

Células artificiales, nanomedicina y biotecnología

Una revista internacional

ISSN: 2169-1401 (Imprimir) 2169-141X (En línea) Página de inicio de la revista: <https://www.tandfonline.com/loi/ianb20>

Ingeniería de nanoburbujas de oxígeno para la reversión efectiva de la hipoxia

Muhammad Saad Khan, Jangsun Hwang, Youngmin Seo, Kyusoon Shin, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Yonghyun Choi, Jong Wook Hong y Jonghoon Choi

Para citar este artículo: Muhammad Saad Khan, Jangsun Hwang, Youngmin Seo, Kyusoon Shin, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Yonghyun Choi, Jong Wook Hong y Jonghoon Choi (2018) Ingeniería de nanoburbujas de oxígeno para la reversión efectiva de la hipoxia, células artificiales, nanomedicina y biotecnología, 46 : sup3, S318-S327, DOI: [10.1080 / 21691401.2018.1492420](https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1492420)

Para vincular a este artículo: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1492420>



Publicado en línea: 23 de julio de 2018.



Envíe su artículo a esta revista



Vistas del artículo: 2997



Ver artículos relacionados



Ver datos de Crossmark



Artículos que citan: 18 Ver artículos que citan



Ingeniería de nanoburbujas de oxígeno para la reversión efectiva de la hipoxia

Muhammad Saad Khan^a, Jangsun Hwang^a, Youngmin Seo^b, Kyusoon Shin^c, Kyungwoo Lee^a, Parque Chanhwia,
Yonghyun Choi^a, Jong Wook Hong^{c,d} y Jonghoon Choi^a 

^aEscuela de Ingeniería Integrativa, Universidad Chung-Ang, Seúl, República de Corea; ^bCentro de Biomateriales, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Ciencia y Tecnología de Corea, Seúl, República de Corea; ^cDepartamento de Nanobiotecnología, Escuela de Posgrado, Universidad Hanyang, Seúl, República de Corea; ^dDepartamento de Ingeniería Bionano, Universidad Hanyang, Ansan, República de Corea

ABSTRACTO

La hipoxia, que resulta de un suministro inadecuado de oxígeno, es una de las principales causas de preocupación en la terapia del cáncer, ya que está asociada con una reducción de la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia en el tratamiento del cáncer. Sobreexpresión y estabilización del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1a) la proteína en los tumores, debido a la hipoxia, da como resultado un mal pronóstico y un aumento de la mortalidad de los pacientes. Para aumentar la tensión de oxígeno en áreas hipóxicas, varios investigadores han investigado micro y nanoburbujas. En la presente investigación, se sintetizaron nanoburbujas de oxígeno con caparazón de lípidos (ONB) a través de un método de sonicación para revertir las condiciones hipóxicas creadas en una cámara hipóxica hecha a medida. Se evaluó la liberación de oxígeno gaseoso de los ONB en agua desoxigenada midiendo el oxígeno disuelto. Las condiciones hipóxicas se evaluaron realizando *in vitro* experimentos en células de cáncer de mama MDA-MB231 a través de la expresión de HIF-1a y la fluorescencia de image-iT™ reactivo de hipoxia. Los resultados indicaron la degradación de HIF-1a después de la introducción de los ONB. Proponemos que los ONB tienen éxito en revertir la hipoxia, regulando a la baja el HIF-1a, y mejora de las condiciones celulares, lo que conduce a nuevas aplicaciones médicas.

HISTORIA DEL ARTÍCULO

Recibido el 22 de mayo de 2018

Revisado el 16 de junio de 2018

Aceptado el 18 de junio de 2018

PALABRAS CLAVE

Hipoxia; oxígeno
nanoburbujas; HIF-1a;
MDA-MB231

Introducción

La hipoxia tisular es el suministro inadecuado de oxígeno a los tejidos debido a diversas razones y puede provocar complicaciones médicas graves [1-4]. La presión de oxígeno normal varía entre los tejidos; pero en la mayoría de los casos, el rango fisiológico para los tejidos normales se encuentra entre el 4% y el 8% del nivel de oxígeno y la hipoxia celular se define en el rango del 1 al 5% para la mayoría de los tejidos [5]. La hipoxia puede ocurrir debido a un gasto cardíaco reducido, una concentración reducida de hemoglobina, un suministro reducido de oxígeno o una vasculatura atípica del tejido tumoral [3,4,6]. Se sabe que los tumores hipóxicos son más resistentes a la quimioterapia y la radioterapia, lo que conduce a un mal pronóstico y una mayor mortalidad de los pacientes [4,6-10]. Un aumento relativamente pequeño de la presión parcial de oxígeno en un área hipóxica puede aumentar instantáneamente su sensibilización a la radiación [11]. La quimioterapia generalmente requiere la proliferación de células para una mayor citotoxicidad, pero las células tumorales bajo hipoxia se dividen lentamente, lo que limita la efectividad de los agentes quimioterapéuticos [5].

