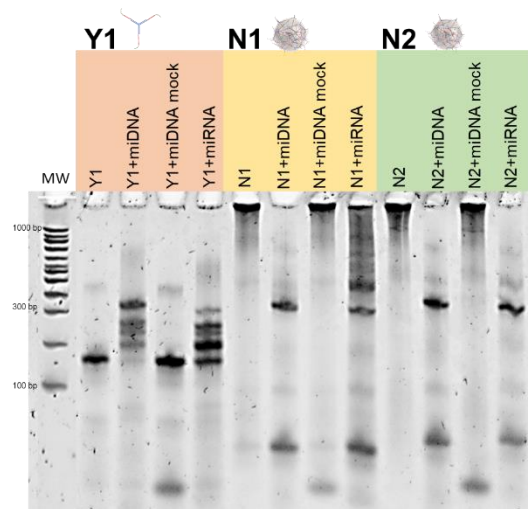


Fig 3. Gel de electrophoresis de la captura específica del miRNA por las NDs.

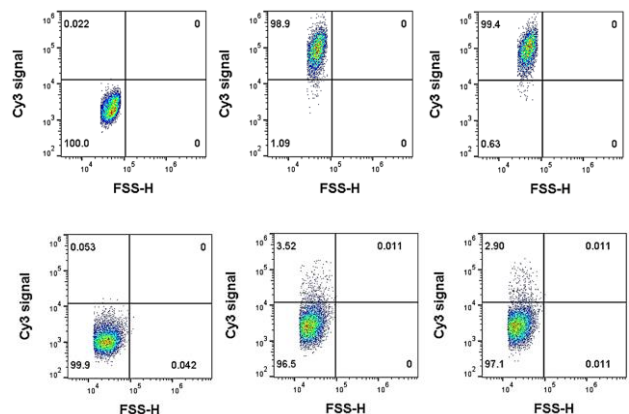


Fig 4. Internalización de las nanoestructuras (marcadas con el fluoróforo Cy3) en células HEK293 e iCM-hiPSC mediante citometría de flujo.