



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Desarrollo y caracterización de nanotransportadores de DNA para terapias miRNA cardiacas

Development and characterization of DNA nanocarriers for cardiac
miRNA therapies

Autora

Carolina Orrite Muñoz

Máster en Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias - Departamento de Química Orgánica

Escuela de Ingeniería y Arquitectura - Departamento de Ingeniería
Electrónica y Comunicaciones

Universidad de Zaragoza

Curso 2020-2021

Directoras: Silvia Hernández Ainsa

Laura Ordovás Vidal

Ponente: Inmaculada Martín Burriel

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AFM	Microscopía de fuerza atómica
anti-microRNA	antimiR
AVV	Virus adenoasociados
BSICoS	<i>Biomedical Signal Interpretation and Computational Simulation group</i>
CLSM	Microscopio confocal láser de barrido
Dh	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dsDNA	DNA de hebra doble
ECVs	Enfermedades cardiovasculares
iCM	Cardiomiocitos derivados de iPSC
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas
miRNA	MicroRNA
mRNA	RNA mensajero
NDs	Nanoestructuras de DNA
nts	Nucleótidos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ssDNA	DNA de hebra sencilla
Tm	Temperatura de desnaturalización

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
2.1 El corazón: enfermedades cardiovasculares y envejecimiento cardiaco	7
2.2 Modelado <i>in vitro</i> de la patofisiología cardiaca humana con iPSC	8
2.3 Terapias miRNA en las enfermedades cardiacas	8
2.3.1 MicroRNAs: biogénesis y función	9
2.3.2 MicroRNAs relacionados con las enfermedades cardiovasculares	10
2.3.3 Terapias miRNA: Miméticos de miRNA y antimirs.....	12
2.3.4 Estrategias de transporte de la terapia RNA.....	13
2.4 Nanotecnología del DNA	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
3.1 Hipótesis	17
3.2 Objetivo general	17
3.3 Objetivos específicos del trabajo	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Diseño y preparación de las nanoestructuras	18
4.1.1 Diseño de los nanotransportadores de DNA	18
4.1.2 Preparación de las nanoestructuras por auto-ensamblado	18
4.2 Caracterización físico-química de las nanoestructuras	19
4.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	19
4.2.2 Dispersión de la luz dinámica (DLS)	19
4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	19
4.2.4 Determinación de la estabilidad térmica mediante espectrofotometría.....	20
4.3 Caracterización biológica de las nanoestructuras	20
4.3.1 Caracterización de la estabilidad en suero mediante PAGE	20
4.3.2 Estudio de la capacidad de captura del miRNA mediante PAGE	21
4.4 Caracterización <i>in vitro</i> de la actividad y citotoxicidad	22
4.4.1 Cultivo celular	22
4.4.2 Citometría de flujo	23
4.4.3 Microscopía confocal (CLSM) y microscopía de fluorescencia	24
4.4.4 Ensayos de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR).....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
5.1 Diseño de los nanotransportadores	26
5.2 Caracterización físico-química de las nanoestructuras	31
5.2.1 Análisis de la capacidad de ensamblado	31
5.2.2 Estudio del tamaño y morfología	33

5.2.4 Determinación de la estabilidad térmica	35
5.3 Caracterización biológica de las nanoestructuras	37
5.3.1 Caracterización de la estabilidad en medio celular	37
5.3.2 Estudio de la capacidad de captura del miRNA	39
5.4 Determinación <i>in vitro</i> de la actividad y citotoxicidad de las nanoestructuras.....	41
5.4.1 Estudio del nivel de marcaje de los nanotransportadores e internalización celular ...	41
5.4.2 Ensayos de viabilidad.....	45
5.4.3 Estudio de la expresión génica de <i>ACTN2</i> y <i>SERCA2a</i>	46
5. CONCLUSIONES	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	52
7. MATERIAL SUPLEMENTARIO	58

1. RESUMEN

Las **enfermedades cardiovasculares (ECVs)** son la primera causa de mortalidad mundial, y la **edad** es un factor de riesgo principal en su aparición. Debido a que los **microRNAs (miRNAs)** están implicados en el control de distintos procesos biológicos como procesos fisiopatológicos y envejecimiento, se les considera potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de distintas enfermedades, incluidas las ECVs.

Estudios recientes han demostrado la potencial aplicación de las **nanoestructuras de DNA (NDs)** como elementos novedosos en las terapias de RNA, aprovechando su alta programabilidad y biocompatibilidad. Estas estructuras muestran grandes ventajas ya que son biocompatibles, biodegradables, presentan cierta estabilidad en condiciones fisiológicas, son capaces de encapsular fármacos y dirigirlos al sitio diana y pueden entrar en las células por endocitosis sin necesidad de mediadores para la transfección.

En base a estos antecedentes y la descripción del aumento de **miR-24-2-5p** con la edad en el corazón humano y su papel en la regulación de genes que participan en la función cardíaca, se diseñaron y caracterizaron dos NDs con segmentos anti-miR-24-2-5p. Se hipotetiza que estas NDs tienen la capacidad de entregar terapias miRNA en miocitos humanos y, en concreto, modular la cantidad del miRNA miR-24-2-5p y su potencial efecto pro-envejecimiento a nivel funcional en el corazón.

Las NDs diseñadas fueron estables en condiciones fisiológicas, biodegradables, capaces de internalizarse tanto en células HEK293 como en cardiomiocitos humanos, y no presentaron toxicidad celular. Estos resultados las sitúan como potenciales herramientas capaces de hacer progresar las terapias miRNA cardíacas.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of mortality worldwide, and age is a main risk factor for their appearance. As **microRNAs (miRNAs)** are involved in the control of different biological processes such as pathophysiological and aging processes, they are considered potential therapeutic targets in the treatment of different diseases, including CVDs.

Recent studies have demonstrated the potential application of **DNA nanostructures (NDs)** as novel elements in RNA therapies, taking advantage of their high programmability and biocompatibility. These structures show great advantages since they are biocompatible, biodegradable, have certain stability under physiological conditions, are capable of encapsulating drugs and directing them to the target site, and can enter cells by endocytosis without the need for transfection mediators.

Based on these antecedents and the description of the **miR-24-2-5p** increase with age in the human heart and its role in the regulation of genes that take part in cardiac function, two NDs with anti-miR-24-2-5p segments were designed and characterized. We hypothesize that these NDs can deliver miRNA therapies in human myocytes and, specifically, modulate the amount of miR-24-2-5p miRNA and its potential pro-aging effect at the functional level in the heart.

The designed NDs were stable under physiological conditions, biodegradable, capable of being internalized in both HEK293 cells and human cardiomyocytes, and did not show cellular toxicity. These results place them as potential tools capable of advancing cardiac miRNA therapies.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 El corazón: enfermedades cardiovasculares y envejecimiento cardiaco

Las **enfermedades cardiovasculares (ECVs)** son la primera causa de mortalidad en el mundo, con un número estimado de 18,5 millones de fallecimientos cada año, lo que representa el 31% de las muertes registradas.¹ La edad es un importante factor de riesgo en las enfermedades cardiacas, puesto que aproximadamente dos tercios de las muertes por ECVs se corresponden a individuos mayores de 70 años.² Por ello, es necesario comprender los mecanismos del envejecimiento cardiaco, para poder establecer medidas de prevención y tratamiento adecuadas y así aumentar no solo la longevidad de la población sino también su salud y bienestar.

El envejecimiento es un proceso de degeneración a varios niveles: del organismo, celular y molecular. El deterioro funcional del corazón que desemboca en fallo cardiaco es la principal manifestación del **envejecimiento cardiaco**.² Los cambios que se producen en el corazón durante su envejecimiento dan lugar a una disminución del rendimiento bioquímico y fisiológico del órgano, que afectan a su función y lo predisponen a sufrir de patologías.³

Los tratamientos disponibles actualmente para tratar cardiomiopatías se basan en paliar los síntomas de la enfermedad mediante la administración de anticoagulantes, analgésicos y medicamentos antiinflamatorios entre otros, y en los casos más severos se recurre al trasplante⁴. En la actualidad se está desarrollando la terapia de regeneración cardiaca, que se basa en reestablecer la función del corazón con el objetivo de eliminar completamente la enfermedad.⁵ Esta terapia emplea varias aproximaciones como las terapias basadas en el trasplante de células,^{6,7} la reprogramación directa de los fibroblastos cardiacos^{8,9}, la terapia génica mediada por virus adenoasociados (AAVs)¹⁰ y la inducción endógena de la proliferación de los cardiomiocitos.¹¹ Esta última estrategia se basa en la modulación de los genes reguladores del ciclo celular de los cardiomiocitos, bien mediante factores de crecimiento, regulación de vías de señalización o **regulación mediada por microRNA** (miRNA).⁵

La regulación por miRNAs es la aproximación que se va a utilizar en este trabajo para desarrollar terapias cardiacas avanzadas vehiculizadas con nanoestructuras de DNA (NDs).

2.2 Modelado *in vitro* de la patofisiología cardíaca humana con iPSC

El estudio de las ECVs y el papel que desempeñan los miRNAs en su desarrollo y posible tratamiento requiere emplear modelos experimentales adecuados *in vitro* e *in vivo*. La diferencia entre especies dificulta el modelado de muchas cardiopatías humanas, lo que ha llevado a desarrollar modelos *in vitro* versátiles basados en la tecnología de células madre.¹²

Las células madre pluripotentes (PSCs) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), generadas por reprogramación de células somáticas mediante sobreexpresión de factores de pluripotencia¹³, tienen la habilidad de proliferar ilimitadamente y diferenciarse a todos los tipos celulares del organismo. Estas cualidades las convierten en una herramienta única para el estudio de la fisiopatología humana, la medicina regenerativa o el desarrollo de terapias, todo ello aplicable al ámbito de la investigación cardiovascular.^{14,15}

A modo de ejemplo, los **cardiomiocitos derivados de iPSCs (iCM)** se utilizaron para crear un modelo *in vitro* de hipertrofia cardíaca que permitió analizar la expresión de distintos miRNA. En este trabajo se observó la expresión diferencial de 250 miRNAs maduros, determinando la sobreexpresión de los miRNA miR-208-3p, miR-23a-3p y miR-22-3p en esta enfermedad.¹⁶ Estos resultados concordaron con otras investigaciones anteriores que relacionaban estos miRNAs y la hipertrofia del corazón, concluyendo con el éxito de este modelo basado en iPSCs para analizar patologías cardíacas y el papel que desempeñan los miRNAs.¹⁷⁻¹⁹

En este trabajo se utilizarán iCM humanos para demostrar la aplicabilidad de las NDs cargadas de anti-miRNAs en la modulación de miRNAs relacionados con el envejecimiento cardíaco.

2.3 Terapias miRNA en las enfermedades cardíacas

Debido a que los miRNAs están implicados en distintas funciones celulares como en la diferenciación celular, proliferación y supervivencia, se les considera potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de distintas enfermedades, incluidas las ECVs.²⁰ Los miRNAs median mecanismos de control a nivel transcripcional durante el envejecimiento cardíaco,^{21,22} y se ha comprobado que la modulación de distintos miRNAs puede inducir la proliferación de cardiomiocitos y estimular la regeneración cardíaca.²³

2.3.1 MicroRNAs: biogénesis y función

Los **miRNAs** son secuencias de RNA de entre 21-23 nucleótidos que regulan multitud de procesos biológicos mediante la interacción por complementariedad de bases con sus RNA mensajeros (mRNAs) diana.²⁴

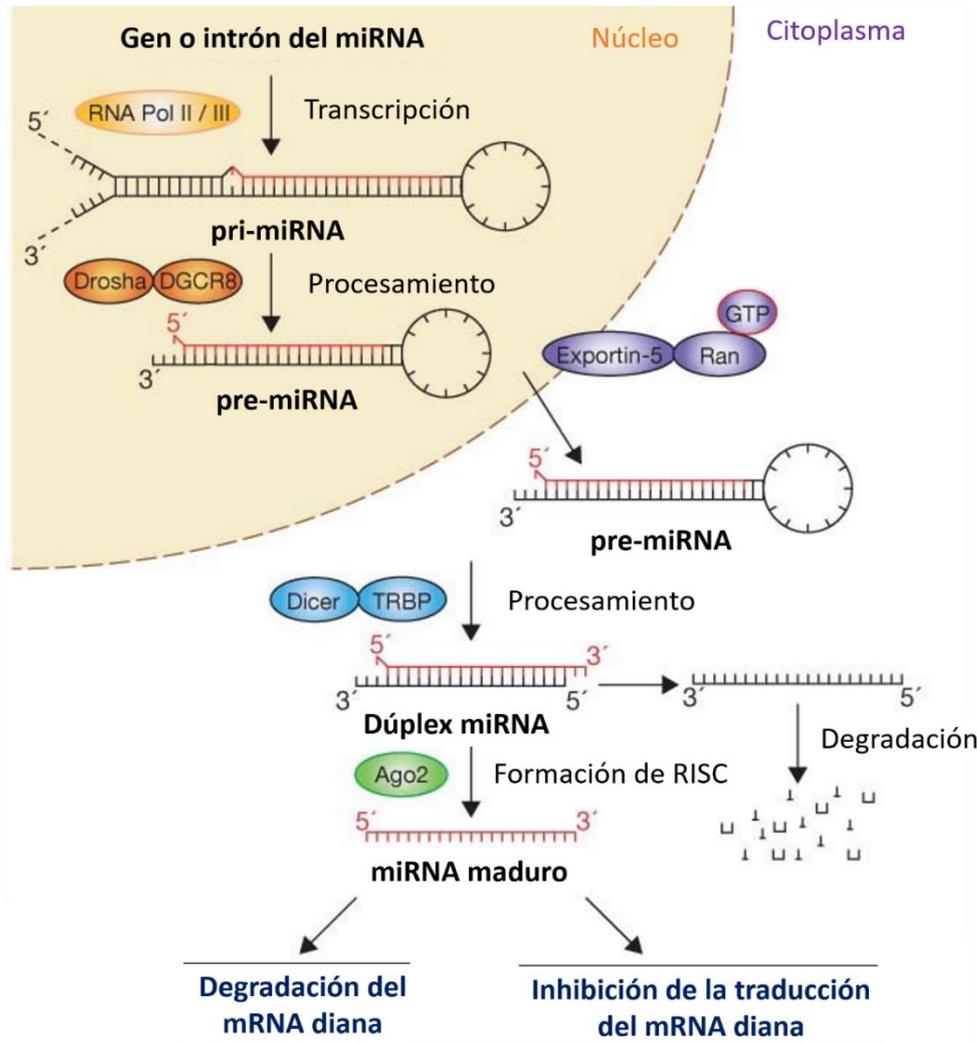


Figura 1 Vía canónica de la biogénesis de miRNA y su procesamiento hasta el miRNA maduro. Figura modificada de Winter J. y colaboradores.²⁷

La vía canónica de biogénesis de miRNA comienza por la transcripción de los pri-miRNAs por la RNA polimerasa II o III a partir de sus correspondientes genes. Estos pri-miRNAs son procesados a pre-miRNAs mediante acción del complejo microprocesador compuesto por Drosha, enzima ribonucleasa, y la proteína de unión al RNA DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8). Los pre-miRNAs son exportados por el complejo exportina 5 (XPO5)/Ran-GTP al citoplasma, donde son posteriormente procesados por la endonucleasa RNasa III Dicer. Durante este procesamiento, se obtiene el miRNA dúplex

maduro eliminando el *loop* terminal. Ambas hebras de este dúplex pueden unirse a las proteínas de tipo argonauta (AGO) para formar el complejo miRISC, y el miRNA maduro dependerá de cuál sea la hebra incorporada. La hebra 5p se origina a partir del extremo 5' de la horquilla del pre-miRNA, y la 3p del extremo 3'. La hebra que no sea incorporada a AGO es escindida y degradada, mientras que la que forme el complejo miRISC será la que determine la secuencia diana del mRNA que regula (Figura 1).²⁵

La función de regulación de los miRNA se lleva a cabo mediante la acción del complejo miRISC, que guiado por la secuencia del miRNA se une por complementariedad de bases al mRNA mediando su degradación o la inhibición de su traducción.²⁶

Un solo miRNA es capaz de modular el nivel de expresión de varios mRNAs, y un solo mRNA puede ser regulado por varios miRNAs. Su desregulación podría conllevar la alteración de la expresión de multitud de genes y el desarrollo de enfermedades como las ECVs. Por esta razón se han propuesto los miRNAs como una posible diana terapéutica, ya que la restauración de sus niveles normales podría corregir situaciones patológicas.²⁰

2.3.2 MicroRNAs relacionados con las enfermedades cardiovasculares

Durante los últimos años se han identificado miRNAs capaces de contribuir e interferir en el desarrollo de las ECVs. Por ejemplo, se han descrito miRNAs que influyen en el remodelado cardíaco y angiogénesis, y también en la fibrosis e hipertrofia cardíaca, arritmias, aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con el corazón.²⁸⁻³⁰

En concreto, entre alguno de los miRNAs destacados se encuentran los miRNAs de la familia **miR-34**, que promueven la muerte celular de los cardiomiocitos, alteran los mecanismos de reparación del DNA y regulan la erosión de los telómeros. La expresión de miR-34 está inducida por el daño cardíaco y el envejecimiento, por lo que podría ser una posible diana para modular el daño del corazón.^{31,32}

Otros ejemplos de miRNAs descritos en el fallo cardíaco incluyen **miR-133** y **miR-1**, cuyo descenso en los niveles de expresión se observaron en modelos de hipertrofia cardíaca, y su sobreexpresión *in vitro* consiguieron inhibir la enfermedad.³³ Por el contrario, es la inhibición de **miR-25** la que consigue restaurar la función del corazón des-reprimiendo SERCA2a (retículo sarco/endoplásmico Ca²⁺-ATPasa 2a), una bomba de absorción de calcio. Restaurando los niveles de calcio celular se puede mejorar la capacidad contráctil de los cardiomiocitos, lo que intuye una posible terapia cardíaca.³⁴

2.3.2.1 miR-24-2

El miRNA miR-24-2 forma parte del clúster de genes miR23a-miR27a-miR-24-2 en mamíferos, y su desregulación se ha asociado recientemente a enfermedades cardíacas mostrando una sobreexpresión en cardiomiopatías y algunas enfermedades del músculo esquelético.³⁵ Este clúster tiene una influencia directa durante el desarrollo del músculo cardíaco y esquelético, controlando la expresión de los genes *MEF2C* y *PAX3* respectivamente.^{36,37} En concreto, se ha observado que el miR24 está sobreexpresado en hipertrofia cardíaca, y su silenciamiento por anti-miRNAs (antimiRs) consigue prevenir el deterioro de la capacidad contráctil del corazón.³⁸

Además, se ha comprobado cómo miR-24-2-5p es capaz de regular e inhibir la traducción de la proteína junctofilina-2 (JPH2), que participa en la liberación de calcio durante la contracción del corazón.³⁸ Esta reducción en la expresión de JPH2 constituye un importante mecanismo en la disminución de la eficiencia del acoplamiento de la excitación-contracción, proceso en el que el ión Ca^{2+} juega un papel decisivo.³⁹

Por otro lado, el grupo BSICoS (*Biomedical Signal Interpretation and Computational Simulation group*) de la Universidad de Zaragoza ha descrito una red bioinformática de regulación de miRNAs relacionada con el envejecimiento cardíaco.²² La red se ha validado parcialmente de manera experimental identificando interacciones positivas de alguno de los miRNAs con sus genes diana. Entre estos se encontraba miR-24-2-5p, sobreexpresado con la edad, y cinco de sus genes diana: *ADRA1A*, *ACTN2*, *ATP2A2* (*SERCA2a*), *POPDC2*, *TMOD1*. Estos resultados sugieren que miR-24-2-5p es capaz de interactuar y regular la expresión de estos genes. Específicamente, la inhibición del miR-24-2-5p aumentaría sus niveles de expresión, que disminuyen con la edad, y su modulación podría tener un efecto terapéutico.