Un impacto destacado de las condiciones hipóxicas es la expresión y estabilización del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1a) proteína en las células tumorales que afectan la proliferación tumoral, el metabolismo, la apoptosis, la vascularización y las respuestas inmunes y, como resultado, HIF-1a es responsable de mayor resistencia tumoral a los agentes de quimioterapia y radioterapia [11,21-25]. Normalmente, las microburbujas, que se utilizan [3,4,6,9,12,13]. HIF-1a es sensible al oxígeno y responde a la deficiencia de oxígeno en condiciones hipóxicas, HIF-1a no es

hidroxilado, lo que resulta en la estabilización y sobreexpresión de HIF-1a, especialmente en el caso de tumores sólidos como cánceres de mama, pulmón, piel y próstata [4]. Regulación a la baja de HIF-1a puede conducir a la supresión del cáncer y, por lo tanto, varios estudios se han dirigido a silenciar / inhibir HIF-1a para mejorar la eficacia terapéutica [3,4,6]. Proporcionar oxígeno adecuado en regiones hipóxicas ayudaría en la degradación de HIF-1a, y podría aumentar la eficacia del tratamiento. Las condiciones hipóxicas también son una causa importante de preocupación en la ingeniería de tejido óseo y la preparación de andamios 3D [14].

Para superar la hipoxia y la hipoxemia, se han empleado varios métodos para aumentar *in vitro* niveles de oxígeno. La sangre puede transportar oxígeno limitado y la inyección de oxígeno gaseoso directamente en la sangre tiene la limitación de que puede producirse hemólisis [15]. Se han investigado el oxígeno inspirado, la inhalación de óxido nítrico, el aumento del recuento de glóbulos rojos, la oxigenación hiperbárica, la inhalación de carbógeno, las inyecciones de peróxido de hidrógeno y la ozonoterapia, pero se ha encontrado que son ineficaces debido a sus limitaciones clínicas y logísticas. Existe una necesidad urgente de una fuente de oxígeno que sea rentable, biocompatible y fácil de usar [7,10,16-19].

Las micro y nanoburbujas son partículas inherentemente ecogénicas compuestas por una capa monocapa y un núcleo de gas [20]. Tradicionalmente se han utilizado como contraste ecográfico. La burbuja de oxígeno en condiciones hipóxicas, HIF-1a no es y 10 micrometros [26]. Las burbujas de aire sin recubrimiento se disuelven rápidamente en el

generalmente descartado. Se recogieron burbujas de tamaño micro para su caracterización mediante microscopía óptica y de fluorescencia.

Para comprobar la citotoxicidad de los lípidos constituyentes, se prepararon liposomas de la misma forma sin oxigenar la muestra.

Caracterización de nanoburbujas de oxígeno

Se utilizaron microscopía óptica y de fluorescencia, microscopía confocal, microscopía electrónica de barrido (SEM) (Sigma, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (LIBRA 120, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) para caracterizar las burbujas. Se recolectaron burbujas de tamaño microscópico para obtener imágenes microscópicas, mientras que SEM se realizó para burbujas de tamaño microscópico y nanométrico. Se utilizó TEM para imágenes de tamaño nanométrico.

Se prepararon muestras para microscopía confocal y SEM inyectando microburbujas en gel de agarosa al 5%. Primero, el gel de agarosa se calentó hasta 100°C, y luego se agregaron ONB durante el proceso de enfriamiento cuando la temperatura del gel de agarosa estaba por debajo de 50°C. Se dejó secar el gel de agarosa y luego se cortaron capas delgadas del gel seco con fines de formación de imágenes. Estas capas se recubrieron con Pt para obtener imágenes SEM.

Las muestras para TEM se prepararon mediante tinción negativa usando acetato de uranilo. Primero, se sumergió una rejilla de cobre en nanoburbujas, se secó y luego se lavó y se tiñó negativamente con una solución de acetato de uranilo al 1%. A continuación, estas rejillas se secaron de nuevo y se utilizaron para obtener imágenes de TEM a 80 kV.

