

Desarrollo de nanotransportadores de DNA de vanguardia con capacidad cardioregenerativa utilizando el potencial terapéutico de los microRNAs

Marcos Sánchez Barat^{a,b}, Natalia Hernández-Bellido^{a,b}, Alejandro Postigo^c, Marina Ripalda-Paredes, Silvia Hernández-Ainsa,^{c,d} Laura Ordoñas^{a,b,d}

^a Grupo BSICoS, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), 50009 Zaragoza, Spain

^b Grupo BSICoS, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IISA), 50009 Zaragoza, Spain

^c Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), 50009 Zaragoza, Spain

^d Fundación ARAID. Gobierno de Aragón, 50018 Zaragoza, Spain.

Tel. +34 681 123 186

e-mail: m.sanchez@unizar.es

RESUMEN

El infarto de miocardio, si no es mortal, conduce a un remodelado del tejido cardíaco que evoluciona hacia la insuficiencia cardíaca puesto que el corazón carece de capacidad regenerativa. Actualmente no existe una terapia regenerativa, pero se han descrito microRNAs (miR), por ejemplo, el miR-199a-3p, que la promueven a través de la estimulación la proliferación de cardiomiocitos. En este trabajo se han desarrollado y caracterizado nanoestructuras de DNA (DNS) capaces de transportar el miR-199a-3p, internalizarse de manera eficiente en la célula y liberar el miR de manera funcional utilizando la propia maquinaria de la célula. Este trabajo sienta las bases para futuros desarrollos de la terapia cardioregenerativa basada en miR.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en los países occidentales. El infarto de miocardio (IM) representa casi el 50% de estas muertes. Si no es letal, el daño miocárdico se remodela pudiendo evolucionar a insuficiencia cardíaca (IC). Hasta la fecha, no existe cura para estos procesos crónicos o tratamientos capaces de inducir la regeneración cardíaca post-IM. Además, no se ha desarrollado ninguna terapia biológica avanzada para tales fines (1). La terapia con miRs (con imitadores o anti-miRs) ha mostrado efectos curativos en la enfermedad (2–4), incluido el tratamiento post-IM en grandes animales (3,4). En particular, el miR-199a-3p indujo la regeneración cardíaca en modelos de IM de ratón, rata y cerdo

promoviendo la proliferación de cardiomiocitos (CM) (2,5,6). Sin embargo, la terapia con miRNAs tiene una serie de obstáculos asociados como la falta de estabilidad en circulación o el direccionamiento de la terapia al órgano diana. Para solucionar este problema se han desarrollado vectores no virales basados en liposomas o partículas poliméricas de diversa naturaleza. A este respecto, el uso de DNA para la preparación de nanoestructuras biocompatibles es una alternativa emergente y prometedora ya que puede albergar una gran cantidad de microRNAs en su estructura, protegiéndolos de la degradación en circulación sanguínea y ser funcionalizadas para dirigirse de forma específica a un órgano determinado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las nanoestructuras de DNA (DNS) se han construido mediante 3 métodos diferentes: autoensamblaje de la construcción de unión de tres vías del ADN con conectores complementarios basados en DNA (7), mediante la técnica de “Rolling Circle Amplification” (RCA) y mediante “Rolling Circle Transcription” (RCT) (8,9). Las secuencias de DNA fueron racionalmente diseñadas para permitir la carga de grandes cantidades del miR terapéutico mientras se logra un tamaño adecuado para la internalización celular.

Se ha creado una esponja para evaluar la funcionalidad del DNS *in vitro*, es decir, un vector reportero luciferasa que contiene secuencias anti-miR-199a-3p.

La caracterización estructural de las DNS se ha realizado mediante electroforesis en gel

(GE), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). En las células, la capacidad de internalización de las DNSs (marcadas con el fluoróforo Cy3 y analizadas mediante citometría de flujo) y la liberación intracelular de miR mediada por RNasa H (ensayos de indicador de luciferasa) ha sido probada *in vitro* con células Hek293.

Se han diseñado y probado alternativas en el diseño de las DNS para conferirles más resistencia en condiciones fisiológicas y solucionar problemas de degradación de miR (resistencia a nucleasas).