Por ejemplo, el aumento de *ADRA1A*, que codifica para el receptor adrenérgico Alfa-1 y está implicado en el control de la contracción y el ritmo cardíaco, otorgaría protección a los cardiomiocitos y prevendría la insuficiencia cardíaca.⁴⁰ *ACTN2* tiene un papel importante en la formación de los microfilamentos y componentes del citoesqueleto cardíaco, por lo que la inducción del mismo podría compensar deficiencias en la contracción cardíaca asociadas a la edad.^{22,41} Otro ejemplo importante es *SERCA2a*, que es esencial en el control de la homeostasis del calcio y constituye una diana recurrente en la terapia génica para restaurar la correcta función del corazón.⁴²

La interacción demostrada de miR-24-2-5p con estos genes de función relevante en la fisiología cardíaca,^{22,43} justifica su potencial terapéutico como diana cardíaca en patologías relacionadas con el envejecimiento. La regulación de los niveles de miR-24-2-5p puede modular la expresión de distintos genes, generando un efecto beneficioso que restaure y mejore la función del corazón.

2.3.3 Terapias miRNA: Miméticos de miRNA y antimiRs

En las terapias miRNAs existen dos formas de modulación de la función de los mismos. Una está basada en la sobreexpresión del miRNA, utilizando **miRNAs miméticos**, mientras que la otra trata de inhibir un miRNA específico empleando moléculas antisentido (**antimiRs**) –como oligonucleótidos antisentido (ASOs)– o por *knockout* genético. Los antimiRs impiden la interacción entre el miRNA y su mRNA diana, inhibiendo así su función, secuestrando el miRNA mediante apareamiento de bases (Figura 2).²⁰

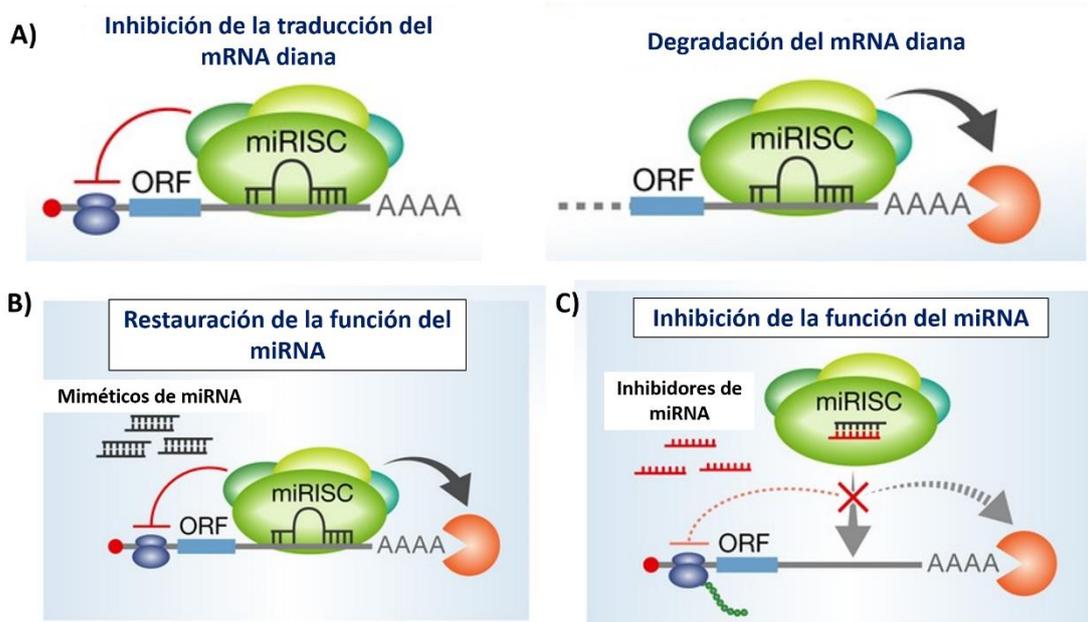


Figura 2 Figura modificada de Rooij, E. y colaboradores.⁴⁴ A) Mecanismos de acción del miRNA (formando miRISC) para modular la expresión del mRNA diana. B) Terapia miRNA empleando miméticos de miRNA que restauran la función del miRNA. C) Terapia miRNA empleando inhibidores de miRNA que inhiben la función del miRNA.

Existen varios estudios preclínicos *in vivo* que empleando moléculas antisentido consiguen controlar la expresión de diversos miRNAs sobreexpresados en ECVs, lo que resulta en la restauración de la función cardíaca. Como se ha expuesto anteriormente, la inhibición con antimiRs de **miR-25**, que se encuentra sobreexpresado en el fallo cardíaco,

resultó en una mejora de la función del corazón y la supervivencia de ratones.³⁴ En otro caso, Fan Guo-Chang y su equipo inhibieron el **miR-320**, lo que mejoró la función cardíaca después del daño causado por la isquemia seguida de reperfusión.⁴⁵ También se observó que inhibiendo **miR-92a** con antimiRs aumentó la capacidad de recuperación del corazón tras un infarto en ratones y cerdos.⁴⁶ Además, existen estudios *in vivo* que demuestran la utilidad de las terapias con miRNAs miméticos para el tratamiento de los defectos derivados del infarto de miocardio, como por ejemplo con **miR-199-a-3p** en cerdos.⁴⁷

En definitiva, estas investigaciones sugieren que el uso de miRNAs miméticos y antimiRs para modular las funciones de determinados miRNAs en el tejido cardíaco puede suponer una terapia prometedora y eficaz para restaurar y mejorar la función del corazón. Sin embargo, todavía existen retos que se deben superar puesto que hay varios aspectos que influyen la dosis efectiva de las terapias con miRNAs.²⁰ Algunos puntos importantes que se deben abordar son: estudiar la biodisponibilidad y biodistribución de estos inhibidores, caracterizar el mecanismo de captación celular, investigar la interacción entre el mimético/antimiR y el mRNA diana/miRNA y cómo regulan la expresión de éstos.

2.3.4 Estrategias de transporte de la terapia RNA

Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA que, dada su naturaleza hidrofílica y de carga negativa, tienen dificultad para atravesar las membranas celulares y, además, están expuestos a nucleasas circulantes. Con el fin de mejorar la eficiencia y especificidad de la terapia miRNA, se han creado diversas opciones de transporte de estos inhibidores de miRNAs.

Existen estrategias basadas en **dispositivos** que pretenden aumentar la eficacia de la terapia RNA en el tejido cardíaco. En un ejemplo, se logró la inhibición de **miR-21** empleando *stents* (endoprótesis vasculares) cubiertos de anti-miR21, lo que mejoró la función cardíaca y reportó menos efectos secundarios que a través de otros métodos.⁴⁸

El transporte de la terapia de RNA mediada por **vectores virales** es una de las estrategias que más estudios y éxitos ha generado. Karakikes y colaboradores emplearon AAVs con tropismo cardíaco en rata que expresaban **miR-1**, consiguiendo la restauración de los niveles de este miRNA con el fin de prevenir la hipertrofia cardíaca.⁴⁹ Sin embargo, las terapias con AAV no están exentas de riesgos a corto⁴⁷ o largo plazo.⁵⁰ Por ejemplo, la

entrega de miR-199-a con AAV condujo a la muerte súbita de cerdos infartados después de un tratamiento prolongado.⁴⁷

Una opción prometedora para mejorar la efectividad de la terapia RNA es su **encapsulación**. Bellera y colaboradores encapsularon **antimiR-92a** en microesferas, y su administración intracoronaria en cerdos reveló un aumento de la función cardíaca tras el infarto en estos animales.⁵¹ Otros estudios muestran que la inyección intracardiaca de formulaciones lipídicas que contienen miRNAs miméticos como hsa-miR-199a-3p, mejora la función del corazón en una sola dosis.⁵²

A pesar de estos ejemplos, las estrategias de transporte de terapia RNA que aumenten la eficacia y especificidad de la misma son todavía escasas y presentan complicaciones, especialmente para el transporte de antimiRs. Los vectores virales pueden activar el sistema inmune y habitualmente presentan mutagenicidad.⁵³ Los vectores no virales como las esferas lipídicas y las partículas inorgánicas de oro o sílice pueden mostrar problemas de acumulación y toxicidad, además de tener una escasa tasa de transfección.^{54,55}

Por tanto, aunque estas estrategias proponen un avance en la terapia RNA, presentan limitaciones respecto al transporte eficiente y controlado de la carga terapéutica y su eliminación e inactivación en el sitio de acción. Es por ello que existe una necesidad de desarrollar tratamientos innovadores y nuevas plataformas de transporte para la terapia miRNA en enfermedades cardíacas.

El desarrollo de la **nanotecnología del DNA** es capaz de cubrir esta necesidad, con el surgimiento de las NDs como nuevos materiales funcionales y biocompatibles dentro del campo de la nanomedicina.

2.4 Nanotecnología del DNA

La nanotecnología del DNA aplica las propiedades del DNA para crear estructuras en las que el ácido nucleico representa un “bloque de construcción”.⁵⁶ Gracias a la complementariedad de bases entre hebras simples de DNA, es posible diseñar nanoestructuras controlando el tamaño y geometría de las mismas y programar interacciones con otras moléculas.^{57,58} Su montaje permite el diseño en dos o tres dimensiones,⁵⁹ habiéndose caracterizado estructuras de DNA como poliedros,⁶⁰ prismas,⁶¹ y buckybolos.⁶⁰ Además, hay estrategias como el DNA origami o *bricks* de DNA que permiten la creación de estructuras más complejas en las tres dimensiones y

que pueden ser programadas para responder a estímulos químicos o ambientales (Figura 3).⁶²

Las nanoestructuras de DNA auto-ensambladas tienen diversas aplicaciones en análisis molecular,⁶³ y gracias a sus características son de especial interés en biomedicina donde pueden ser empleadas como biosensores, transportadores de fármacos⁶⁴ y agentes de imagen,⁶⁵ entre otros. Estas estructuras son biocompatibles, biodegradables, presentan cierta estabilidad en condiciones fisiológicas,⁶⁶ son capaces de encapsular fármacos y dirigirlos al sitio diana⁵⁷ y pueden entrar en las células por endocitosis sin necesidad de agentes transfectantes.⁵⁶ Asimismo, la síntesis de estas NDs es sencilla y altamente reproducible.⁵⁷

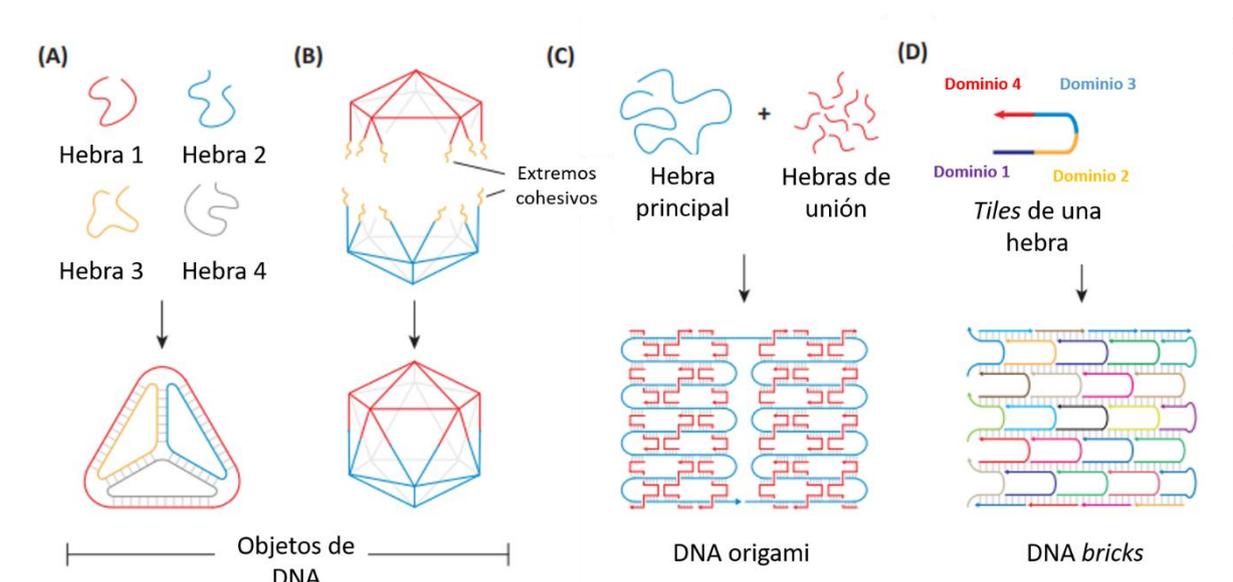


Figura 3 Diseño de NDs. Figura modificada de Madhanagopal y colaboradores.⁵⁷ (A) Auto-ensamblado de hebras de DNA para formar un tetraedro. (B) Componentes de DNA con extremos cohesivos cuya unión da lugar a un icosaedro de DNA. (C) Método denominado DNA origami, basado en la unión de una hebra principal con diversas hebras de unión. (D) Hebras de ssDNA se conectan entre ellas por complementariedad de dominios para dar lugar a la estructura de DNA.

Además de ser empleadas como transportadores de fármacos o herramientas de estudio biológico, las NDs pueden considerarse como fármacos en sí mismos al influir en la maquinaria celular con un fin terapéutico. Estas estructuras pueden interactuar directamente con otras moléculas por complementariedad de bases –como **miRNAs**– y ser empleadas en terapia génica.⁵⁸

Así, el equipo de H. Qian creó nanotubos de DNA capaces de capturar miRNAs oncogénicos sobreexpresados y silenciar su expresión. Estas NDs con segmentos de DNA complementarios a los miRNAs miR-21 y miR-155 presentes en el citoplasma

consiguieron inhibir la proliferación de las células cancerosas.⁵⁸ Sin embargo, el mecanismo de captura y competición de las hebras de DNA artificial con el dúplex miRNA o con miRISC está poco caracterizado. Los resultados de estudios recientes indican que las moléculas antimir son capaces de asociarse específicamente a los miRNAs unidos a AGO formando miRISC, evitando así la unión con los mRNAs diana. Al impedir la asociación de los miRNAs con sus respectivos mRNAs, se evita la degradación o inhibición de la traducción de estos últimos, aumentando finalmente su expresión.⁶⁷

En otro trabajo, se diseñaron y caracterizaron NDs incorporando distintos elementos funcionales como aptámeros y oligonucleótidos antisentido, consiguiendo regular la expresión génica de células cancerosas a través de la represión de *c-raf-1*. La aplicación de estos denominados nanohidrogeles resultó en la inhibición de la proliferación y migración de células cancerosas A549.⁶⁵

Estas investigaciones recientes señalan la potencial aplicación de las nanoestructuras de DNA en técnicas de diagnóstico, transporte de fármacos, terapia oncogénica y como elementos novedosos en las terapias RNA, aprovechando su alta programabilidad y biocompatibilidad. En conclusión, la aplicación de la nanotecnología del DNA en la terapia miRNA supone un gran avance en el campo de la nanomedicina.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La hipótesis principal de este trabajo es que el desarrollo de terapias miRNA para tratar dolencias cardiacas superará grandes restricciones al utilizar nanotransportadores de DNA que faciliten su entrega a nivel celular.

Más concretamente se hipotetiza que:

- Los miRNA son moléculas con potencial terapéutico en el tratamiento de las ECVs.
- Los iCM son un modelo representativo de la biología de los miocitos primarios humanos que permite el estudio de nuevas terapias, como la terapia miRNA, de una manera fiable.
- Las NDs con múltiples segmentos de DNA complementarios a los miRNA sobreexpresados en envejecimiento cardiaco, en concreto miR-24-2-5p, pueden capturar miRNAs maduros diana de manera efectiva para posteriormente mejorar la función cardiaca.

3.2 Objetivo general

El objetivo del trabajo es demostrar el potencial de las nanoestructuras de DNA para entregar terapias miRNA en cardiomiocitos humanos y, en concreto, modular la cantidad del miRNA miR-24-2-5p y su efecto pro-envejecimiento a nivel celular.

Para ello se han desarrollado los nanotransportadores con segmentos anti-miR-24-2-5p denominados hebras de captura. En concreto, se han llevado a cabo un plan de trabajo que aborda los objetivos específicos que se indican a continuación para la consecución de este propósito.

3.3 Objetivos específicos del trabajo

Los objetivos específicos del trabajo son los siguientes:

- Diseñar y preparar los nanotransportadores de DNA.
- Realizar una caracterización fisicoquímica de las NDs.
- Analizar la estabilidad y funcionalidad de las nanoestructuras *in vitro*.
- Evaluar la citotoxicidad e internalización celular de las estructuras *in vitro* en cultivos celulares.
- Analizar la bioactividad de las NDs en iCM humanos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño y preparación de las nanoestructuras

4.1.1 Diseño de los nanotransportadores de DNA

El diseño de las nanoestructuras y las unidades de construcción de DNA está basado en el trabajo de Li, J. y colaboradores.⁶⁵ Las secuencias de las hebras que dan lugar a los monómeros que conforman las NDs fueron determinadas mediante el software Nupack⁶⁸ y están recogidas en Material Suplementario S2.

Se diseñaron dos versiones distintas de nanoestructuras (**N1** y **N2**) que están formadas por tres tipos de unidades de construcción: dos monómeros con forma de Y (**Y1** e **Y2**) y una unidad de unión entre ambos denominada **L3**.

4.1.2 Preparación de las nanoestructuras por auto-ensamblado

Las hebras de DNA que conforman las unidades de construcción de los nanotransportadores fueron adquiridas de Integrated DNA Technologies (IDT), Macrogen y Biomers.

Las unidades de DNA (Y1, Y2 y L3) se ensamblaron mezclando las hebras que las forman a una concentración equimolar (20 μ M) en una disolución de tampón fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Cada mezcla se sometió a un programa de ciclado térmico en el termociclador Biorad T100, en el cual las mezclas se calentaron a 95°C durante 30 segundos y la temperatura descendió 1°C/minuto hasta 25°C. Este programa tuvo la finalidad de asegurar la correcta hibridación entre las hebras que conforman los monómeros, desnaturalizándolas y enfriándolas para que se produzca el correcto apareamiento de bases entre ellas.

Para la preparación de las nanoestructuras, 4 μ M de la solución de Y1, 1 μ M de Y2 y 6,5 μ M de L3 se mezclaron en una disolución con tampón PBS. Incluir una unidad de Y2 por cada cuatro unidades de Y1 se basó en diseños similares que se encuentran en la literatura.⁶⁵ Tras la adición de los componentes, la mezcla se sometió a un programa en el termociclador para asegurar el correcto ensamblaje de las nanoestructuras: se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5 minutos tras lo que descendió la temperatura hasta 25°C, y finalmente fueron almacenadas a 4°C.

4.2 Caracterización físico-química de las nanoestructuras

4.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Las nanoestructuras se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% con el fin de comprobar el correcto ensamblaje de las unidades de DNA. El gel de poliacrilamida se compuso de tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.) y 11mM MgCl₂. Una alícuota de 2 µL de las muestras se cargó en el gel junto con 0,4 µL de tampón de carga Loading Dye Purple, (New England Biolabs, NEB).

La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 100V, empleando como referencia en el pocillo inicial un marcador de peso molecular de 100pb (NEB), con un rango de tamaño desde 100pb hasta 1517pb. Para visualizar el resultado de la electroforesis, el gel se incubó con Gel RED (Biotium) y se visualizó en un transiluminador (Syngene Gel Doc system).

4.2.2 Dispersión de la luz dinámica (DLS)

Para llevar a cabo una caracterización del tamaño de las NDs se realizó un estudio de las mismas mediante la técnica de dispersión de la luz dinámica (DLS por las siglas en inglés: *Dynamic Light Scattering*). El equipo empleado de DLS es Malvern Instruments Nano ZS, y las muestras de las unidades de ensamblaje de DNA (Y1, Y2 y L3) fueron medidas a una concentración de 10 µM en PBS. Las nanoestructuras se midieron a una concentración de sus componentes de 4 µM de Y1, 6,5 µM de L3 y 1 µM de Y2. Se repitieron todas las medidas 5 veces y se promediaron los resultados para calcular el diámetro hidrodinámico.

Los resultados obtenidos de las medidas del DLS se pueden expresar tanto en intensidad como número. En este trabajo se escogieron los resultados obtenidos por número para determinar el diámetro hidrodinámico de los componentes y de las nanoestructuras.

4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Con el fin de obtener una imagen topográfica de resolución nanométrica de los nanotransportadores se empleó la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM por las siglas en inglés: *Atomic Force Microscopy*). N1 se observó a una concentración de DNA de 200 ng/µL diluida en PBS. 5 µL de esta solución se aplicó sobre una superficie de mica y tras 1 minuto la muestra se sometió a lavados sucesivos con 1 mL de agua filtrada. Se

empleó el equipo Multimode 8 from Veeco-Bruker utilizando un cantiléver adquirido en NT-NMD Spectrum Instruments, con una constante de fuerza de 1,2-6,4 N/m.