Se utilizó un analizador de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Nanosight NS300, Malvern, PA) para determinar la distribución del tamaño de partículas y el número de nanoburbujas. Las muestras se diluyeron a 1:10, 1:100 y 1:1000 para determinar el efecto de la dilución sobre el tamaño de partícula y la concentración de partícula. La dispersión de luz dinámica (DLS) (Malvern, PA) también se utilizó para analizar las nanoburbujas. Las muestras se diluyeron a 1:100 para lecturas DLS. La concentración de oxígeno se midió usando un medidor de oxígeno disuelto (OD) después de inyectar micro y nanoburbujas en agua parcialmente desoxigenada. Se tomaron tres muestras de 30 ml de agua y se desoxigenaron a una concentración de oxígeno de 1,4 mg / L purgando gas argón a través de las muestras. Una muestra se dejó sin tratar en aire normal, mientras que en la segunda muestra se inyectaron 3 ml de DPBS saturado de oxígeno (saturación de oxígeno 16,9 mg / L), y se inyectaron 3 ml de ONB (saturación de oxígeno 17,1 mg / ml) en la tercera muestra. Se tomaron medidas durante 360 min hasta que todas las soluciones alcanzaron el punto de equilibrio. El medidor de OD tiene la limitación de que mide solo el OD y, por lo tanto, se midió el aumento en el contenido de oxígeno del agua desoxigenada para generar el perfil de liberación de oxígeno. Las pruebas de estabilidad de ONB se realizaron almacenando ONB durante 30 días a 4°C y contando el número de ONB con un NTA. Para comprobar la difusión de gas fuera de los ONB, se llevó a cabo una dilución y se midió el tamaño mediante NTA para incrementar las proporciones de dilución. Se observó el mismo fenómeno de reducción de tamaño después de la dilución de microburbujas (datos no mostrados).

Para determinar el número de microburbujas, en la suspensión, vertimos 4 ml de la suspensión sin filtrar en un tubo cónico de 15 ml y luego extraemos cuidadosamente cada

ml de volumen (1°, 2°, 3° y 4°) del tubo cónico y colocarlos en tubos separados. Luego tomamos un 10 metroL muestra de cada capa con pipetas y se cuenta con el software image J como se describe más adelante.

Ensayos de citotoxicidad

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron utilizando células de cáncer de mama MDA-MB-231. 1 10⁵ se sembraron células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células MDA-MB-231 se cultivaron hasta el 80% de la confluencia y se trataron con diversas concentraciones de nanoburbujas y liposomas (mismos constituyentes lipídicos) durante un período de 24 h. El porcentaje de viabilidad celular se midió usando un contador celular automatizado (Juli-Br, NanoEntek, Seúl, Corea) teñiendo las células con azul tripán al 4%. Se prepararon tres muestras en cada categoría y se tomaron tres lecturas para cada muestra.

Crear y probar condiciones hipóxicas

En nuestro laboratorio se diseñó una cámara de hipoxia personalizada (20 15 6 cm) para crear condiciones hipóxicas y revertir la hipoxia celular. La cámara constaba de un recipiente de vidrio transparente con tapa de plástico. Se hicieron dos orificios en la parte superior de la tapa para purgar la cámara con gas argón. Los sellos de la cámara fueron luego probados para detectar fugas. La cámara de hipoxia se limpió con etanol al 70% y se colocó en luz ultravioleta durante 3 h antes de su uso. Se colocaron placas de cultivo celular de seis o 24 pocillos dentro de la cámara durante el experimento de hipoxia. Se purgó gas argón a través de la cámara durante 20 min para reemplazar el aire dentro de la cámara, que luego se selló durante 8 h. El reactivo de hipoxia Image-iT, que es un reactivo disponible comercialmente, se utilizó para la fluorescencia de células bajo hipoxia [40]. Diez microlitros (10 metroM) de reactivo de hipoxia image-iT se inyectó en el medio al comienzo del experimento. La concentración de oxígeno dentro de la cámara no se midió durante los experimentos de hipoxia y en su lugar se utilizó un reactivo indicador de hipoxia de imagen-IT como indicador de hipoxia. Se llevaron a cabo varios experimentos para determinar el momento óptimo para crear condiciones de hipoxia en la cámara de hipoxia. Se encontró que la incubación de 6 a 8 h en la cámara de hipoxia creaba las condiciones de hipoxia deseadas con la mayoría de las células vivas y bajo estrés por oxígeno. Después de 6-8 h de incubación en la cámara de hipoxia, la placa celular se sacó de la cámara y las células se trataron con ONB durante 30 minutos y se tomaron imágenes bajo un microscopio fluorescente a longitudes de onda de excitación y emisión de 490 y 610 nm, respectivamente.

HIF-1a ensayo

HIF-1a La expresión también se observó y evaluó como un indicador de hipoxia. Para la obtención de imágenes de fluorescencia, se sembraron células MDA-MB-231 en un portaobjetos de vidrio de ocho pocillos (10.000 células / pocillo) y se mantuvieron en condiciones hipóxicas en la cámara de hipoxia durante 6 h. Luego, la mitad de las muestras se trataron con ONB, mientras que la mitad restante se dejó sin tratar y el portaobjetos de vidrio de ocho pocillos se incubó en condiciones normales durante 3 h. HIF-1a La expresión se evaluó mediante el uso de FITC conjugado

anti-HIF-1 α anticuerpo y la expresión de HIF-1 α se observó mediante microscopía de fluorescencia. HIF-1 α se expresa en el citoplasma y, por lo tanto, las células se fijaron y permeabilizaron antes de introducir el anti-HIF-1 α anticuerpo. Las células también se tiñeron con DAPI (4 α , 6-diamidino-2-fenilindol).