Para habilitar la capacidad de las DNS de atravesar barreras endoteliales se estudia utilizar aptámeros transendoteliales. Para ello, se ha creado y desarrollado un modelo de barrera endotelial.

RESULTADOS

Se han creado y caracterizado nanoestructuras que albergan el miR-199a-3p. Poseen un diámetro en disolución aproximado de 70 nm de en el caso de las desarrolladas por autoensamblaje de Y-DNA con conectores de RNA, y sobre 150 nm y 300 nm en las preparadas por RCA y por RCT, respectivamente. Las DNSs internalizan de modo efectivo en Hek293 con casi el 100% de células cargadas de nanoestructuras. El miR se libera activamente a través de la acción de la RNasa H intracelular y ejerce inhibición de la actividad luciferasa, demostrando así su correcto procesamiento por parte de la maquinaria celular y la interacción con su secuencia diana. Además, se han desarrollado estrategias de aumento de la estabilidad de los miRs, y por tanto de las DNS, en condiciones fisiológicas. Por último, se ha desarrollado satisfactoriamente un modelo de barrera endotelial para el ensayo de la capacidad transcitótica de aptámeros.

CONCLUSIONES

En conclusión, hemos creado un nuevo nanotransportador para la entrega de miR-199a-3p funcional en un sistema celular modelo. Además, hemos establecido un modelo de barrera endotelial que permitirá la realización de estudios futuros de transferencia de DNS a través de los vasos sanguíneos, factor limitante de su potencial eficacia *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Packer M. The Future Treatment of Heart Failure? *Eur Heart J* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 May 30];39(1):5–7. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehx745>
2. Eulalio A, Mano M, Ferro MD, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nat* 2012 4927429 [Internet]. 2012 Dec 5 [cited 2024 May 30];492(7429):376–81. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11739>
3. Hinkel R, Ramanujam D, Kaczmarek V, Howe A, Klett K, Beck C, et al. AntimiR-21 Prevents Myocardial Dysfunction in a Pig Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(15):1788–800.
4. Bellera N, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Ferret E, Asín MA, Gonzalez-Alujas MT, et al. Single intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse infarct remodeling. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2014 Sep 19 [cited 2024 May 30];3(5). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/JAHA.114.000946>
5. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs - Oligonucleotide Therapeutics Society [Internet]. [cited 2024 May 30]. Available from: <https://www.oligotherapeutics.org/microrna-therapy-stimulates-uncontrolled-cardiac-repair-after-myocardial-infarction-in-pigs/>
6. Yang H, Qin X, Wang H, Zhao X, Liu Y, Wo HT, et al. An in Vivo miRNA Delivery System for Restoring Infarcted Myocardium. *ACS Nano* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 May 30];13(9):9880–94. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.9b03343>
7. Li J, Zheng C, Cansiz S, Wu C, Xu J, Cui C, et al. Self-assembly of DNA nanohydrogels with controllable size and stimuli-responsive property for targeted gene regulation therapy. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2015 Feb;137(4):1412–5. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja512293f>
8. Jiang S, Ge Z, Mou S, Yan H, Fan C. Designer DNA nanostructures for therapeutics. *Chem*. 2021 May 13;7(5):1156–79.
9. Chen X, He X, Gao R, Lan X, Zhu L, Chen K, et al. Aptamer-Functionalized Binary-Drug Delivery System for Synergetic Obesity Therapy. *ACS Nano* [Internet]. 2022 Jan 25 [cited 2024 May 30];16(1):1036–50. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.1c08690>

AGRADECIMIENTOS

Proyecto LMP128_21, Grupos de Investigación T39_23R y E47_23R y Contrato Predoctoral CPB_14_22 financiados por el Gobierno de Aragón

Proyectos PID2022-139859OB-I00 financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y ERDF A way of making Europe; PID2020-113003GB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033; PCI2023-143438, yPCI2023-143390 financiados por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y cofinanciados por la UE. PRTR-C17.I1 financiado por MCIN con fondos Next Generation EU de la UE.

Servicios Científico Técnicos del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA): Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional, Servicio de Microscopía e Imagen y Servicio de Separación Celular y Citometría

Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza (SAI).