4.2.4 Determinación de la estabilidad térmica mediante espectrofotometría

La estabilidad térmica de las nanoestructuras y de las unidades que las conforman se determinó midiendo la temperatura de desnaturalización o fusión (T_m), temperatura a la que la mitad de los pares de bases de las hebras de DNA de los nanotransportadores se encuentran sin hibridar.

La técnica permite componer la curva de desnaturalización de DNA, midiendo la absorbancia a 260 nm y basándose en que el coeficiente de extinción molar a esta longitud de onda de la hebra sencilla de DNA (ssDNA) es mayor (por tanto, la absorbancia también) que el de la doble hebra (dsDNA) a la misma concentración. Conforme aumenta la temperatura, las hebras de DNA que componen las nanoestructuras y sus componentes se desnaturalizan, aumentando la cantidad de ssDNA y la absorbancia. Midiendo este aumento de absorbancia se genera la curva de desnaturalización de DNA a partir de la cual se calcula la T_m .

Para calcular esta curva de desnaturalización se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Varian CaryBio 100 UV-Vis) respecto a la temperatura (de 25 °C a 95 °C aumentando 1 °C/minuto). Las muestras se encontraron a una concentración de 50 µg/mL, lo que en las muestras de Y1 e Y2 equivale a una concentración de 1 µM.

Con el fin de computar la T_m se procesaron los datos con el programa Origin,⁶⁹ calculando la derivada de los datos y realizando un ajuste con una función de Gauss, expresando la varianza en función de sigma (σ). El valor de T_m de L3 no pudo determinarse experimentalmente y se estimó empleando la aplicación existente en la web de IDT a la misma concentración que el resto de los componentes.⁷⁰

4.3 Caracterización biológica de las nanoestructuras

4.3.1 Caracterización de la estabilidad en suero mediante PAGE

Se llevó a cabo una caracterización de la estabilidad de los nanotransportadores en suero mediante PAGE. Se estudió el grado de degradación por nucleasas presentes en el suero del medio de cultivo como una aproximación de las condiciones presentes en futuros estudios *in vivo*. Para ello, las estructuras diluidas 1/2 se incubaron en medio de cultivo

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich). También se incubaron en medio de cultivo de iCM RPMI (Thermo Fisher Scientific) suplementado con B-27 (Thermo Fisher Scientific) con el fin de observar si ocurría degradación de las nanoestructuras en este ambiente.

Las muestras se incubaron a 37°C durante 2h, 8h, 24h y 48h. También se estudió la estabilidad frente a nucleasas de la unidad de ensamblaje Y1, a una concentración final de 2 µM y empleando los mismos tiempos de incubación que para las NDs. El mismo proceso se llevó a cabo en paralelo con el medio de cultivo RPMI con B27.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó como se indica en el punto 3.2.1, y los resultados fueron procesados empleando el programa ImageJ.⁷¹ Este software permite comparar la intensidad de las bandas de los distintos carriles del gel, calculando la degradación de las nanoestructuras proporcionalmente a la pérdida de intensidad siguiendo la ecuación 1:

$$\text{(Ec. 1) Estructura no degradada (\%)} = \frac{\text{Intensidad banda (t)}}{\text{Intensidad banda (0 horas)}} \cdot 100$$

4.3.2 Estudio de la capacidad de captura del miRNA mediante PAGE

La capacidad de los nanotransportadores de capturar el miRNA y desensamblarse fue estudiada por incubación de las estructuras con la secuencia del miR-24-2-5p, bien como DNA (miDNA) (IDT) o RNA (miRNA) (Riboxx), a 37 °C a distintos tiempos. Además de las nanoestructuras, también se realizó el ensayo evaluando la capacidad de captura de la unidad de DNA Y1. Las muestras se incubaron a 37°C durante 40 minutos, 90 minutos y 4,5 horas. Se empleó como control un oligonucleótido sin complementariedad en la secuencia con Y1 y de igual longitud que el miRNA y miDNA, con el que se realizaron los mismos pasos y cuya secuencia se encuentra en Material Suplementario S3.

Se preparó una disolución con miDNA a una concentración de 20 µM, lo que supone un exceso molar de 5/3 respecto a la concentración de hebras de captura de Y1 a 4 µM en las nanoestructuras (puesto que cada unidad de Y1 contiene 3 hebras de captura, la concentración de estas hebras es de 12 µM). En el caso del miRNA y el control también se mantuvo la relación molar 5/3 respecto a la concentración de hebras de captura. De esta manera se favorece la interacción entre las hebras de captura y el miRNA, y por tanto,

el desensamblado de las NDs. Tras la incubación, las muestras se analizaron por PAGE como se indica en el punto 3.2.1.

4.4 Caracterización *in vitro* de la actividad y citotoxicidad

4.4.1 Cultivo celular

Para llevar a cabo la caracterización de la actividad y citotoxicidad de los nanotransportadores *in vitro* se emplearon dos tipos de líneas celulares: HEK293 y miocitos derivados de iPSC humanas.

4.4.1.1 HEK293

Se cultivaron células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) en medio de cultivo compuesto por DMEM (Biowest) con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific) y 1% de penicilina y estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm² cuyo medio se renovó cada dos días. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 100%, se subcultivaron para sembrarlas en placas de 96 pocillos –para llevar a cabo los experimentos– y en frascos de 25 cm² –como cultivo de mantenimiento–. Las células confluentes se lavaron brevemente con 7 mL de PBS (Sigma-Aldrich), se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente con 4 mL de EDTA 0,5 mM (Thermo Fisher Scientific) para levantarlas, se añadió 10 mL de DMEM y se transfirieron a un tubo de 15 mL. Las células en suspensión se centrifugaron 5 minutos a 300 g a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y el precipitado celular se resuspendió en 5 mL de medio DMEM + 10% FBS. Tras teñir una alícuota de esta solución con azul tripán (Thermo Fisher Scientific) se calculó la densidad celular contando en una cámara de Neubauer (Thermo Fisher Scientific). Las células se sembraron a una densidad de 7500 células/cm² por pocillo de placa de 96 y los frascos de cultivo se mantuvieron a una densidad siguiendo las necesidades experimentales.

4.4.1.2 Generación de cardiomiocitos derivados de iPSC

Los cardiomiocitos se diferenciaron a partir de iPSC siguiendo el protocolo establecido en laboratorio BSICoS.^{72,73} El medio de cultivo de los iCM fue renovado cada dos días y a día 16 se resembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de $1,6 \cdot 10^5$ células/cm² en medio RPMI (Thermo Fisher Scientific) suplementado con B-27 (Thermo Fisher Scientific) para su tratamiento con las nanoestructuras.

4.4.2 Citometría de flujo

Con el fin de estudiar la internalización de los nanotransportadores en las células HEK293 se realizó un análisis por citometría de flujo. Las nanoestructuras se ensamblaron utilizando proporciones variables de unidades Y1 marcadas con un fluoróforo y sin marcar para lograr un porcentaje de marcaje fluorescente del 100%, 80%, 60%, 40%, 20% y 0%. En concreto, para el marcaje se utilizó el fluoróforo Cy3 ($\lambda_{\text{excitación}}=550\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=560\text{nm}$), presente en el extremo 5' de la hebra S2 de Y1 (Material Suplementario S2). Tras la siembra de células HEK293 a 7500 células/cm², se añadió N1 preparada con las distintas proporciones de marcaje (composición 1 μM Y1, 0,25 μM Y2, 1,6 μM L3) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras 24h se retiró el medio, se lavó con PBS para descartar restos de las nanoestructuras que no fueron internalizadas por las células y se renovó el medio. Tras 24h las células se levantaron como se ha descrito anteriormente para la siembra y se suspendieron en 200 μL de PBS con 5% de FBS en tubos de citometría de flujo. Las células se analizaron en un Gallios 10 (Beckman Coulter) previa filtración con mallas de 50 μm .

A modo comparativo, el mismo estudio se llevó a cabo con la unidad Y1 a 1 μM (solo el monómero), manteniendo los mismos porcentajes de marcaje fluorescente que en el caso de la nanoestructura.

La viabilidad de las células HEK293 se evaluó a las 48 horas de iniciar la exposición a las NDs también por citometría de flujo. Se hizo una incubación de 24 horas con las nanoestructuras y se retiraron 24 horas antes del análisis. En concreto, se añadieron Y1 y N1 y N2 a 100 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 0 $\mu\text{g/mL}$ en PBS. Para el análisis, las células se suspendieron individualmente incubándolas con EDTA 0,5 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente y se transfirieron a una placa de pocillos con fondo cónico. Se centrifugó la placa a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el medio y se añadieron 45 μL del tampón de tinción (PBS, 2,5 mM CaCl₂, pH 10,0) y 5 μL de la solución de la tinción de viabilidad que incluía 2,5 $\mu\text{g/mL}$ yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μL de tampón de tinción para lavar y se centrifugó la placa 5 minutos a 400 g a temperatura ambiente. Se retiró el medio, se resuspendieron las células en 200 μL de la solución de tinción con 5% FBS y se prepararon para el análisis en el equipo Gallios 10 (Beckman Coulter).

4.4.3 Microscopía confocal (CLSM) y microscopía de fluorescencia

Para analizar la internalización celular de los nanotransportadores en los iCM se llevó a cabo la técnica de microscopía confocal (CLSM por sus siglas en inglés: *Confocal laser scanning microscopy*). Tras la resiembra de los iCM a una densidad de $1,6 \cdot 10^5$ células/cm² sobre portaobjetos de cristal, se añadió N1 marcada al 100% de fluorescencia (composición 0,25 µM Y1, 63 nM Y2, 0,4 µM L3) a cada pocillo. En otros pocillos se añadió el mismo volumen de PBS como control y del monómero Y1 marcado al 100% a una concentración final de 0,25 µM. Tras 24h se retiró el medio, se lavó con PBS y se renovó el medio. Después de otras 24h las células se fijaron para ser observadas por microscopía confocal. Para ello se retiró el medio, se lavó con PBS y se añadieron 500 µL/pocillo de paraformaldehído (PFA) (VWR) 4% (v/v) durante 20 minutos a 4°C. Tras esto, se realizó un lavado con PBS, se recogieron los cubreobjetos y se añadió Protein block (Agilent) sin diluir durante 25 minutos. Se lavaron los cristales con PBS y se añadió Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,1% en PBS durante 15 minutos. Se lavaron con PBS y se añadió el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C en Tritón X-100 al 0,1% en PBS. Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo contra TNNT2 (Abcam) de conejo (dilución 1:200) y un anticuerpo contra SERCA2a (Abcam) de ratón (dilución 1:1000). Tras realizar sucesivos lavados con PBS se añadieron los anticuerpos secundarios anti-ratón (marcado con Alexa Fluor 488) y anti-conejo (marcado con Alexa Fluor 633) (Thermo Scientific) diluido 1:1000 en Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 30 minutos y se continuaron los siguientes pasos en oscuridad. Tras lavar los cubreobjetos con PBS se añadió DAPI (Abcam) como contraste nuclear a una concentración de 3 µM durante 20 minutos, tras lo cual se lavaron las muestras y se prepararon en medio de montaje fluorescente Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific) para ser analizadas en el microscopio confocal LSM880 (Zeiss).

Los cultivos y las muestras preparadas para ser observadas por microscopía confocal también fueron visualizadas en el microscopio invertido de fluorescencia Nikon TS2-FL.

4.4.4 Ensayos de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR)

La capacidad de las NDs de capturar el miRNA miR-24-2-5p en iCM se analizó evaluando la expresión del mRNA de algunos genes que regula este miRNA.

4.4.4.1 Extracción de RNA

Tras la resiembra de iCM se añadió N1 (composición 0,25 μ M Y1, 63 nM Y2, 0,4 μ M L3) a cada pocillo. En otros pocillos se añadió el mismo volumen de PBS como control y del monómero Y1 a una concentración final de 0,25 μ M. Tras 48h se retiró el medio, se lavó con PBS y se renovó el medio. Pasadas 48h las células se lisaron para extraer RNA con 300 μ L de buffer de lisis del kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) con 1% β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) (v/v). La extracción de RNA se llevó a cabo empleando el kit mencionado anteriormente siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA extraído se eluyó en 30 μ L de agua libre de RNAsas. La cantidad de RNA extraído de cada muestra se calculó en el espectofotómetro NanoPhotometer N60 (Implen).

4.4.4.2 Retrotranscripción de RNA a cDNA

80 nanogramos del RNA extraído se retrotranscribieron usando el kit SuperScript II First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El cDNA obtenido se diluyó 1/10 en buffer TE (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) antes de su uso en qPCR.

4.4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Se realizó la técnica de qPCR empleando Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y los cebadores para los genes: *SERCA2a* y *ACTN2* (recogidos en Material Suplementario S4). Como gen normalizador se empleó GAPDH. La qPCR se llevó a cabo en el equipo Viia7 (Applied Biosystems) y como control positivo de expresión de ambos genes se empleó cDNA procedente de una muestra de ventrículo izquierdo humano.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Diseño de los nanotransportadores

Se diseñaron dos nanoestructuras (N1 y N2) formadas por tres tipos de unidades de construcción: dos monómeros con forma de Y (Y1 e Y2) y una unidad de unión entre ambos denominada L3 (Figura).

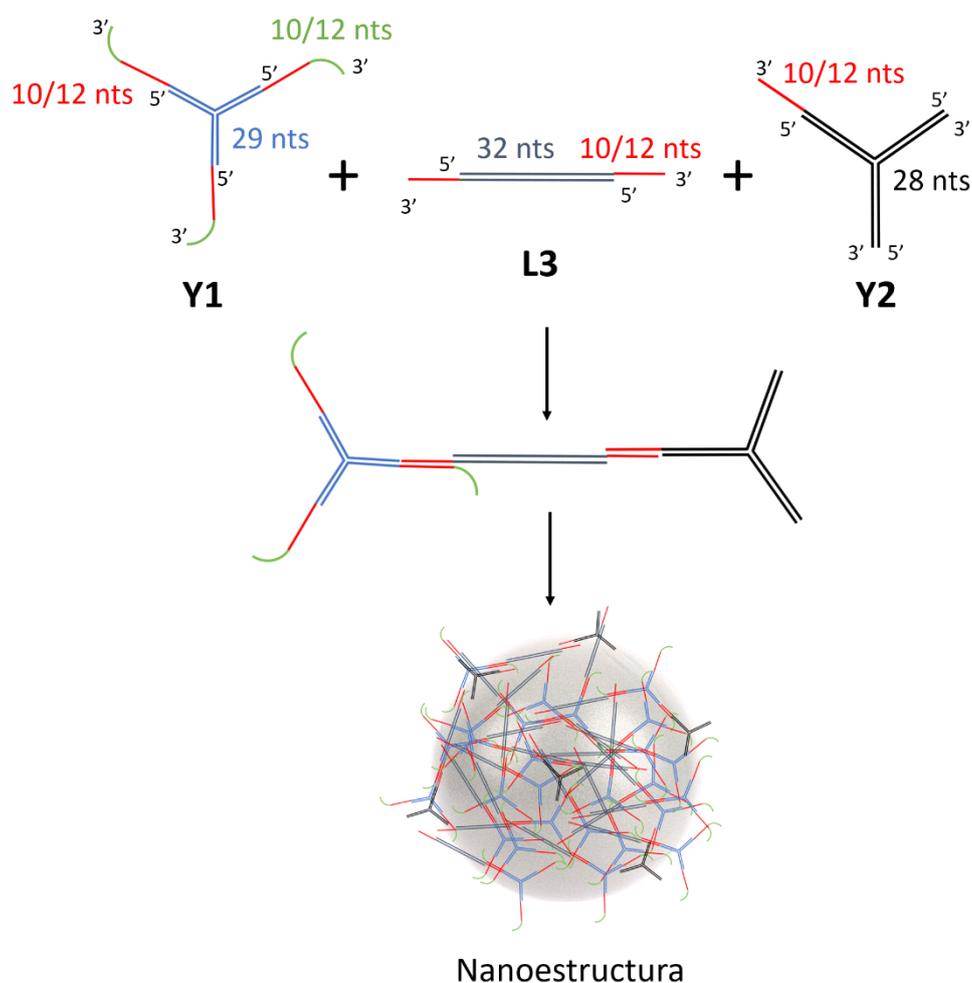


Figura 4 Formación de las nanoestructuras de DNA a partir de las unidades de construcción. Y1, Y2 y L3 están diseñados para unirse mediante hibridación de sus extremos cohesivos (líneas rojas), lo que conduce a la formación de las NDs.

Y1 es la unidad funcional de los nanotransportadores, y está formado por tres hebras de ssDNA que hibridan entre sí, quedando cada una con un extremo cohesivo en 3'. Una parte de este extremo se hibridará con el extremo libre del componente L3. Además, estos extremos de Y1 (que se denominan hebras de captura) presentan complementariedad de bases con el miRNA miR-24-2-5p. De esta forma, Y1 tiene la capacidad de unirse y capturar al miRNA sobreexpresado originando el desensamblado de la ND al desplazar

L3 que unía las unidades que conformaban la estructura. Cada hebra de DNA monocatenario que conforma el monómero está compuesta por 51 nucleótidos, y en el centro de la estructura de Y1 se encuentra un *mismatch*, un nucleótido timina de cada hebra sin hibridar (Figura 5). Este *mismatch* otorga a la estructura cierta flexibilidad que se prevé que favorezca la polimerización y permita un mejor ensamblado de la nanoestructura. En concreto, 28 nucleótidos de una hebra se encuentran hibridados con las otras dos (14 nucleótidos con una y 14 nucleótidos con otra), que sumado al nucleótido de timina desapareado deja 22 nucleótidos en los extremos cohesivos de Y1 (complementarios y por tanto del mismo tamaño que el miRNA miR-24-2-5p) (Figura 5).

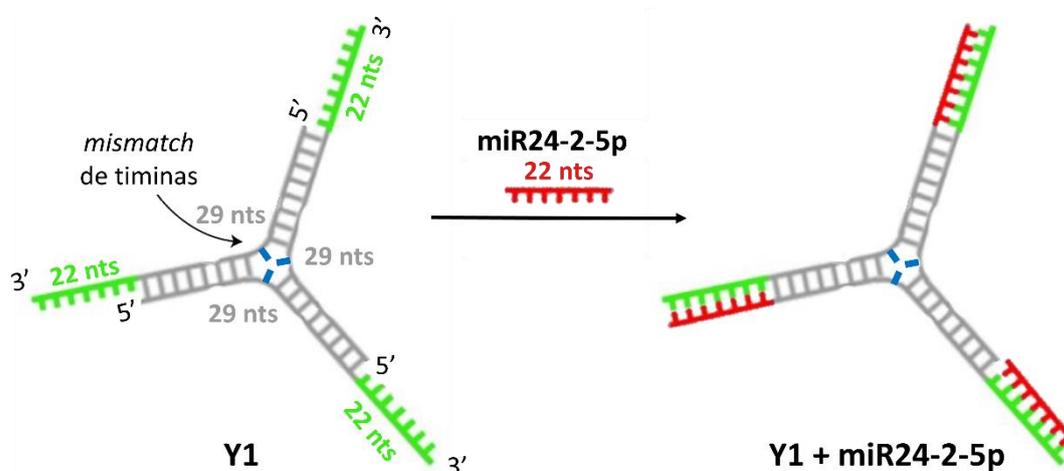


Figura 5 Representación de la unidad de DNA Y1. En el centro de la estructura se aprecia el *mismatch* de timinas en azul. Los 22 nucleótidos de los extremos cohesivos del monómero son complementarios al miR-24-2-5p, por lo que cuando entran en contacto se produce su unión por complementariedad de bases.