En segundo lugar, se utilizó el método de ensayo de inmunoabsorción indirecta ligado a enzimas (ELISA) para determinar la expresión de HIF-1 α utilizando placas de ELISA de 96 pocillos. Se adoptó el mismo proceso de incubación de células en la cámara de hipoxia colocando la placa de 96 pocillos en la cámara de hipoxia durante 6 h, y luego tratando la mitad de los pocillos con ONB durante 3 h, mientras que el resto se dejó sin tratar. Como grupo de control, una placa de 96 pocillos se mantuvo en condiciones normales y se trató con la misma cantidad de ONB. Para ELISA, las proteínas se recolectaron usando un ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) como tampón de lisis. El anticuerpo principal fue anti-HIF-1 monoclonal anticuerpo de ratones y se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) al 2% para bloquear la unión inespecífica. El anticuerpo secundario fue IgG anti-ratón-peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP) usado en la proporción de dilución de 1: 2000. Entonces, 2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] (ABTS) se utilizó como sustrato de peroxidasa y se utilizó la absorbancia a 410 nm para determinar la expresión de HIF-1 α en condiciones hipóxicas y normales.

análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism para el análisis estadístico y las representaciones gráficas de los datos (GraphPad, La Jolla, CA). Se realizaron pruebas con los datos y se verificó la significación. Los valores no significativos se muestran como ns en el

sección de resultados, mientras que -, -, --- y ---- describen pag valores inferiores a <.5, .01, .001 y .0001, respectivamente.

Análisis de imágenes con el software ImageJ

La distribución de tamaño y el número de microburbujas se contaron utilizando el software ImageJ a partir de imágenes de microscopía óptica. Para este propósito, se recolectaron microburbujas de varios niveles del tubo cónico después de centrifugar a 300°C.gramo y contado usando ImageJ. La fluorescencia del reactivo de hipoxia image-iT también se cuantificó usando ImageJ usando las imágenes obtenidas de microscopía de fluorescencia.

Resultados

Figura 1 muestra una representación esquemática de nuestros experimentos. Los ONB se sintetizaron en un matraz de tres bocas utilizando un sonicador de punta mientras se suministraba oxígeno a través de la otra entrada. El caparazón de los ONB consistía en una combinación de fosfolípidos básicos (DSPC), mientras que los lípidos PEGilados (DSPE-PEG-2000 amina y biotina) servían como tensioactivos. Las relaciones molares utilizadas para la síntesis de DSPC, DSPE-PEG-2000-amina y DSPE-PEG-2000-biotina fueron 85: 8: 7, respectivamente. Las cabezas hidrófilas de los fosfolípidos estaban orientadas hacia el exterior hacia el disolvente DPBS y las colas hidrófobas rodeaban el oxígeno gaseoso, formando así una capa de monocapa. Cada nanoburbuja sirvió como un paquete separado de oxígeno.

Durante los experimentos, los ONB sintetizados se utilizaron para revertir las condiciones hipóxicas al agregarlas a las células tumorales, que habían estado en condiciones hipóxicas. Nosotros hipotetizamos