Y2 también se ensambla a partir de tres hebras de ssDNA, aunque solo una ellas posee un extremo cohesivo en el extremo 3'. Por tanto, esta unidad sirve como bloqueo para inhibir la extensión de las NDs. Las dos hebras sin el extremo cohesivo que conforman Y2 contienen 28 nucleótidos que hibridan completamente entre las tres hebras, y la restante contiene 38 o 40 nucleótidos (dependiendo de la versión de la nanoestructura, como se representa más adelante en la Figura 7). Este monómero con solo un extremo cohesivo permite controlar el proceso de formación de las nanoestructuras, ya que estudios previos han señalado que el tamaño de las NDs puede ser controlado variando la concentración de éste.⁶⁶

El componente L3 actúa de unión entre las unidades Y1 e Y2, y está formado por dos hebras de ssDNA con dos extremos cohesivos en 3', formando un dúplex lineal. Las

hebras que conforman L3 contienen 42 o 44 nucleótidos (dependiendo de la versión de la ND, como se indica más adelante y se muestra en la Figura 7), y un total de 32 nucleótidos se encuentran unidos por complementariedad de bases entre ambas hebras. Los extremos cohesivos de los monómeros con forma de Y (Y1 e Y2) y L3 son complementarios entre sí, por lo que la hibridación entre las distintas unidades de construcción conduce a la formación de los nanotransportadores de DNA finales.

El empleo de las NDs para la terapia miRNA presenta varias ventajas respecto al monómero solo (Y1) a la hora de regular la expresión de miR-24-2 en los cardiomiocitos. Se prevé que estas estructuras tengan más estabilidad frente a la degradación, ya que poseen menor cantidad de hebra de ssDNA expuesta a las nucleasas del citosol; al tener un mayor tamaño, se espera que las nanoestructuras se internalicen de manera más eficiente en las células, y en caso de emplear estas estructuras *in vivo*, sean eliminadas del organismo en mayor tiempo. Además, la nanoestructura ensamblada posee múltiples sitios de anclaje al miRNA, al contrario que Y1 que solo posee tres (los tres extremos cohesivos), por lo que la unión y captura al miR-24-2 se realizaría de forma más eficaz.

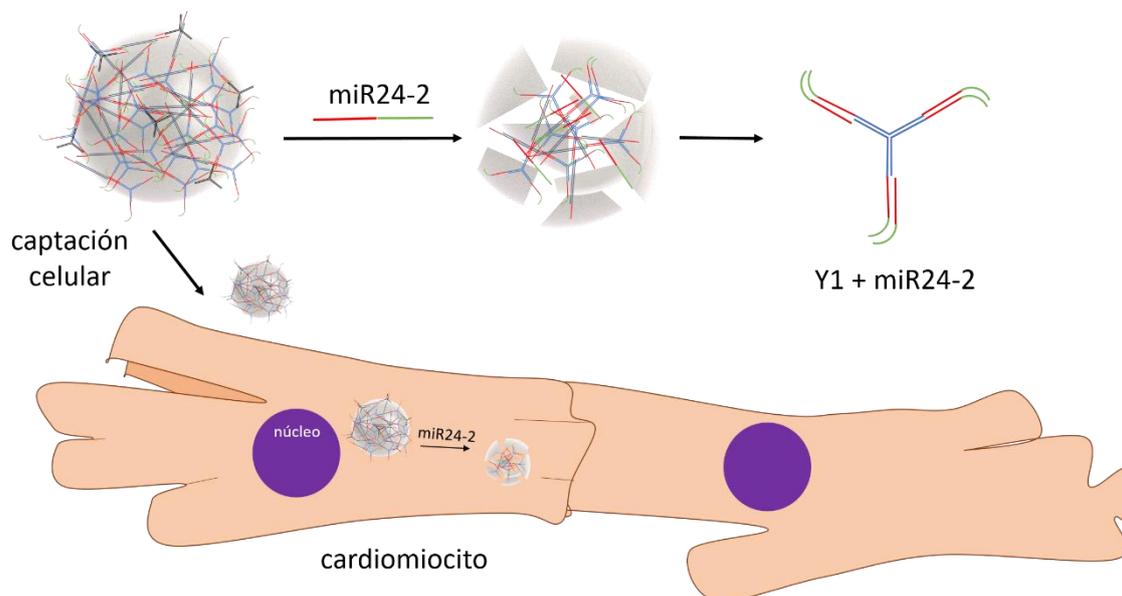


Figura 6 Captura del miRNA miR-24-2-5p por las nanoestructuras en el interior de los cardiomiocitos. La captura del miRNA lleva al desensamblado de las nanoestructuras e Y1 queda unido al mi24-2-5p y el resto de los componentes libres en el citosol.

Cuando los nanotransportadores formadas entran en contacto con el miRNA miR-24-2, el RNA hibridará completamente (22 nucleótidos) por complementariedad de bases con el extremo cohesivo de Y1 que conforma la nanoestructura, desplazando a L3 que se encontraba ya hibridado más débilmente por 10 o 12 nucleótidos (dependiendo de la

versión de la ND). Al captar mayor número de hebras de miR-24-2 y liberar L3 se espera que la nanoestructura se desensamble, dando lugar a Y1 unido al miRNA y el resto de los componentes que forman la nanoestructura queden libres en el citosol celular (Figura 6). Se espera que estos componentes sean finalmente degradados por las nucleasas citosólicas.⁷⁴

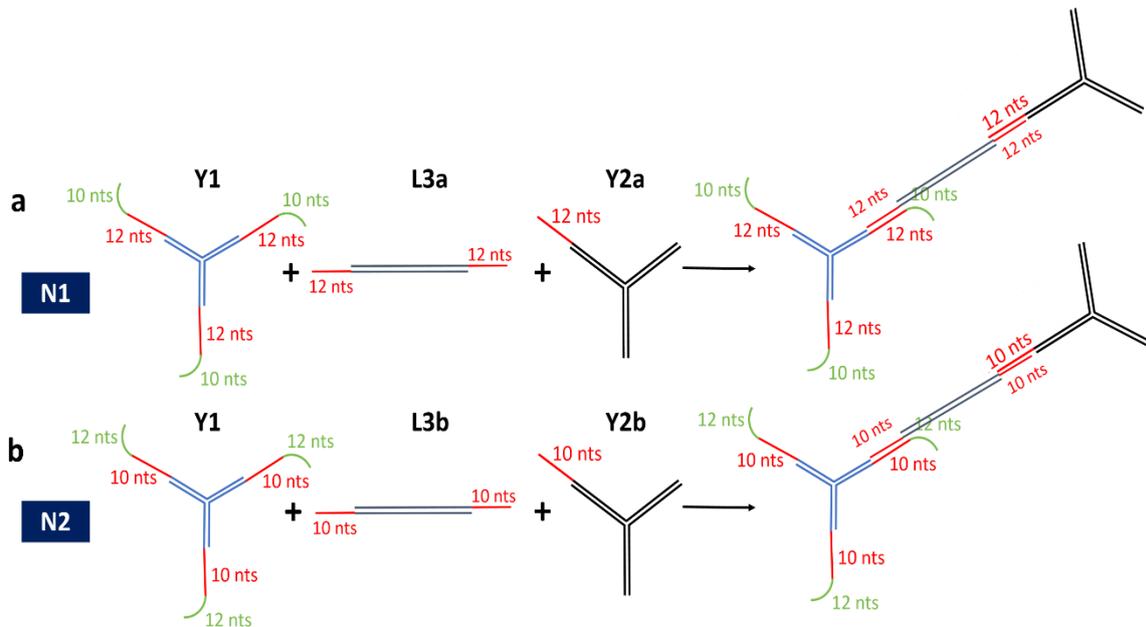


Figura 7 Componentes y ensamblaje de las dos versiones de las nanoestructuras. a. Versión 1 (N1) de la nanoestructura, con 12 nucleótidos que hibridan con L3 (L3a) en la parte interna del extremo de Y1 (líneas rojas). El Y2 de la versión 1 es denominado Y2a y su extremo cohesivo se compone de 12 nucleótidos. b. Versión 2 (N2) de la nanoestructura, con la secuencia de hibridación entre Y1 y L3 (L3b) de 10 nucleótidos (líneas rojas). El Y2 de la versión 2 es denominado Y2b y su extremo cohesivo se compone de 10 nucleótidos.

Se diseñaron dos versiones distintas de nanoestructuras (N1 y N2) que se diferencian en la longitud de hibridación de Y1 con L3 (Figura 7). Se prevé que estas diferencias tengan una influencia significativa a la hora de ensamblar los componentes para formar la ND, dando lugar a una mayor o menor interacción entre los mismos. Además, estas diferencias pueden influir en el momento en el que la nanoestructura entre en contacto con el miRNA para desplazar L3 e hibridar completamente con Y1. En principio se espera que este desplazamiento ocurra más fácilmente si la hibridación entre Y1 y L3 se produce por un número menor de nucleótidos, siendo dicha unión más débil. Por ello, se busca optimizar las nanoestructuras de DNA para que posean un buen ensamblaje y, a la vez, puedan liberarse fácilmente los componentes cuando el miRNA diana está presente. Además, las NDs se diseñaron teniendo en cuenta que para ser capaces de capturar miRNAs en el citoplasma deben cumplir ciertas características: Las hebras de captura deben estar

protegidas de las nucleasas del ambiente intracelular el tiempo suficiente para ejercer su acción, y deben a la vez ser accesibles al miRNA para poder capturarlo y modular su expresión.⁵⁸

En **N1**, L3 hibrida con Y1 por 12 nucleótidos en la parte más interna del extremo del monómero con forma de Y, dejando 10 nucleótidos libres por donde se une el miRNA desplazando a L3 (Figura 7a).

En **N2**, L3 hibrida con Y1 con únicamente 10 nucleótidos, dejando 12 nucleótidos libres en el extremo de Y1 donde se unirá el miRNA (Figura 7b). Esta versión deja 12 nucleótidos en el extremo cohesivo de Y1 para unirse al miRNA, y este mayor número de nucleótidos sin hibridar puede facilitar el desplazamiento de L3 y el desensamblado de la nanoestructura.

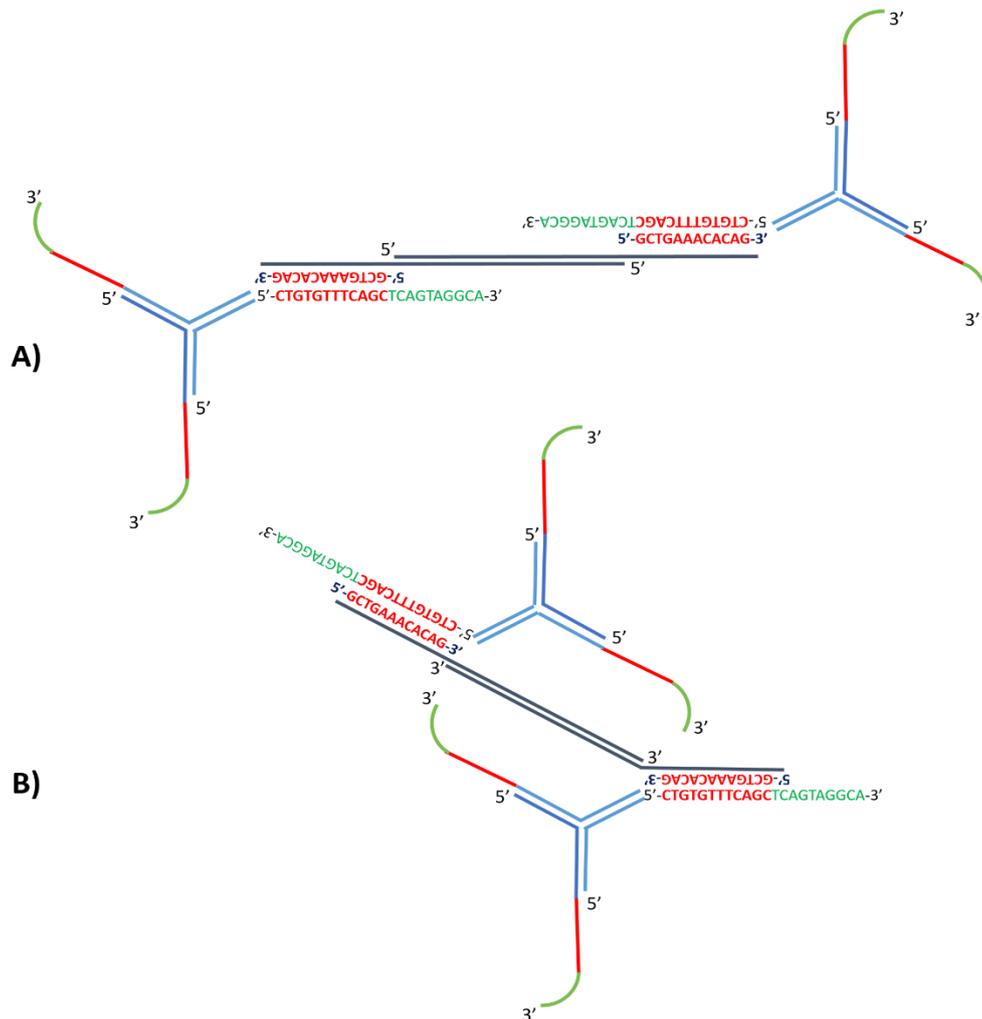


Figura 8 Distintas disposiciones de la unión entre Y1 y la unidad L3/5 en N1. A) Unión entre Y1 y L3 con los extremos cohesivos de L3 en 3'. B) Unión entre Y1 y L5, cuyos extremos cohesivos se encuentran en 5'. Esta conformación parece mostrar un impedimento estérico a la hora de ensamblarse los distintos componentes.

La unidad L3 de N1 se denomina L3a mientras que el componente L3 de N2 es denominado L3b. Estas dos unidades se diferencian en el número de nucleótidos de su extremo cohesivo, siendo 12 nucleótidos en la primera versión y 10 en la segunda. Así mismo, el monómero Y2 de N1 es llamado Y2a, mientras que el de la segunda nanoestructura se denomina Y2b. Estos dos tipos poseen la distinción señalada anteriormente, siendo el extremo cohesivo de Y2a de 12 nucleótidos y de Y2b de 10 nucleótidos.

Con el fin de estudiar la influencia de la disposición del componente de unión L3 a la hora de hibridarse con Y1 para formar la nanoestructura, también fueron diseñadas unidades L3 con los extremos cohesivos en el extremo 5' de la secuencia, denominadas L5. En la Figura 8 se muestra la disposición de los monómeros con esta configuración, en la que se observa cómo la unión de estas unidades L5 puede generar un impedimento estérico que desfavorece la asociación del resto de los componentes.

5.2 Caracterización físico-química de las nanoestructuras

5.2.1 Análisis de la capacidad de ensamblado

La movilidad electroforética de los ácidos nucleicos –o de las NDs en este caso– en condiciones no desnaturizantes depende de su tamaño, forma y el grado de apareamiento de bases que contiene.⁷⁵

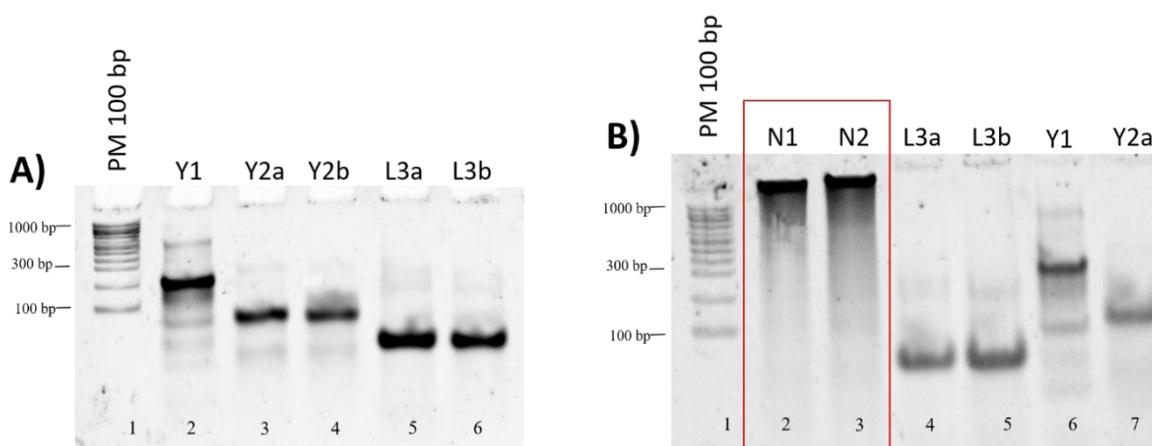


Figura 9 Geles de poliacrilamida de los componentes y las nanoestructuras. PM: Peso Molecular. A) Gel PAGE de las unidades de DNA que conforman las NDs, mostrando una banda de gran intensidad en cada pocillo correspondiente a cada monómero. B) Gel PAGE de las nanoestructuras en los carriles 2 y 3 (marcadas por un rectángulo rojo) y de algunos componentes que las forman. Se muestra el retardo en la movilidad electroforética de las nanoestructuras respecto al resto de unidades de DNA, indicando su correcto ensamblado.

En la Figura 9A se observa la movilidad electroforética de los monómeros que componen las NDs y en la Figura 9B se aprecian N1 y N2 retenidas en el pocillo como estructuras uniformes de gran dimensión, sugiriendo la correcta formación de estas. En las muestras de la Figura 9A se observa una banda mayoritaria de gran intensidad, indicando que el ensamblado de las hebras para dar lugar a los monómeros es correcto y se forma mayoritariamente una estructura unimolecular. La unidad L3a/b, formada únicamente por dos hebras, tiene mayor recorrido debido a su menor tamaño y menor número de pares de bases, seguido de los monómeros Y2a/b y de Y1. Además, en la Figura 9B se muestra un retardo en el gel de las nanoestructuras ensambladas (N1, N2), que quedan retenidas en el pocillo al haber interactuado los componentes que las forman, que avanzan más en el gel.

Para el caso de Y1 también se pueden observar otras bandas de menor intensidad, que se corresponden con formación de estructuras minoritarias entre las hebras que lo componen. Sin embargo, se puede afirmar que la banda de mayor intensidad y que corresponde con el ensamblaje correcto de Y1 es significativamente más abundante en la muestra que el resto de estructuras.

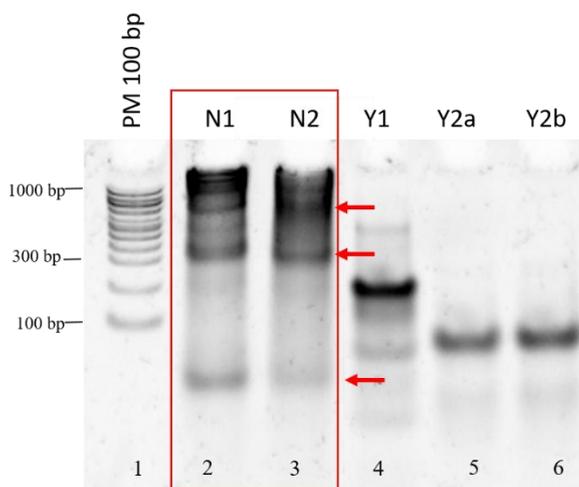


Figura 10 Gel de poliacrilamida de las nanoestructuras ensambladas con la unidad L5. N1 y N2 están recuadradas en rojo en los carriles 2 y 3, y se observa la aparición de diversas bandas intensas (señaladas con las flechas en rojo), lo que sugiere el mal ensamblado de las estructuras de DNA.

También se estudiaron las nanoestructuras análogas ensambladas empleando L5 como monómero de unión (Figura 10). En este caso se puede observar cómo se producen múltiples productos de la interacción entre los componentes que conforman los

nanotransportadores (varias bandas de distinta intensidad). Además, algunas de las bandas presentan una movilidad próxima a los monómeros, lo que indica que la interacción entre los componentes de la nanoestructura no ha sido óptima. Este hecho resalta la importancia del diseño a la hora de plantear la construcción de las nanoestructuras, puesto que la única diferencia entre las estructuras analizadas en las Figuras 9 y 10 es el extremo de la secuencia por la que se unen Y1 y L3/L5.

5.2.2 Estudio del tamaño y morfología

Mediante la técnica de DLS se determinó el diámetro hidrodinámico (Dh) expresado tanto en intensidad como en número. Los resultados mostrados son los expresados en número, ya que ofrecen información precisa acerca del porcentaje de poblaciones de diferente tamaño en la muestra.⁷⁶ Como se observa en la Figura 11, las muestras presentaron una población para Y1 que aumenta de tamaño una vez forman la nanoestructura. Además, las curvas que representan cada medida del DLS son bastante consistentes entre sí, indicando un buen cálculo del tamaño de las unidades de DNA. Las gráficas correspondientes a las estructuras N1, Y2a e Y2b se recogen en Material Suplementario S5.