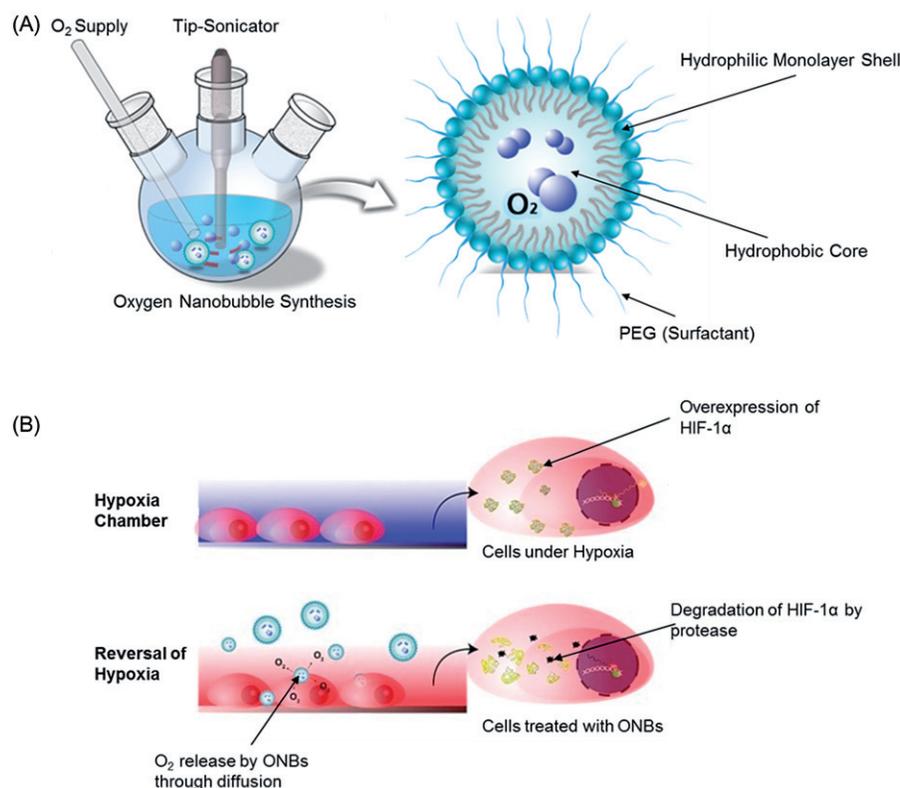


Figura 1. Representación esquemática. (A) Diagrama esquemático de la síntesis de nanoburbujas de oxígeno (ONB). Los lípidos se disuelven en DPBS y se sonicen en presencia de un suministro de oxígeno. (B) Aplicación de ONB para revertir la hipoxia y degradación de HIF-1 α expresión. Muestra la liberación de oxígeno gaseoso de los ONB a través de un proceso de difusión que conduce a la degradación del HIF-1 α .

que el tratamiento con ONB ayudaría en la degradación de HIF-1a y mejoraría la supervivencia celular, lo que conduciría a mejoras adicionales en la eficacia del tratamiento de los agentes quimioterapéuticos.

Figura 2 demuestra la caracterización de burbujas de tamaño micro sintetizadas durante el experimento. Figura 2 (A) es la imagen de microscopía confocal que demuestra el tamaño polidisperso de las microburbujas en gel de agarosa. La naturaleza esférica de las burbujas se puede observar fácilmente. FITC-avidina conjugada con ONB fluorescentes sintetizados con biotina se muestra en Figura 2 (B). Para una mejor caracterización, se recogieron burbujas de mayor tamaño y se colocaron en la superficie de un lado de vidrio. La naturaleza núcleo-caparazón de las burbujas es evidente en las burbujas que tienen un diámetro de 5 micrometros más, indicando que es más probable que los ONB tengan una naturaleza núcleo-shell similar. Figura 2 (C) muestra una imagen SEM de una microburbuja con un tamaño de 4,3 micrometro. La forma esférica es claramente observable en la imagen. Figura 2 (D) muestra una distribución de tamaño de las burbujas medidas con el software ImageJ. Para ello, se tomaron imágenes de microscopía y se analizó el tamaño. Encontramos que la distribución de tamaño medio es 2,8 micrometro en el caso de partículas de tamaño micro. Figura 2 (E) muestra el número de microburbujas recogidas de varios niveles de un tubo cónico. Vertimos 4 ml de suspensión de ONB en un tubo cónico de 15 ml, y luego extrajimos cuidadosamente cada volumen de ml (1º, 2º, 3º y 4º) del tubo cónico y los colocamos en tubos separados. Luego tomamos un 10 microlitros muestra de cada capa utilizando pipetas. La capa superior contenía el mayor número de microburbujas ($5,5 \times 10^7$ microburbujas / mL), y el número de microburbujas disminuyó a medida que bajamos por el tubo cónico para $3,18 \times 10^7$ microburbujas / mL, que fue una disminución del 42%. Esto podría atribuirse a la menor densidad de microsize

burbujas, ya que en su mayoría flotan en la superficie superior. La concentración promedio de microburbujas en la solución resultó ser 4.17×10^7 microburbujas / mL, que era 104 veces menor que la concentración de nanoburbujas en la solución.

La caracterización realizada para las burbujas nanométricas se exhibe en figura 3. Figura 3 (A) es una imagen SEM que muestra una nanoburbuja del tamaño de 500 nm. Figura 3 (B) muestra imágenes TEM de nanoburbujas. El grosor de la capa de la nanoburbuja está en el rango de 5 a 10 nm. El tamaño de los ONB medidos a través de TEM está en el rango de 20 a 40 nm. Figura 3 (C) exhibe datos del análisis NTA que muestran un tamaño medio de 315 ± 90 nm. La concentración de partículas contadas estuvo en el rango de $4,2 \times 10^{11}$ nanoburbujas / mL. Los resultados de DLS, mostrados en Figura 3 (D), también muestran una tendencia similar para la mayoría de las nanoburbujas en el rango de 200 a 400 nm. El tamaño medido a través de las imágenes TEM es mucho más pequeño en comparación con los resultados de DLS y NTA y podría deberse al proceso de aspiración que se lleva a cabo durante las imágenes TEM. Debido al uso de un sonicador de punta de mayor intensidad y una mayor duración de la sonicación, nuestras muestras contenían más nanoburbujas en comparación con las microburbujas, como se muestra en figura 3. Figura 4 (A) muestra la distribución del tamaño de partícula a partir de los datos NTA. La relación de dilución 1: 100 tiene un tamaño medio de 350 ± 133 nm. Una reducción en el tamaño de las nanoburbujas es evidente con el aumento de la proporción de dilución, ya que la dilución 1: 1000 tiene un tamaño medio de 267 ± 105 nm, lo que muestra que las capas de lípidos permiten la difusión del gas a través de la partícula y, por lo tanto, su tamaño se reduce. Figura 4 (B) revela el recuento de partículas después de 30 días y muestra que la concentración de partículas se redujo a $3,2 \times 10^{11}$ nanoburbujas / ml desde una media inicial de $4,22 \times 10^{11}$ nanoburbujas / mL. Esto indica una reducción de aproximadamente un 30% en la concentración de partículas.