Muestra	N1	N2	Y1	Y2a	Y2b
Dh (nm)	20,2 ± 2,6	22,7 ± 2,2	8,3 ± 0,5	5,9 ± 0,5	5,9 ± 0,2

Tabla 1 Dh calculado para cada muestra por DLS.

En la tabla 1 se recogen los datos obtenidos para los Dh de las nanoestructuras y sus componentes. Se observa cómo el Dh de N1 y N2 (20,2 ± 2,6 nm y 22,7 ± 2,2 nm respectivamente) es mayor que el calculado para los componentes que las forman (8,3 ± 0,5 nm en el caso de Y1, 5,9 ± 0,5 nm para Y2a y 5,9 ± 0,2 nm para Y2b), lo que confirma que se ha producido la interacción observada en el PAGE (Figura 9).

Muestra	N1 (L3)	N2 (L3)	N1 (L5)	N2 (L5)
Dh (nm)	20,2 ± 2,6	22,7 ± 2,2	10,8 ± 0,3	7,0 ± 0,7

Tabla 2 Diferencias entre el Dh calculado para N1 y N2 ensambladas con L3 y N1 y N2 ensambladas con L5, mostrando un Dh mayor en el primer caso.

Por otra parte, en la tabla 2 se recogen los datos de las nanoestructuras análogas formadas con L5. El Dh de estas nanoestructuras es menor que el mostrado anteriormente y no presenta grandes diferencias con el diámetro de sus componentes individuales, lo que confirma la falta de crecimiento de las nanoestructuras, como se ve por PAGE (Figura 10). De nuevo, este resultado subraya la importancia de diseñar las secuencias y el ensamblaje de las estructuras correctamente, ya que ligeras diferencias en este proceso pueden dar lugar a características y propiedades muy distintas de las NDs. Por ello se concluye que L5, con el extremo cohesivo en el extremo 5' de su secuencia, crea un impedimento estérico al unirse con Y1 que impide la unión del resto de los componentes y desfavorece la polimerización de las nanoestructuras.

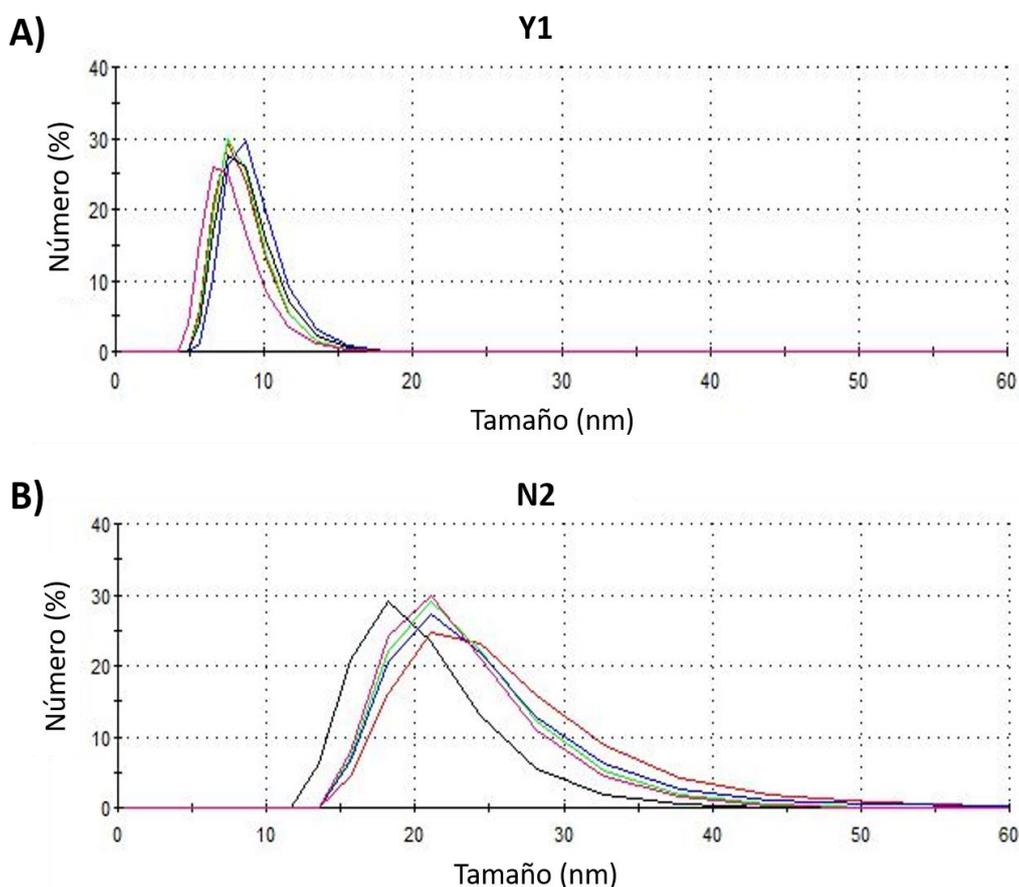


Figura 11 Medidas de DLS para analizar los tamaños (Dh) de Y1 y N2. Cada curva representa una medida de DLS para la misma muestra. A) Gráfica del DLS expresando el número frente al tamaño (Dh) en nanómetros de la unidad de DNA Y1. B) Gráfica del DLS de N1 mostrando un aumento del Dh calculado respecto a la anterior, sugiriendo el ensamblado y crecimiento de la nanoestructura.

Estudios previos encontrados en la literatura determinan que el tamaño ideal de las nanoestructuras para ser internalizadas por las células de manera efectiva debe de

encontrarse entre el rango de 20-200 nm.^{56,77} Además, un tamaño por debajo de 200 nm es deseable para extender el tiempo de circulación en la sangre de los nanotransportadores *in vivo*.⁷⁸ Las nanoestructuras diseñadas en este trabajo cumplen con estos requisitos, con un diámetro hidrodinámico ligeramente superior a 20 nm. En estudios posteriores a este trabajo se plantea modificar las proporciones de las unidades que componen las NDs para intentar obtener un tamaño superior en base a lo descrito en la literatura.⁶⁵

Por otro lado, las imágenes del AFM revelaron que las nanoestructuras tenían una forma redondeada de un tamaño de entre 25-35 nm (Figura 12), lo que está en línea con los resultados obtenidos por la técnica de DLS. Las NDs se observaron dispersas en la superficie de mica o formando pequeños agregados de varias estructuras individuales. Este fenómeno de agregación puede deberse al proceso de preparación y secado de la muestra para el análisis por AFM.

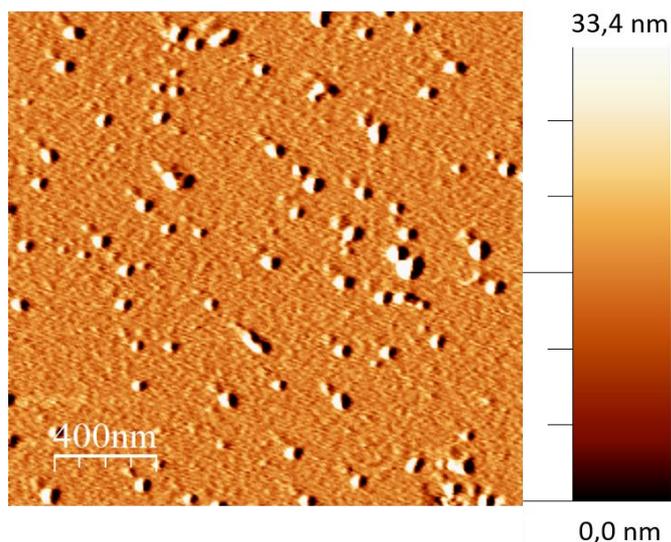


Figura 12 Imagen de N1 por AFM. El tamaño de la imagen es de 2.0 μm x 2.0 μm .

En conclusión, los resultados obtenidos por las técnicas descritas anteriormente (PAGE, DLS y AFM) indican que los nanotransportadores se ensamblan aumentando su tamaño respecto a los monómeros que los componen y se obtienen estructuras de tamaño homogéneo dentro del rango establecido para su uso en nanomedicina.

5.2.4 Determinación de la estabilidad térmica

En la Figura 13 se muestra la curva de desnaturalización de Y1, señalando la derivada de la curva de la desnaturalización en azul y realizando un ajuste de Gauss expresando la varianza en función de sigma (σ). Este valor de sigma indica el rango de temperaturas a

las cuales tiene lugar la desnaturalización de las nanoestructuras, de manera que a mayor valor de sigma mayor es el rango de temperaturas, y menos abrupto es el proceso de desnaturalización. Esta técnica permite conocer la Tm de cada muestra para caracterizar su estabilidad térmica. Las gráficas correspondientes a las estructuras N1, N2, Y2a e Y2b se recogen en Material Suplementario S6.

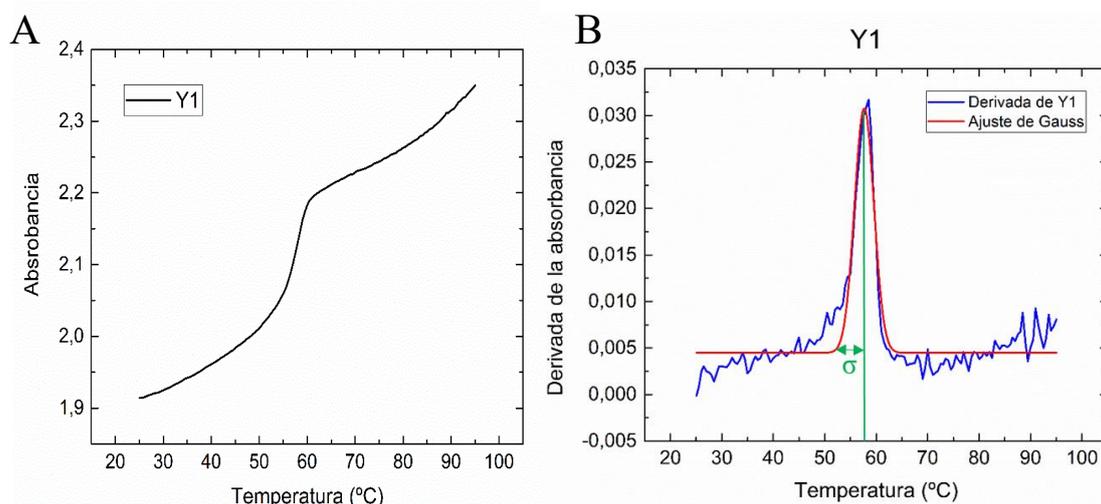


Figura 13 Determinación de Tm de Y1. A) Curva de desnaturalización mostrando la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura (°C). B) Ajuste de la derivada de la curva de desnaturalización (en azul) mediante la función de Gauss (en rojo). La representación de sigma está señalada en verde.

Procesando los datos se obtuvieron los valores de Tm para las N1 y N2 y los monómeros que las componen Y1, Y2a e Y2b (Tabla 3). Se observa que la desnaturalización de los nanotransportadores ocurre en dos etapas (Tm1 y Tm2): es de suponer que se corresponden con las Tm de sus componentes (Y1 e Y2 en la primera etapa y L3 en la segunda).

Muestra	N1		N2		Y1	Y2a	Y2b
	Tm1	Tm2	Tm1	Tm2			
Tm (°C)	56,3	69	57,4	70,2	57,7	59,4	59,2
Sigma (σ)	2	1,7	1,8	1,8	0,9	1,1	2,1

Tabla 3 Valores de Tm y σ de las NDs y componentes. Tm1 y Tm2 de N1 y N2 indican las dos etapas de desnaturalización de las estructuras. El valor de Tm de L3 no pudo determinarse experimentalmente pero se estimó con la aplicación existente en la web de IDT obteniendo una Tm de 70,8 °C.

Además, los valores de σ obtenidos son bajos, lo que indica que el proceso de desnaturalización de estas muestras es abrupto y ocurre entre un rango de temperaturas muy específico. Este hecho indica que las nanoestructuras de DNA no se desensamblan o desnaturalizan poco a poco, sino que se mantienen estables hasta llegar a una temperatura concreta.

En conclusión, los resultados señalan que las nanoestructuras son estables en condiciones fisiológicas (37°C), por lo que tienen potencial para ejercer su acción en el interior celular y constituir terapias miRNA *in vivo* fiables.

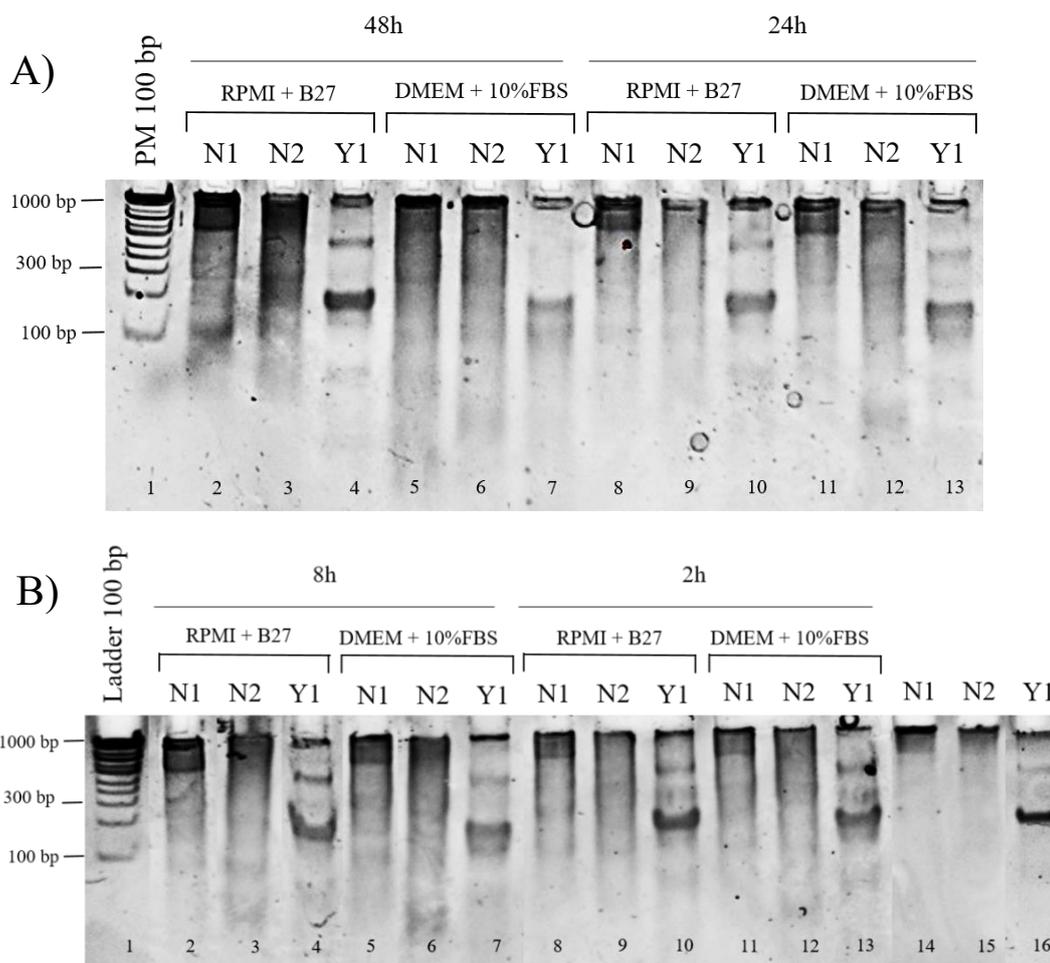
5.3 Caracterización biológica de las nanoestructuras

5.3.1 Caracterización de la estabilidad en medio celular

Los resultados sugieren que al aumentar el tiempo de incubación en DMEM con 10% FBS, aumenta la degradación de las NDs y de Y1 (Figura 14). La intensidad relativa de las bandas de alto peso molecular correspondientes a los nanotransportadores disminuye con el tiempo de incubación en el medio, y aumentan las bandas inespecíficas creando una banda difusa procedente de la desintegración de la estructura debido a la acción de las nucleasas presentes en el suero. El medio de cultivo de las células HEK293, empleadas para experimentos posteriores, contiene 10% de FBS, lo que equivale a una actividad DNAsa I de más de 256 U/L.⁷⁹ Las nanoestructuras incubadas en medio RPMI con B27 (medio de mantenimiento de iCM) también sufren una degradación con el tiempo, observando el fenómeno descrito anteriormente.

De modo cualitativo, no se observan grandes diferencias entre la estabilidad de N1 y N2. Cabe indicar que no es posible cuantificar de modo preciso la degradación de las NDs, pues al encontrarse retenidas en el pocillo inicial resulta complejo medir la pérdida de intensidad de la banda correspondiente. Para salvar esta limitación, se podría analizar la estabilidad de las nanoestructuras en gel de agarosa, que permite separar estructuras de mayor tamaño.

Por otro lado, se observa que ocurre una degradación más rápida y significativa en el caso de Y1 que en las nanoestructuras, difuminándose la banda característica del monómero al poco tiempo de incubación en el medio.



14 Geles de electroforesis mostrando la degradación de las nanoestructuras e Y1 en medio de cultivo a distintos tiempos. A) Gel de las NDs e Y1 incubadas en RPMI con B27 y DMEM con 10% de FBS durante 48h y 24h. B) Gel de las NDs e Y1 incubadas en RPMI con B27 y DMEM con 10% de FBS durante 8h, 2h y sin incubación.

La degradación de Y1 fue además cuantificada como una pérdida en la intensidad de la banda correspondiente durante el tiempo de incubación en los dos medios de cultivo (Figura 15). En concreto, se calcula que Y1 es un 22% más estable en medio RPMI con B27 que en DMEM con 10% FBS a las 8 horas de incubación en medio. Esto puede deberse a que el medio empleado en el cultivo de los iCM –RPMI con B27– no contiene suero y por tanto, no contaría en principio con la concentración de nucleasas que sí están presentes en el caso anterior. Sin embargo, la degradación de las estructuras también ocurre en este medio, lo que no excluye la presencia de nucleasas o la de otros componentes que puedan degradarlas. Este proceso se tendrá que analizar en más detalle.

Además, se observa como entre 2h y 8h de incubación en medio ocurre la mayor parte de la degradación, descendiendo el porcentaje de Y1 sin degradar un 50% entre estas

horas en RPMI con B27 y un 66% en DMEM con 10% de FBS. El aumento de la intensidad de la banda a 48h en RPMI con B27 probablemente se deba a un cambio en su manipulación o a la evaporación del PBS concentrando la muestra. Por tanto, se deberán realizar más análisis para tener una medida fiable de la degradación de Y1.

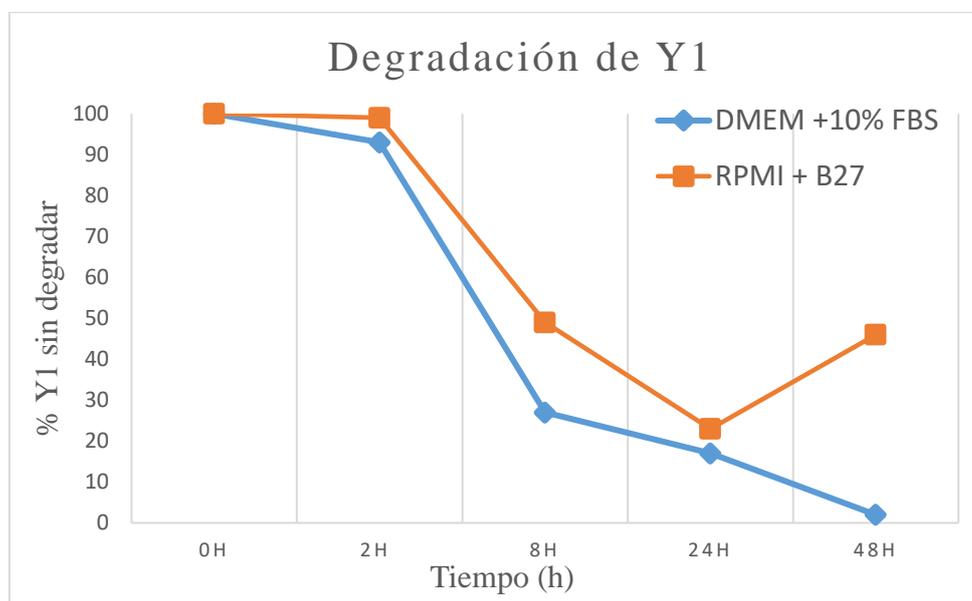


Figura 15 Degradación de Y1 con el tiempo en medio de cultivo. La gráfica muestra el porcentaje de Y1 sin degradar que se calcula a los distintos tiempos de incubación en medio DMEM con 10% de FBS (en azul) y en RPMI con B27 (en naranja).

El hecho de que cualitativamente Y1 sufra una degradación más pronunciada en medio que las NDs indica que éstas presentan mayor estabilidad frente a degradación, lo que podría deberse al impedimento estérico que se da en su agregación y que dificulta el acceso –y por tanto la actividad– de las endonucleasas u otros componentes presentes en el medio.

Se puede afirmar que las estructuras son biodegradables y, vista su detección intracelular más adelante, que cuentan con tiempo suficiente para internalizarse en las células y ejercer su acción antes de que se produzca su degradación.

5.3.2 Estudio de la capacidad de captura del miRNA

Los resultados de la incubación de las estructuras con las secuencias del miR-24-2-5p (miDNA y miRNA) manifiestan que las NDs son capaces de unirse específicamente al miRNA y desensamblarse (Figura 16). Cuando N1 y N2 entran en contacto con el miRNA, en el gel aparecen varias bandas de distinta intensidad que sugieren la disociación de la estructura y la formación de agregados entre el miRNA e Y1 y entre los

componentes que las forman. La banda correspondiente a esta unión entre el miRNA e Y1 aparece a la misma altura que la banda de 400 bp del marcador de peso molecular, mientras que la unión con el miDNA aparece retardada (~500 bp).

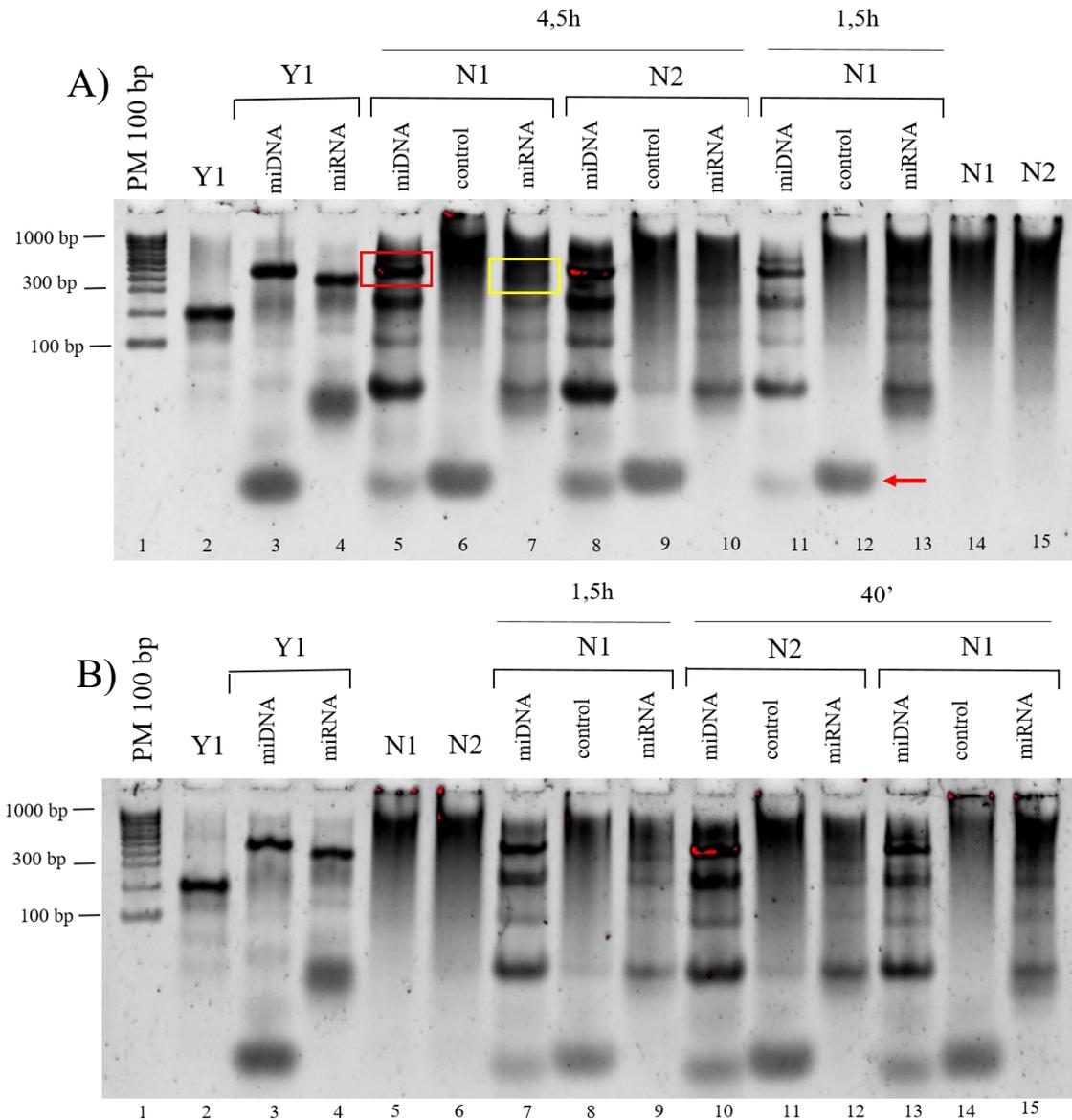


Figura 16 Gel de electroforesis de la captura del miRNA por las NDs y su consiguiente desensamblado a distintos tiempos. Los geles muestran la incubación de las nanoestructuras e Y1 con el miRNA miR-24-2-5p, con el miDNA complementario y con un oligonucleótido control sin complementariedad de bases. A) Gel de la incubación de N1, N2 e Y1 con los oligonucleótidos correspondientes durante 4,5h y 1,5h. Señalado con una flecha en rojo se encuentra el oligonucleótido control que no se ha unido a las nanoestructuras y no ha modificado su conformación. En el recuadro en amarillo se señala la banda correspondiente a la unión de Y1 de las nanoestructuras con miR-24-2-5p. En el recuadro en rojo se señala la banda correspondiente a la unión de Y1 de las nanoestructuras con el miDNA complementario.

Se puede confirmar que Y1 queda unido al miRNA ya que la movilidad electroforética de esta muestra disminuye respecto a la de Y1 solo, que se halla a la misma altura que la banda de 200 bp del marcador. Así mismo, esta unión da lugar a un agregado mayoritariamente unimolecular, ya que únicamente se observa una banda de gran intensidad, y el miDNA que se encontraba en exceso aparece al final del gel.

La unión de las NDs con el miDNA y el miRNA dan lugar al mismo patrón de bandas de desensamblado, aunque son más intensas para el miDNA puesto que este se encuentra más concentrado.

Se afirma que los nanotransportadores con hebras anti-miR-24-2-5p se unen específicamente a la secuencia de miDNA/miRNA complementaria ya que al ser incubadas con un oligonucleótido control (de secuencia no complementaria) no se observa desensamblado, y estas muestras dan lugar al mismo resultado que las nanoestructuras solas con el oligonucleótido sin unir observándose al final del gel.

En el gel no se observan diferencias entre la capacidad de captura de N1 y N2, y para analizar estas diferencias se deben aplicar otras técnicas más sensibles como qPCR. Además, el gel revela que 40 minutos de incubación de las nanoestructuras con el miRNA es suficiente para que éstas se desensamblen y capturen el miR-24-2-5p.

En conclusión, se han conseguido diseñar, sintetizar y caracterizar estructuras de DNA con una estrategia sencilla basada en el apareamiento de bases de los oligonucleótidos, de un tamaño óptimo para la internalización celular, con estabilidad térmica y biodegradables para ejercer su acción en condiciones fisiológicas y con potencial capacidad de interactuar con miR-24-2-5p y constituir terapias miRNA cardíacas.

5.4 Determinación *in vitro* de la actividad y citotoxicidad de las nanoestructuras

5.4.1 Estudio del nivel de marcaje de los nanotransportadores e internalización celular

5.4.1.1 Determinación del nivel óptimo de marcaje fluorescente

Los resultados de la citometría de flujo permiten evaluar cuantitativamente la cantidad y eficiencia de internalización celular de las NDs con distinto grado de marcaje. La Figura 17 muestra el porcentaje de células fluorescentes –que han internalizado la nanoestructura– según el porcentaje de hebras de DNA marcadas con Cy3. Las mismas condiciones se muestran para el monómero funcional Y1.

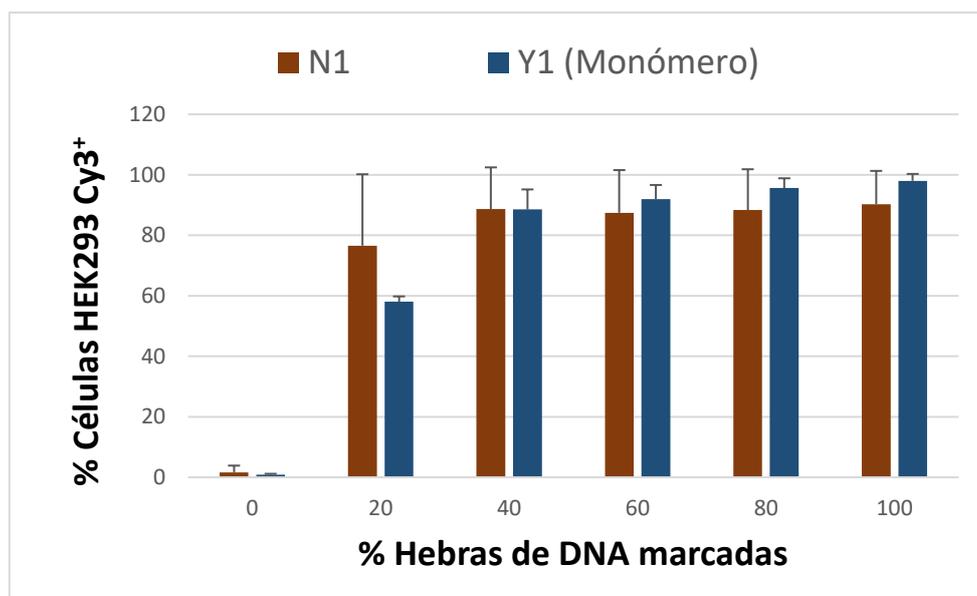


Figura 17 Estudio de la eficiencia de internalización celular de las nanoestructuras. Se muestran los histogramas de la cuantificación de la internalización de N1 y del monómero Y1 según el porcentaje de hebras de DNA marcadas con el fluoróforo Cy3. Este análisis ha sido realizado 4 veces (n=4).

No se observan diferencias significativas entre la capacidad de internalización celular entre el monómero Y1 a $1\mu\text{M}$ y N1 (composición $1\mu\text{M}$ Y1, $0,25\mu\text{M}$ Y2, $1,6\mu\text{M}$ L3), a pesar de que varían en su tamaño y forma. Solo cuando la cantidad de marcaje de N1 y Y1 alcanza el 20% se aprecia un descenso relevante. Este hecho sugiere que la morfología de las NDs no es tan determinante en la captación celular en HEK293 y que todas las células son capaces de captar las nanoestructuras e Y1 a la concentración testada. Dada la facilidad de transfección de las células HEK293, estudios con concentraciones inferiores de NDs se llevarán a cabo en el futuro con el fin de aclarar el grado de marcaje mínimo necesario que permita detectar correctamente la internalización de Y1 y N1 *in vitro*, y si existen diferencias de internalización entre las dos formas.

A modo preliminar con tres concentraciones distintas de Y1 y todos los grados de marcaje se detecta que, con bajos porcentajes de marcaje (10-20%), el número de células Cy3⁺ aumenta con la concentración (Figura 18). Por encima del 20% de marcaje, la concentración más baja testada ($0,25\mu\text{M}$ de Y1) ya satura la transfección de HEK293. Es necesario por tanto testar concentraciones todavía más limitantes de NDs para determinar el nivel óptimo de marcaje para los estudios *in vitro* con iCM.

En definitiva, los resultados actuales sugieren que un 40% de hebras de DNA marcadas en las nanoestructuras podría ser un porcentaje de fluorescencia suficiente para detectar

la presencia de N1 en el interior celular de células HEK293 incluso a concentraciones bajas. Este dato orienta el diseño de experimentos similares en otras líneas celulares como en iCM.

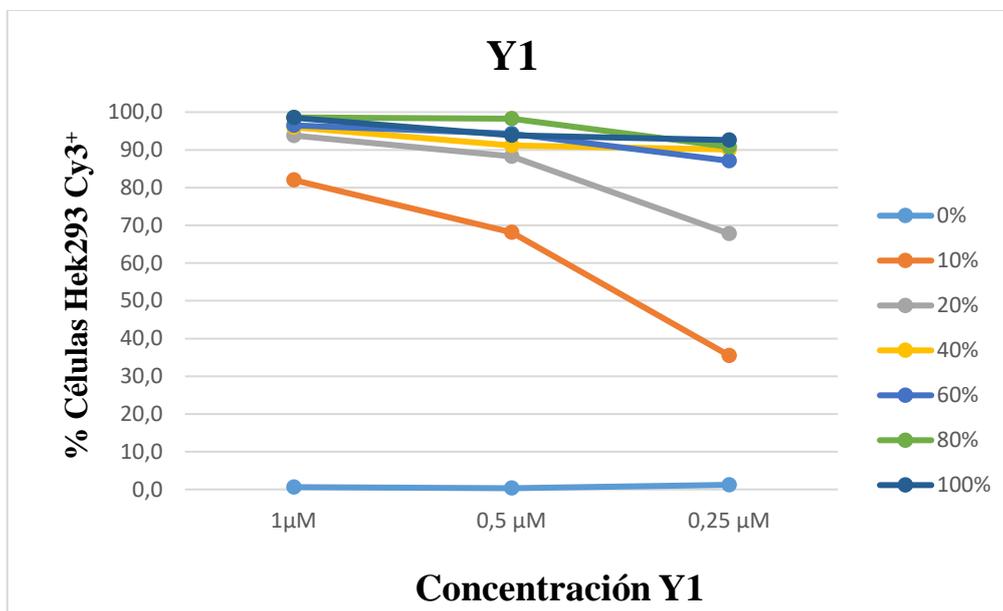


Figura 18 Estudio de la eficiencia de internalización celular de los nanotransportadores en función de la concentración. La gráfica muestra el porcentaje de células que han internalizado Y1 marcado con distintos porcentajes de Cy3 (0-100%) en función de la concentración del monómero. Este análisis ha sido realizado 1 vez (n=1).

Por último, se puede afirmar que las células que presentan fluorescencia tienen las NDs internalizadas en el interior celular y no adheridas a su superficie, como queda confirmada en el punto 4.4.1.2 por microscopía confocal.

5.4.1.2 Microscopía confocal (CLSM) y microscopía de fluorescencia

Los resultados de CLSM permiten observar los núcleos celulares (en azul), la proteína SERCA2 (en verde) expresada en el retículo sarcoplásmico de los miocitos y N1 marcada con Cy3 (en rojo) (Figura 19A).

Las imágenes 3D que se obtienen de este método confirma que las nanoestructuras están en el interior y no adheridas a la superficie celular. La cantidad de marcaje utilizado en estos ensayos iniciales (100% del oligonucleótido en Y1) es alta y las imágenes muestran un alto grado de saturación. Aun así, se observa que N1 ha sido internalizada por los iCM y se dispone formando agregados de varias estructuras individuales (en rojo) alrededor del núcleo. En estudios previos también se había encontrado esta disposición para nanoestructuras de DNA similares.⁵⁸ Análisis futuros irán dirigidos a determinar con

mayor precisión la localización subcelular de N1 y en concreto se analizará la ausencia de interacción con la vía lisosomal, que degradaría la nanoestructura.

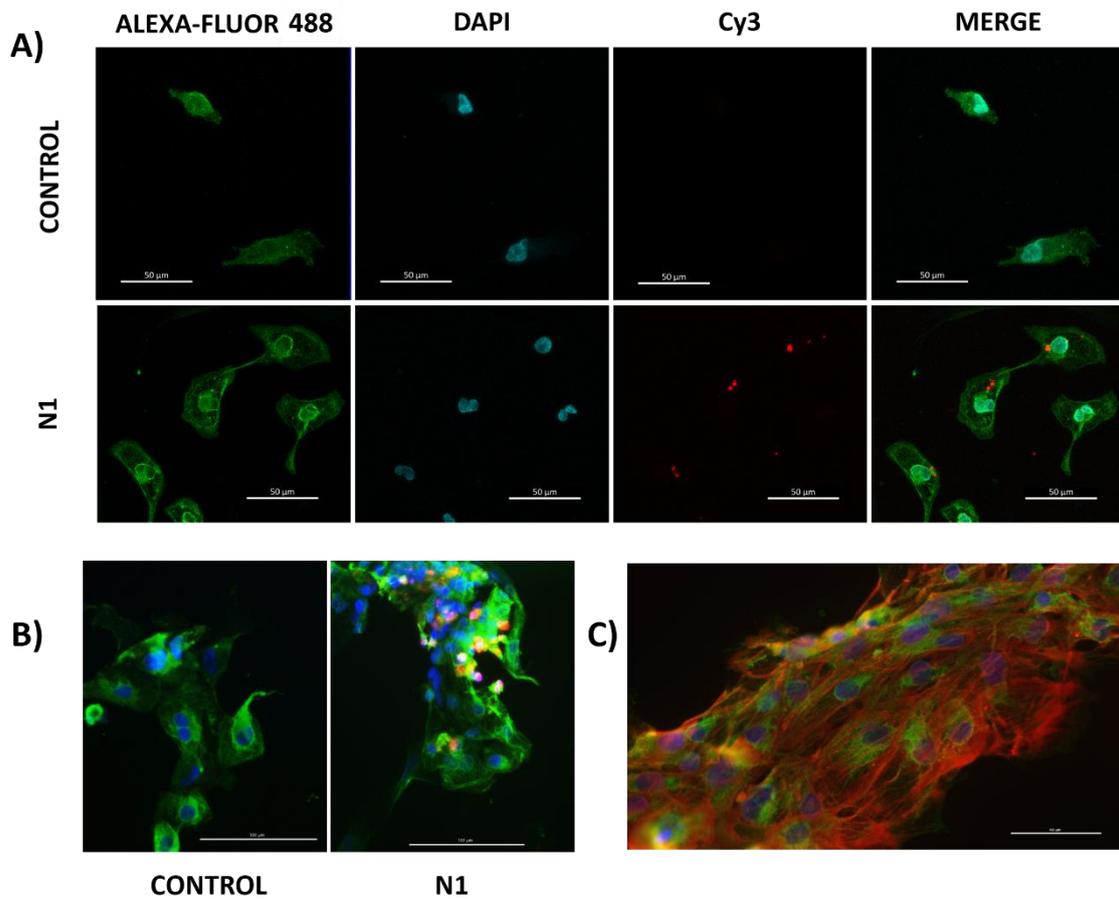


Figura 19 Internalización de las nanoestructuras en iCM. A) Imágenes de CLSM. Alexa fluor 488 marca la proteína SERCA2 (en verde) y DAPI los núcleos celulares (en azul). N1 se encuentra marcada con el fluoróforo Cy3 (en rojo). La barra de escala representa 50 µm. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia con la misma tinción que A). La barra de escala representa 100 µm. C) Imagen de microscopía de fluorescencia de la muestra control. La muestra presenta la misma tinción que en A), y Alexa fluor 633 marca la proteína troponina (en naranja). La barra de escala representa 100 µm.

En la Figura 19A se manifiesta que la muestra control –iCM sin nanoestructuras– no presenta fluorescencia, mientras que sí ocurre en las muestras tratadas con N1 marcada con el fluoróforo Cy3. A diferencia de en HEK293, la eficiencia de transfección para un marcaje del 100% de N1 no se revela completa. Sólo un porcentaje de iCM integran las NDs, lo que sugiere que métodos de direccionamiento para la internalización específica de los nanotransportadores –como la internalización mediada por ligandos cardio específicos– podrían facilitar y acelerar este proceso.