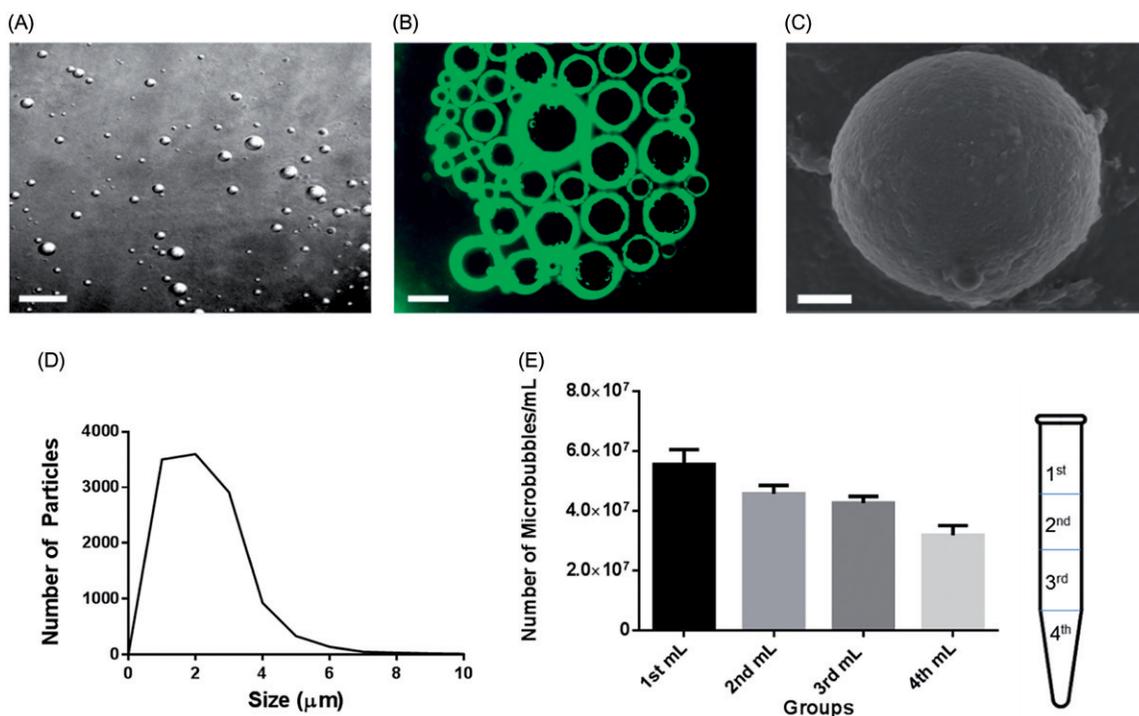


Figura 2. Caracterización de burbujas de micro tamaño. (A) Imagen de microscopía confocal de microburbujas, barra de escala $\times 20$ micrometro. (B) Imagen de microscopía de fluorescencia que muestra microburbujas, barra de escala $\times 20$ micrometro. (C) Imagen SEM que muestra una microburbuja, barra de escala $\times 1$ micrometro. (D) Distribución de tamaño de microburbujas calculada utilizando el software ImageJ. (E) Concentración de microburbujas calculada en varios grupos de muestras tomadas de la parte superior a la inferior de un tubo cónico de 15 ml.