En las imágenes del microscopio de fluorescencia (Figura 19B) también se observa la presencia de N1 en los iCM. Esta técnica se complementa con la anterior, puesto que las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia no permiten discernir si las nanoestructuras se encuentran adheridas a la membrana celular o han sido internalizadas por los iCM. Sin embargo, la disposición de las NDs en el interior celular ha quedado confirmada anteriormente.

Además, en todas las células se aprecia la proteína troponina (Figura 19C), lo que significa que la diferenciación celular desde iPSC a cardiomiocitos ha sido exitosa. La troponina es una proteína específica de este tipo celular, por lo que se puede afirmar que realmente se han obtenido y se han realizado los experimentos en células cardiacas.

Los resultados de internalización permiten concluir que las nanoestructuras diseñadas presentan una eficiente internalización celular en HEK293 y más reducida en iCM humanos, pero constituyen una potencial plataforma para la regulación de genes y terapia miRNA.

5.4.2 Ensayos de viabilidad

La viabilidad de las células HEK293 se evaluó por citometría de flujo tiñendo las células con PI. El PI es un fluorocromo capaz de penetrar en la membrana de las células dañadas, intercalarse entre la doble cadena de los ácidos nucleicos y emitir fluorescencia bajo la correcta excitación, por lo que es un buen marcador de muerte celular.⁸⁰

Los resultados sugieren que ni los nanotransportadores ni el monómero Y1 presentan citotoxicidad en las células HEK293 a ninguna de las concentraciones testadas, incluso a una concentración de DNA de 100 µg/mL (Figura 20). Además, se puede afirmar que aumentar la concentración de DNA de las nanoestructuras no tiene efectos significativos en la viabilidad de las células, ya que en ningún caso la viabilidad desciende por debajo del 85%. Para observar una citotoxicidad significativa, la viabilidad celular debería presentar una disminución de más del 30%, según las recomendaciones de la ISO 10993-5.^{81,82} Este límite se encuentra indicado en rojo en la Figura 20.

En conclusión, ninguna nanoestructura ni el monómero Y1 presentan toxicidad celular. Esto hecho demuestra su gran biocompatibilidad, lo que las sitúa como potenciales herramientas de la terapia miRNA.

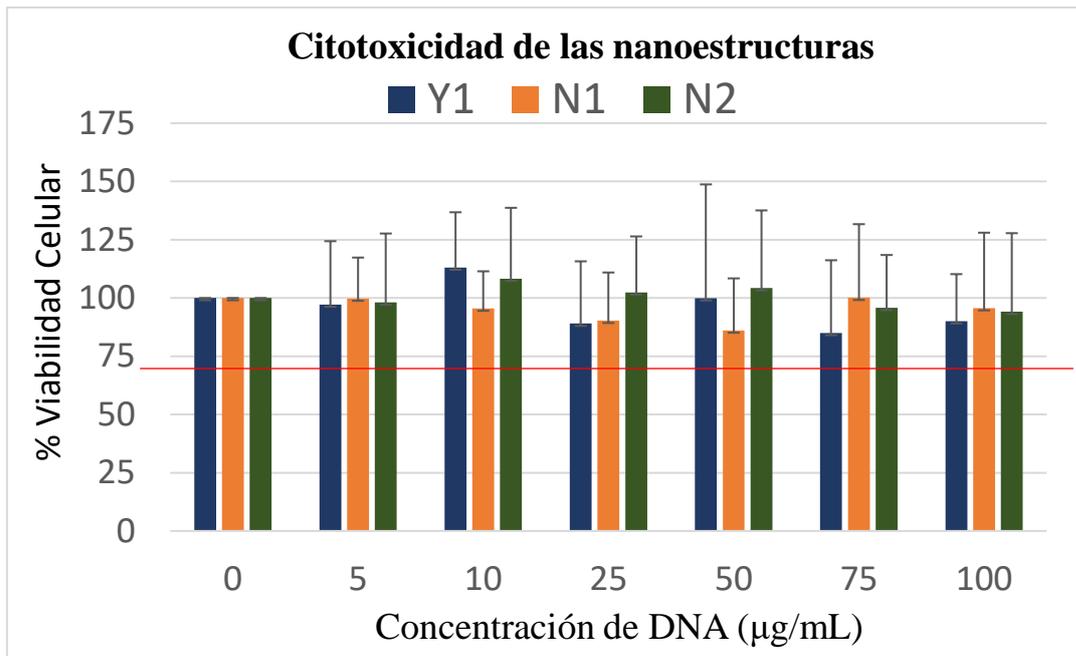


Figura 20 Citotoxicidad de las nanoestructuras. Gráfica representando la viabilidad celular respecto a la concentración de DNA de Y1 y las NDs. La línea roja representa el 70% de viabilidad, por debajo del cual se considera un efecto de citotoxicidad significativo. Este análisis ha sido realizado 3 veces (n=3).

5.4.3 Estudio de la expresión génica de *ACTN2* y *SERCA2a*

La capacidad de los nanotransportadores de capturar el miRNA miR-24-2-5p en cardiomiocitos se analizó evaluando la expresión del mRNA de sus genes diana: *ACTN2* y *SERCA2a*. Las células HEK293 no expresan *SERCA2a* y *ACTN2*, por lo que el efecto de N1 no se pudo testar en esta línea celular.

Durante el envejecimiento cardiaco aumenta la expresión de miR-24-2-5p, disminuyendo la expresión de sus genes diana y por tanto de las proteínas para las que codifican.²² Este hecho puede dar lugar a cardiopatías como la hipertrofia cardiaca, donde ha sido comprobada la sobreexpresión de este miRNA.³⁸ Si las NDs desarrollaran su acción eficazmente, serían capaces de capturar y disminuir la cantidad de miR-24-2-5p, aumentando así la expresión de *ACTN2* y *SERCA2a* para obtener efectos terapéuticos.

Los resultados de la qPCR muestran gran variabilidad (Figura 21). En el experimento uno, se observa un notorio aumento de la expresión tanto de *ACTN2* como de *SERCA2a* tras el tratamiento con N1. En este caso, la expresión de los genes muestra mayor aumento tras el tratamiento con la nanoestructura en lugar del tratamiento con Y1, que para *SERCA2a* no parece tener efecto. Este hecho puede deberse a que se necesite una estructura compleja de DNA con múltiples hebras de captura (como es N1) para capturar

eficazmente el miRNA. En el experimento dos no se observaron cambios en la expresión de los genes respecto al control, y en el experimento tres se percibe un aumento de *ACTN2* tras el tratamiento con N1 pero *SERCA2a* se muestra casi invariable, mientras que no se observan apenas diferencias en el tratamiento con Y1 y N2.

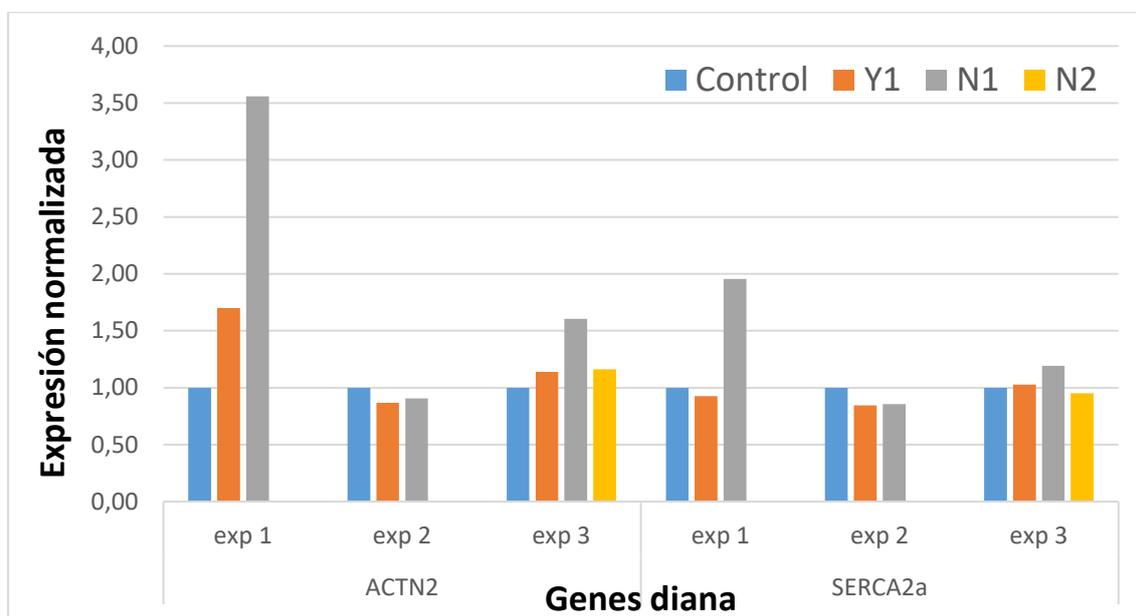


Figura 21 Variación de la expresión de *ACTN2* y *SERCA2* tras el tratamiento con las nanoestructuras. La grafica muestra la variación en la expresión normalizada del mRNA de *ACTN2* y *SERCA2a*, dos dianas de miR-24-2-5p en iCM. Las células se trataron con Y1 y N1 en tres experimentos, mientras que solo en un caso se trataron con N2.

La razón de la variabilidad de los experimentos es probablemente debida a la combinación de la baja eficiencia de transfección de las nanoestructuras en iCM (como se observa en la Figura 19) y la alta expresión de los genes diana *SERCA2a* y *ACTN2* en estas células. Por esta razón, probablemente se requieran niveles de internalización más altos de N1 para que el efecto se aprecie de manera robusta a nivel del conjunto del cultivo celular. La eficacia de internalización celular de las NDs se ha cuantificado en HEK293 por encima del 80% (Figuras 17-18), pero está pendiente analizarla en iCM.

Como se ha expuesto, en los resultados de microscopía confocal y de fluorescencia se aprecia que no todas las células internalizan las NDs, por lo que no todas sufren el tratamiento que disminuye la cantidad de miR-24-2-5p. Para salvar esta limitación se podría aumentar la concentración de nanoestructuras en el cultivo. Sin embargo, la citotoxicidad de los nanotransportadores no ha sido estudiada en iCM, y una variación en la composición de su medio de cultivo –creada por la adición de nanoestructuras diluidas en PBS– podría desencadenar una disminución de la viabilidad celular.

Una solución es separar las células que han internalizado las NDs de las que no, para solo analizar la variación de la expresión de aquellas que las hayan incorporado. Esto se podría realizar mediante la técnica de separación celular FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), capaz de clasificar las células de una muestra de varias poblaciones.⁸⁴

La capacidad de las NDs para capturar el miR-24-2-5p también podría ser analizada estudiando el cambio en la cantidad de este miRNA en las células mediante RT-qPCR, si bien la retrotranscripción de miRNAs añade complicaciones al protocolo.⁸⁵ Por otro lado, no se ha determinado de qué manera miR-24-2-5p regula la expresión de sus genes diana, en concreto *ACTN2* y *SERCA2a*. Como se ha expuesto anteriormente, los miRNA tienen dos modos principales de actuación: degradar el mRNA diana o inhibir su traducción.²⁶ En el caso de que miR-24-2-5p modulara la expresión de sus genes diana inhibiendo su traducción, el cambio de la expresión de estos genes a nivel de RNA podría no ser visible por RT-qPCR si no sólo a nivel de proteína. Para ello, se llevarán a cabo análisis por Western-blot.⁸⁶

En conclusión, es necesario realizar un estudio más detallado complementándolo con otras técnicas para poder confirmar que las NDs son capaces de disminuir la cantidad de miR-24-2-5p y por tanto aumentar la expresión de sus genes diana *ACTN2* y *SERCA2a*, lo que supondría un efecto terapéutico en patologías relacionadas con el envejecimiento cardiaco en las que este miRNA se encuentra sobreexpresado.

En definitiva, los resultados obtenidos mediante PAGE, DLS, AFM y espectrofotometría indican que se han conseguido diseñar y caracterizar nanotransportadores de DNA estables en condiciones fisiológicas y de un tamaño óptimo para la internalización celular. Esta última característica se confirma mediante el análisis por citometría de flujo en células HEK293, que debido a su gran facilidad de transfección no revelan diferencias entre la eficiencia de internalización del monómero Y1 y la nanoestructura N1 a la concentración testada. Las técnicas de microscopía concluyen con que la internalización celular de las NDs en iCM humanos es más reducida, pero se consiguen detectar intracelularmente. Este hecho, sumado a los resultados de incubación de las estructuras en medio celular, revela que los nanotransportadores son biodegradables pero cuentan con tiempo suficiente para internalizarse en las células (tanto HEK293 como iCM) y ejercer su acción antes de que se produzca su degradación. Esta acción se basa en su capacidad de interactuar con miR-24-2-5p, comprobada a través de los análisis de

incubación con el miRNA, y en su biocompatibilidad, evidenciada en los estudios por citometría de flujo en HEK293.

Teniendo esto en cuenta, y aunque no se ha conseguido confirmar que las NDs diseñadas sean capaces de disminuir la cantidad de miR-24-2-5p, los nanotransportadores de DNA se muestran como potenciales herramientas de las terapias miRNA cardiacas.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se han conseguido diseñar y caracterizar dos NDs con segmentos anti-miR-24-2-5p con potencial para entregar terapias miRNA en iCM humanos y, en concreto, para modular la cantidad del miRNA miR-24-2-5p y su efecto pro-envejecimiento a nivel celular en el corazón. En concreto se extraen las siguientes conclusiones:

- El ensamblado de las hebras y componentes para dar lugar a las NDs es correcto y se forman a través de un procedimiento rápido y sencillo.
- El correcto diseño de las hebras de DNA que componen las nanoestructuras es esencial para asegurar una buena formación de las mismas.
- Las estructuras presentan un tamaño adecuado que permita una internalización celular efectiva y les permita extender su tiempo de circulación en la sangre *in vivo*.
- Los nanotransportadores de DNA son estables en condiciones fisiológicas (37°C), por lo que tienen potencial para ejercer su acción en el interior celular y constituir terapias miRNA *in vivo* fiables.
- Estas estructuras son biodegradables, lo que reduce la toxicidad potencial que pueden tener en las células en comparación con otros materiales de transporte de terapia miRNA como nanopartículas inorgánicas o polímeros sintéticos. No obstante, presentan la estabilidad adecuada frente a la degradación en medio para llevar a cabo su función.
- Las NDs diseñadas tienen la capacidad de unirse específicamente a miR-24-2-5p y desensamblarse.
- Las células (tanto HEK293 como iCM) son capaces de internalizar las nanoestructuras, que se disponen formando agregados perinucleares.
- No se observan diferencias significativas entre la capacidad de internalización en HEK293 entre el monómero Y1 y la nanoestructura N1, a pesar de que varían en su tamaño y forma.
- Un marcaje de fluorescencia superior al 20% de las nanoestructuras parece suficiente para realizar futuros estudios *in vitro*.
- Ni los nanotransportadores de DNA ni el monómero Y1 presentan toxicidad celular en HEK293, demostrando su biocompatibilidad que las sitúa como potenciales herramientas de la terapia miRNA.

CONCLUSIONS

In this work, two DNA nanostructures have been designed and characterized with anti-miR-24-2-5p segments and with the potential to deliver miRNA therapies in human myocytes to modulate the amount of miR-24-2-5p and its pro-aging effect at a cellular level in the heart. Specifically, the following conclusions are drawn:

- The strands and components assembly to give rise to the DNA nanostructures is correct and structures are formed through a quick and simple procedure.
- The correct design of the DNA strands that make up the nanostructures is essential to ensure their proper formation.
- The structures have the correct size that allows effective cell internalization and allows them to extend their circulation time in the blood *in vivo*.
- DNA nanostructures are stable under physiological conditions (37°C), so they have the potential to exert their action inside the cell and constitute reliable *in vivo* miRNA therapies.
- These structures are biodegradable, which reduces the potential toxicity in cells compared to other miRNA therapy carrier materials such as inorganic nanoparticles or synthetic polymers. However, they have adequate stability against degradation in the cell media to carry out their function.
- Engineered DNA nanostructures have the ability to specifically bind to miR-24-2-5p and disassemble.
- Cells (both HEK293 and iCM) are capable of internalizing nanostructures, which are arranged forming perinuclear aggregates.
- No significant differences are observed between the internalization capacity in HEK293 between the Y1 monomer and the N1 nanostructure, although they vary in size and shape.
- A fluorescence labeling greater than 20% of the nanostructures seems enough for future *in vitro* studies.
- Neither the DNA nanostructures nor the Y1 monomer show cellular toxicity in HEK293, demonstrating their biocompatibility that places them as potential tools for miRNA therapy.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Home - World Heart Federation. [Internet] (Accessed: June 2021) <https://world-heart-federation.org/>.
2. Gude, N. A., Broughton, K. M., Firouzi, F. & Sussman, M. A. Cardiac ageing: extrinsic and intrinsic factors in cellular renewal and senescence. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 523–542 (2018).
3. Pulakat, L. & Chen, H. H. Pro-Senescence and Anti-Senescence Mechanisms of Cardiovascular Aging: Cardiac MicroRNA Regulation of Longevity Drug-Induced Autophagy. *Frontiers in Pharmacology* vol. 11 774 (2020).
4. Lu, L., Liu, M., Sun, R. R., Zheng, Y. & Zhang, P. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem. Biophys.* **72**, 865–867 (2015).
5. Cassani, M. *et al.* Combining Nanomaterials and Developmental Pathways to Design New Treatments for Cardiac Regeneration: The Pulsing Heart of Advanced Therapies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, (2020).
6. Behfar, A., Crespo-Diaz, R., Terzic, A. & Gersh, B. J. Cell therapy for cardiac repair-lessons from clinical trials. *Nature Reviews Cardiology* vol. 11 232–246 (2014).
7. Madonna, R. *et al.* Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: Cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *European Heart Journal* vol. 37 1789–1798 (2016).
8. Fu, Y. *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res.* **25**, 1013–1024 (2015).
9. Engel, J. L. & Ardehali, R. Direct cardiac reprogramming: Progress and promise. *Stem Cells International* vol. 2018 (2018).
10. Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T. Cardiac gene therapy with adeno-associated virus-based vectors. *Current Opinion in Cardiology* vol. 32 275–282 (2017).
11. Mohamed, T. M. A. *et al.* Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration. *Cell* **173**, 104-116.e12 (2018).
12. Ou, L. Animal Models of Cardiac Disease and Stem Cell Therapy. *Open Cardiovasc. Med. J.* **4**, 231–239 (2010).
13. Ye, L., Swingen, C. & Zhang, J. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Potential for Basic and Clinical Sciences. *Curr. Cardiol. Rev.* **9**, 63–72 (2013).
14. Funakoshi, S. *et al.* Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
15. Matsa, E., Ahrens, J. H. & Wu, J. C. Human induced pluripotent stem cells as a platform for personalized and precision cardiovascular medicine. *Physiol. Rev.* **96**, 1093–1126 (2016).

16. Aggarwal, P. *et al.* RNA expression profiling of human iPSC-derived cardiomyocytes in a cardiac hypertrophy model. *PLoS One* **9**, 108051 (2014).
17. Huang, X., Li, Z., Bai, B., Li, X. & Li, Z. High expression of microRNA-208 is associated with cardiac hypertrophy via the negative regulation of the sex-determining region Y-box 6 protein. *Exp. Ther. Med.* **10**, 921–926 (2015).
18. Tu, Y. *et al.* MicroRNA-22 downregulation by atorvastatin in a mouse model of cardiac hypertrophy: A new mechanism for antihypertrophic intervention. *Cell. Physiol. Biochem.* **31**, 997–1008 (2013).
19. Wang, H. & Cai, J. The role of microRNAs in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1863 2019–2030 (2017).
20. Lucas, T., Bonauer, A. & Dimmeler, S. RNA therapeutics in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **123**, 205–220 (2018).
21. Chiao, Y. A. & Rabinovitch, P. S. The aging heart. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2015).
22. Ramos-marquès, E. *et al.* Chronological and biological aging of the human left ventricular myocardium: analysis of microRNAs contribution. *Aging Cell* Accepted (2021) doi:10.1111/ace1.13383.
23. Giacca, M. & Zacchigna, S. Harnessing the microRNA pathway for cardiac regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 89 68–74 (2015).
24. Kontomanolis, E. N. *et al.* MiRNAs: Regulators of human disease. *European Journal of Gynaecological Oncology* vol. 37 759–765 (2016).
25. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology* vol. 9 (2018).
26. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840 (2010).
27. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* vol. 11 228–234 (2009).
28. Thum, T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Molecular Medicine* vol. 4 3–14 (2012).
29. Boon, R. A. & Dimmeler, S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology* vol. 12 135–142 (2015).
30. Van Rooij, E. & Olson, E. N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: Opportunities and obstacles. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 11 860–872 (2012).
31. Bernardo, B. C. *et al.* Silencing of miR-34a attenuates cardiac dysfunction in a setting of moderate, but not severe, hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* **9**, e90337–e90337 (2014).
32. Boon, R. A. *et al.* MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* **495**, 107–110 (2013).

33. Carè, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **13**, 613–618 (2007).
34. Wahlquist, C. *et al.* Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature* **508**, 531–535 (2014).
35. Hernandez-Torres, F., Aranega, A. E. & Franco, D. Identification of regulatory elements directing miR-23a-miR-27a-miR-24-2 transcriptional regulation in response to muscle hypertrophic stimuli. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**, 885–897 (2014).
36. Lozano-Velasco, E. *et al.* Pitx2c modulates Pax3+/Pax7+ cell populations and regulates Pax3 expression by repressing miR27 expression during myogenesis. *Dev. Biol.* **357**, 165–178 (2011).
37. Crist, C. G. *et al.* Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13383–13387 (2009).
38. Li, R. C. *et al.* In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ. Res.* **112**, 601–605 (2013).
39. Ulate Monteroa, G. & Ulate Campos, A. El calcio en los miocitos cardíacos y su papel en las miocardiopatías. *Revista costarricense de cardiología* (2006).
40. Jensen, B. C., O'Connell, T. D. & Simpson, P. C. Alpha-1-adrenergic receptors in heart failure: The adaptive arm of the cardiac response to chronic catecholamine stimulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* vol. 63 291–301 (2014).
41. Haywood, N. J. *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy mutations in the calponin-homology domain of ACTN2 affect actin binding and cardiomyocyte Z-disc incorporation. *Biochem. J.* **473**, 2485–2493 (2016).
42. Marks, A. R. Calcium cycling proteins and heart failure: Mechanisms and therapeutics. *Journal of Clinical Investigation* vol. 123 46–52 (2013).
43. Santander, H., Ramos-Marquès, E. & Ordovás, L. *Estudio del papel de los miRNA en el envejecimiento cardíaco. Trabajo Fin de Máster* (2019).
44. Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of micro RNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* **6**, 851–864 (2014).
45. Ren, X. P. *et al.* MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* **119**, 2357–2366 (2009).
46. Bonauer, A. *et al.* MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in Mice. *Science (80-)*. **324**, 1710–1713 (2009).
47. Gabisonia, K. *et al.* MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature* **569**, 418–422 (2019).
48. Wang, D. *et al.* Local MicroRNA modulation using a novel Anti-MIR-21-eluting stent effectively prevents experimental in-stent restenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1945–1953 (2015).

49. Karakikes, I. *et al.* Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, (2013).
50. Nguyen, G. N. *et al.* A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nat. Biotechnol.* **39**, 47–55 (2021).
51. Bellera, N. *et al.* Single intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse infarct remodeling. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e000946–e000946 (2014).
52. Lesizza, P. *et al.* Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **120**, 1298–1304 (2017).
53. Somia, N. & Verma, I. M. Gene therapy: Trials and tribulations. *Nature Reviews Genetics* vol. 1 91–99 (2000).
54. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* vol. 114 100–109 (2006).
55. De Jong, W. H. *et al.* Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **29**, 1912–1919 (2008).
56. Obuobi, S. *et al.* DNA tetrahedron-based nanogels for siRNA delivery and gene silencing. *Nanoscale* **20**, 425–434 (2020).
57. Madhanagopal, B. R., Zhang, S., Demirel, E., Wady, H. & Chandrasekaran, A. R. DNA Nanocarriers: Programmed to Deliver. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 43 997–1013 (2018).
58. Liu, Q. *et al.* Capturing intracellular oncogenic microRNAs with self-assembled DNA nanostructures for microRNA-based cancer therapy. *Chem. Sci.* **9**, 7562–7568 (2018).
59. Chandrasekaran, A. R. *et al.* DNA nanotechnology approaches for microRNA detection and diagnosis. *Nucleic Acids Res.* **47**, 10489–10505 (2019).
60. He, Y. *et al.* Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature* **452**, 198–201 (2008).
61. Aldaye, F. A. & Sleiman, H. F. Modular access to structurally switchable 3D discrete DNA assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13376–13377 (2007).
62. Rothmund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* vol. 440 297–302 (2006).
63. Takeuchi, Y. *et al.* Single-molecule observations of RNA-RNA kissing interactions in a DNA nanostructure. *Biomater. Sci.* **4**, 130–135 (2016).
64. Chandrasekaran, A. R. & Levchenko, O. DNA Nanocages. *Chemistry of Materials* vol. 28 5569–5581 (2016).
65. Li, J. *et al.* Self-assembly of DNA nanohydrogels with controllable size and

- stimuli-responsive property for targeted gene regulation therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1412–1415 (2015).
66. Obuobi, S. *et al.* Nucleic acid peptide nanogels for the treatment of bacterial keratitis. *Nanoscale* **12**, 17411–17425 (2020).
 67. Mencía Castaño, I. *et al.* microRNA Modulation. in *Cell Engineering and Regeneration* 511–576 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-319-08831-0_34.
 68. Zadeh, J. N. *et al.* NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *J. Comput. Chem.* **32**, 170–173 (2011).
 69. Origin(Pro), Version 2016. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
 70. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT. [Internet] (Accessed: June 2021) <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
 71. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* vol. 9 671–675 (2012).
 72. Lian, X. *et al.* Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, (2012).
 73. Tohyama, S. *et al.* Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* **12**, 127–137 (2013).
 74. Sasaki, A. & Kinjo, M. Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties. *J. Control. Release* **143**, 104–111 (2010).
 75. Nahar, S., Nayak, A. K., Ghosh, A., Subudhi, U. & Maiti, S. Enhanced and synergistic downregulation of oncogenic miRNAs by self-assembled branched DNA †. **10**, 195 (2018).
 76. Zetasizer Nano user manual (English) | Malvern Panalytical. [Internet] (Accessed June 2021) <https://www.malvernpanalytical.com/es/learn/knowledge-center/user-manuals/MAN0485EN>.
 77. Petros, R. A. & Desimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 9 615–627 (2010).
 78. Pouton, C. W. & Seymour, L. W. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 187–203 (2001).
 79. Hahn, J., Wickham, S. F. J., Shih, W. M. & Perrault, S. D. Addressing the instability of DNA nanostructures in tissue culture. *ACS Nano* **8**, 8765–8775 (2014).
 80. Bhardwaj, A., Embury, M. D., Rojo, R. D., Albarracin, C. & Bedrosian, I. Efficacy of fluvastatin and aspirin for prevention of hormonally insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **187**, 363–374 (2021).
 81. ISO - ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. <https://www.iso.org/standard/36406.html>.

82. Alejo, T., Andreu, V., Mendoza, G., Sebastian, V. & Arruebo, M. Controlled release of bupivacaine using hybrid thermoresponsive nanoparticles activated via photothermal heating. *J. Colloid Interface Sci.* **523**, 234–244 (2018).
83. L'Abbé, D., Bisson, L., Gervais, C., Grazzini, E. & Durocher, Y. Transient gene expression in suspension HEK293-EBNA1 cells. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1850 1–16 (Humana Press Inc., 2018).
84. Hines, W. C., Su, Y., Kuhn, I., Polyak, K. & Bissell, M. J. Commentary Sorting Out the FACS: A Devil in the Details. *CELREP* **6**, 779–781 (2014).
85. Conserva, F., Gesualdo, L. & Pontrelli, P. Analysis of miRNA Expression Using Digital and the QuantStudio™ 3D Digital PCR System. in 191–202 (Humana, New York, NY, 2021). doi:10.1007/978-1-0716-1507-2_13.
86. Kim, B. Western blot techniques. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1606 133–139 (Humana Press Inc., 2017).

7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

S1. Secuencia de miR-24-2-5p

miR-24-2-5p	5'-UGCCUACUGAGCUGAAACACAG-3'
miR-24-2-5p (miDNA)	5'- TGCCTACTGAGCTGAAACACAG-3'

S2. Secuencias de las nanoestructuras de DNA

S2.1 Secuencias de N1

Y1	Hebra S1	5'CCAGGCTAGCTACATATTCCAGACGACTCCTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
	Hebra S2	5'TCGTTAGTCCAGACTTGTAGCTAGCCTGGCTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
	Hebra S3	5'GAGTCGTCTGGAATTGTCTGGACTAACGACTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
	Hebra S2- Cy3	5'*TCGTTAGTCCAGACTTGTAGCTAGCCTGGCTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
Y2a	Hebra S1	5'CCAGGCTAGCTACAATTCCAGACGACTCCTGTGTTTCA GC-3'
	Hebra S2	5'TCGTTAGTCCAGACTGTAGCTAGCCTGG-3'
	Hebra S3	5'GAGTCGTCTGGAATGTCTGGACTAACGA-3'
L3a	Hebra S1	5'ACTAAGACTGGACTACCTGAAGAGACTACTGGGCTGA AACACAG-3'
	Hebra S2	5'CCAGTAGTCTCTTCAGGTAGTCCAGTCTTAGTGCTGAA ACACAG-3'

Tabla 4 Secuencias empleadas para la formación de N1. El asterisco rojo en S2 de Y1 indica el sitio de unión de Cy3 para ensamblar la nanoestructura marcada de los análisis de citometría de flujo y microscopía confocal y de fluorescencia.

S2.1 Secuencias de N2

Y1	Hebra S1	5'CCAGGCTAGCTACATATTCCAGACGACTCCTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
	Hebra S2	5'TCGTTAGTCCAGACTTGTAGCTAGCCTGGCTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
	Hebra S3	5'GAGTCGTCTGGAATTGTCTGGACTAACGACTGTGTTTC AGCTCAGTAGGCA-3'
	Hebra S2- Cy3	5'*TCGTTAGTCCAGACTTGTAGCTAGCCTGGCTGTGTTT CAGCTCAGTAGGCA-3'
Y2b	Hebra S1	5'CCAGGCTAGCTACAATTCCAGACGACTCCTGTGTTTCA -3'
	Hebra S2	5'TCGTTAGTCCAGACTGTAGCTAGCCTGG-3'
	Hebra S3	5'GAGTCGTCTGGAATGTCTGGACTAACGA-3'
L3b	Hebra S1	5'ACTAAGACTGGACTACCTGAAGAGACTACTGGTGAAA CACAG-3'
	Hebra S2	CCAGTAGTCTCTTCAGGTAGTCCAGTCTTAGTTGAAACA CAG-3'

Tabla 5 Secuencias empleadas para la formación de N2. El asterisco rojo en S2 de Y1 indica el sitio de unión de Cy3 para ensamblar la nanoestructura marcada de los análisis de citometría de flujo y microscopía confocal y de fluorescencia.

S3. Secuencia del oligonucleótido control en los ensayos de captura del miRNA

DNA control	5'-CGAGCTTTACGTTACCTCATAT-3'
-------------	------------------------------

S4. Secuencia de los cebadores empleados en qPCR.

Gen	Sentido	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación (°C)
<i>ACTN2</i>	Directo	AAAGGCGCGCCAATGAACCAGATA GAGCC	52,5
	Reverso	CCCTCTAGATTTTTCTTTTATAAAT TAAGTTTAATT TAG	52,5
<i>SERCA2a</i>	Directo	ACAGGCGCGCCAATGGAGAACGC GCACAC	60,85
	Reverso	AAAGTCGACATCATAGAATAGATT TATTACCTG AAACCA	59,79

S5. Gráficas del estudio del tamaño de las nanoestructuras (DLS)

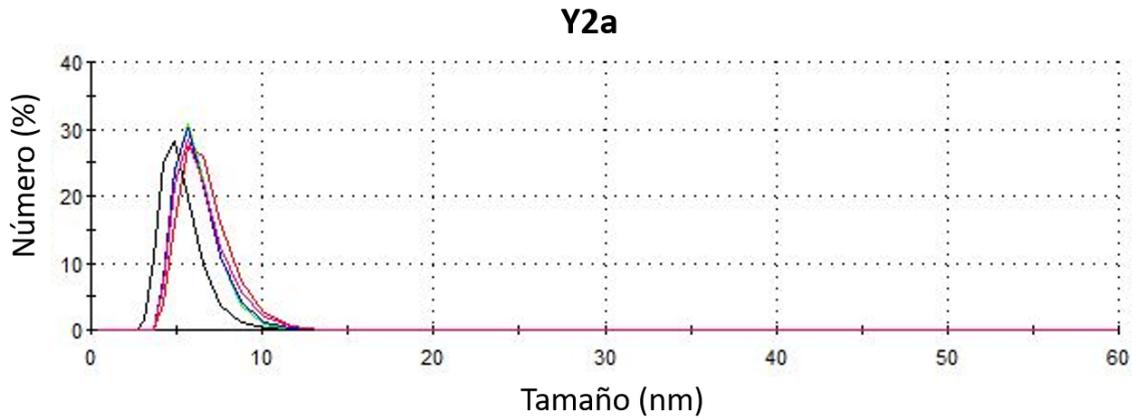


Figura 22 Medida del DLS para la muestra Y2a. Cada curva representa una medida del DLS para la misma muestra. La gráfica representa el número frente al tamaño (Dh) en nanómetros de la unidad de DNA Y2a.

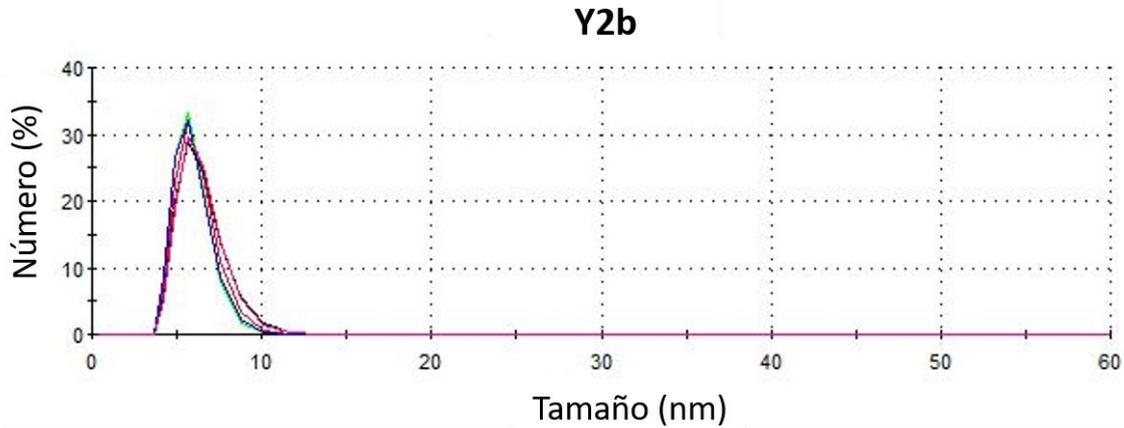


Figura 23 Medida del DLS para la muestra Y2b. Cada curva representa una medida del DLS para la misma muestra. La gráfica representa el número frente al tamaño (Dh) en nanómetros de la unidad de DNA Y2b.

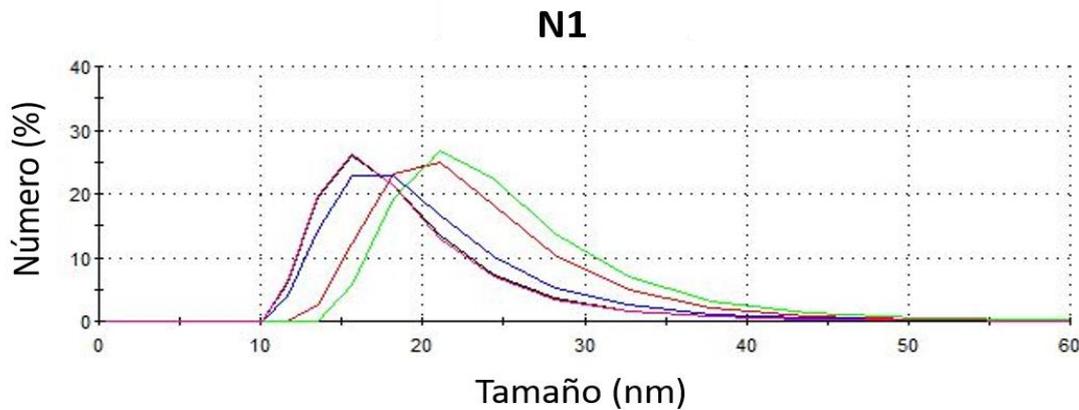


Figura 23 Medida del DLS para la muestra N1. Cada curva representa una medida del DLS para la misma muestra. La gráfica representa el número frente al tamaño (Dh) en nanómetros de la estructura de DNA N1.

S6. Gráficas del estudio de la estabilidad térmica (Tm)

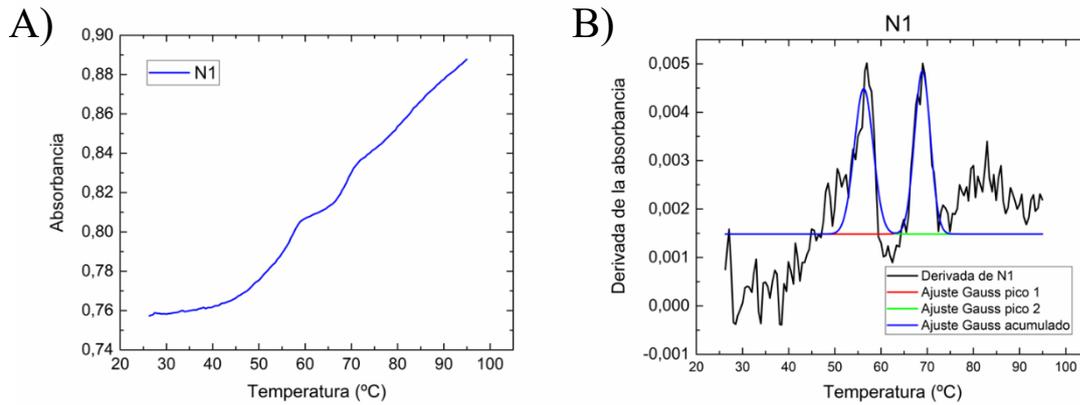


Figura 24 Determinación de Tm de N1. A) Curva de desnaturalización mostrando la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura (°C). B) Ajuste de la derivada de la curva de desnaturalización (en negro) mediante la función de Gauss (en azul).

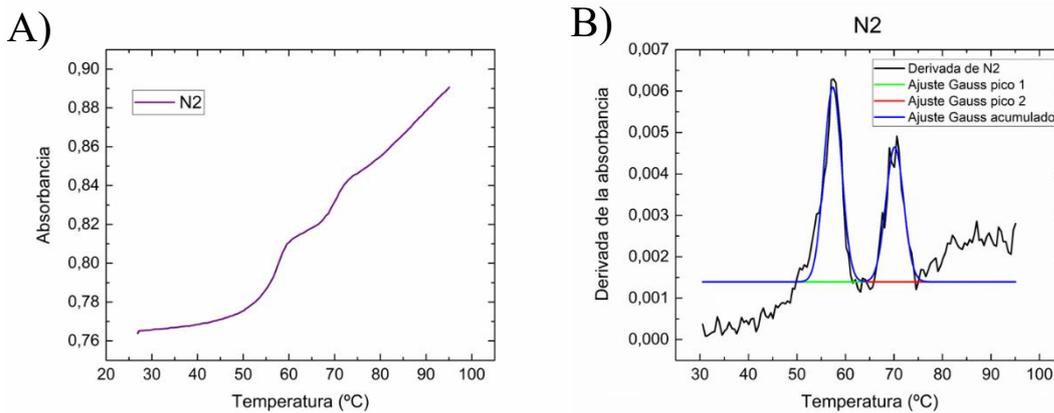


Figura 25 Determinación de Tm de N2. A) Curva de desnaturalización mostrando la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura (°C). B) Ajuste de la derivada de la curva de desnaturalización (en negro) mediante la función de Gauss (en azul).