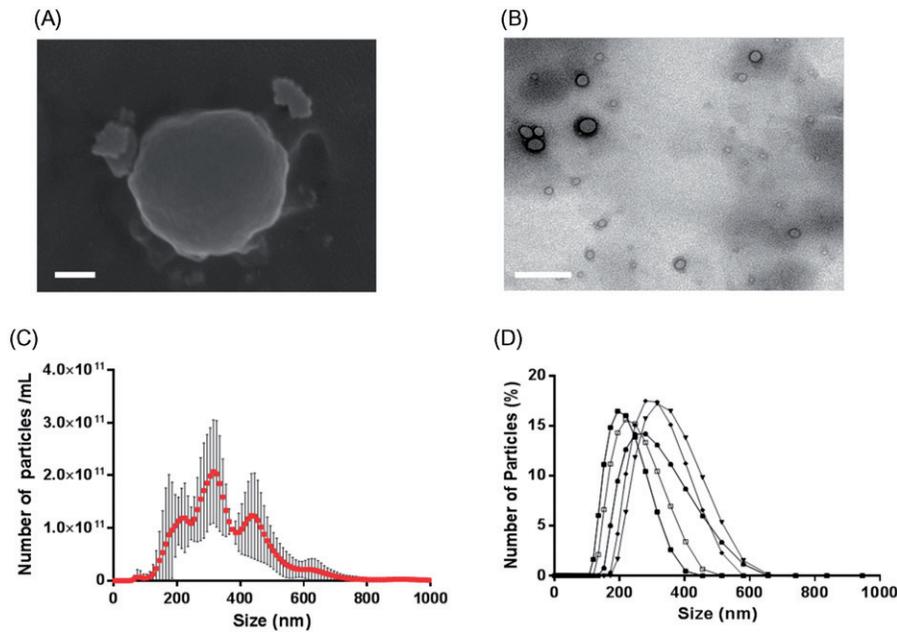


Figura 3. Distribución de tamaño de nanoburbujas. (A) Imagen SEM de nanoburbujas, barra de escala 100 nm. (B) Imagen TEM de nanoburbujas, barra de escala 100 nm. (C) Resultados de NTA para el recuento de partículas y la distribución del tamaño con la distribución del tamaño medio. (D) Resultados DLS de siete muestras de ONB representados juntos para indicar la distribución del tamaño de partícula.

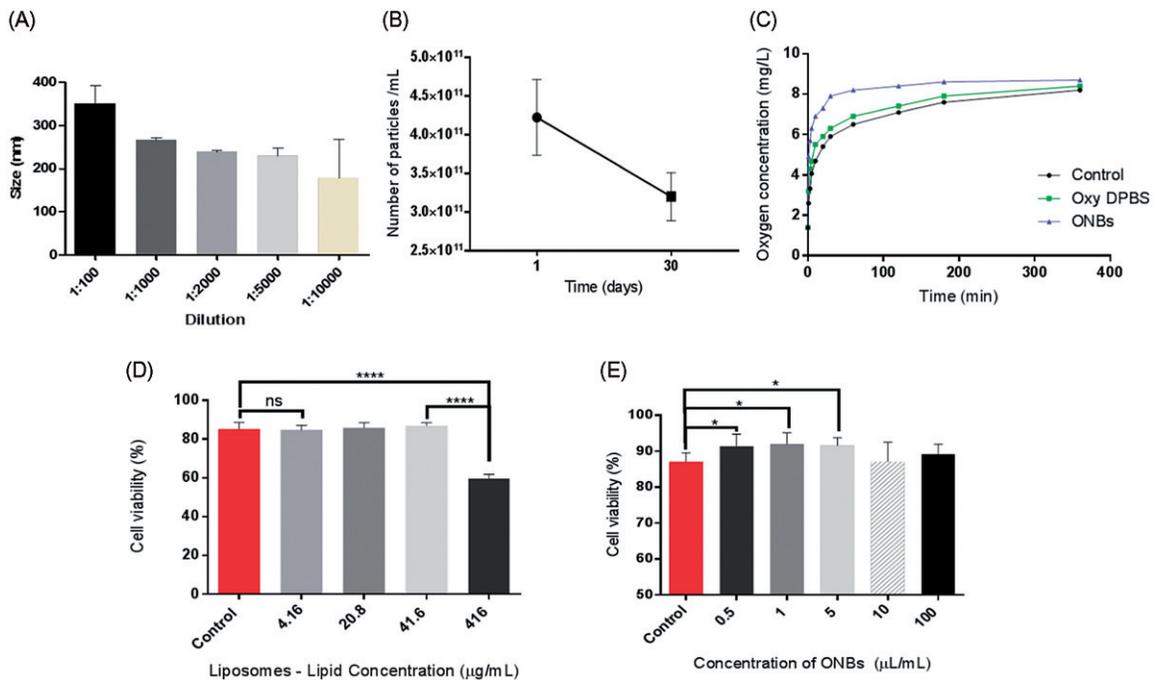


Figura 4. Ensayos de estabilidad, suministro de oxígeno y citotoxicidad. (A) Distribución de tamaño utilizando varias proporciones de dilución de ONB, obtenidas a través de una NTA. (B) Reducción del recuento de burbujas después de 30 días de almacenamiento. (C) Aumento de la concentración de oxígeno del agua desoxigenada después de la inyección de ONB y DPBS oxigenado. (D) Citotoxicidad de los lípidos utilizados en la síntesis de nanoburbujas; ns significa sin importancia, ---- pag valores <.0001. (E) Citotoxicidad de ONB para concentraciones variables; -p <.05.

después de un período de 30 días. Esto muestra la estabilidad y la vida útil de las nanoburbujas. El tamaño de las nanoburbujas (datos no mostrados) también se mantuvo estable durante este tiempo. Figura 4 (C) muestra el perfil de liberación de oxígeno de los ONB en comparación con el DPBS oxigenado y el control. Las nanoburbujas aumentaron rápidamente la saturación de oxígeno a 4,9 mg / ml, en comparación con 3,2 mg / ml de DPBS oxigenado y 2,6 mg / ml de muestra de control desde el punto de partida de 1,4 mg / ml después de 1 min. La mayoría de las nanoburbujas liberaron su oxígeno en los primeros 30 minutos de inyección. Los resultados indican que los ONB aproximadamente

contenía 500 metrog / mL más oxígeno en comparación con el DPBS oxigenado, lo que demuestra que aproximadamente el 50% del volumen de la suspensión es oxígeno gaseoso. Esto mostró que en un ambiente hipóxico, la difusión del oxígeno gaseoso fuera de las burbujas era un fenómeno rápido. Figura 4 (D, E) presenta las pruebas de citotoxicidad realizadas para los liposomas a diversas concentraciones de lípidos y ONB, respectivamente. La concentración final de lípidos en ONB se determinó en 4,16 mg / ml y, por lo tanto, se muestran varias concentraciones de ONB en Figura 4 (E) son comparables a las concentraciones de liposoma-lípido utilizadas en

Figura 4 (D). Los liposomas mostraron una citotoxicidad no significativa en comparación con una muestra de control para concentraciones de hasta 41,6 metrog / mL. Liposomas en 416metrog / ml (100 metroSolución L / mL) mostró una viabilidad celular del 60%, casi un 20% menos que la muestra de control. Esto podría deberse a una mayor concentración de lípidos. Es evidente que los ONB mejoraron la viabilidad celular al 5% en comparación con la muestra de control a concentraciones de 0,5, 1 y 5 metroL / mL. Esta mejora de la viabilidad celular puede atribuirse a una mayor concentración de oxígeno disponible para las células después de la inyección de ONB.

Se crearon condiciones hipóxicas en la cámara de hipoxia y se utilizó el reactivo de hipoxia image-iT como indicador de hipoxia. Figura 5 (A) muestra la fluorescencia de la muestra de control del reactivo de hipoxia image-iT cuando las células estaban en condiciones hipóxicas. La fluorescencia roja brillante indica niveles reducidos de oxígeno en las células. Figura 5 (B, C) muestra la fluorescencia de las células MDA-MB-231 cuando se trataron con soluciones de ONB al 10% y al 20%, respectivamente. La reducción de la fluorescencia del reactivo de hipoxia image-iT es un indicador de la reversión de la hipoxia. Figura 5 (D) muestra las células incubadas en condiciones normales con los mismos 10 metroReactivo de hipoxia M image-IT. No se pudo observar una fluorescencia significativa en condiciones normales. Figura 5 (E) muestra una cuantificación de la fluorescencia del reactivo de hipoxia image-iT utilizando el software ImageJ. Las muestras de control mostraron mayor fluorescencia (fluorescencia media

intensidad 25.14) mientras que las muestras tratadas con 10% y Los ONB al 20% y las soluciones de control normales mostraron intensidades de fluorescencia significativamente más bajas (7,4% y 2,3%, respectivamente). Los resultados en condiciones normales no mostraron significancia en comparación con el 20% de ONB. Figura 5 (F) muestra la viabilidad celular de las células MDA-MB-231 después del experimento de hipoxia. La solución de ONB al 10% muestra una supervivencia celular significativamente mayor (> 60% de viabilidad celular) mientras que la solución de ONB al 20% no muestra una diferencia significativa con la muestra de control en términos de viabilidad celular (viabilidad celular del 40%). Esto indica que las células pudieron sobrevivir mejor cuando fueron tratadas con una cantidad óptima de nanoburbujas (10%). Cantidades más altas de nanoburbujas (20%) pudieron revertir la hipoxia con éxito, pero redujeron la viabilidad celular (46%), y esto podría deberse a la presencia de una mayor concentración de lípidos. Esto se basa en nuestros resultados anteriores de que una mayor concentración de lípidos puede reducir la viabilidad celular. Una mayor viabilidad celular (60%) debido a la solución de ONB al 10% indica que los ONB liberaron una cantidad significativa de oxígeno a través del proceso de difusión para revertir las condiciones hipóxicas, y esto fue crucial para la supervivencia celular. Las células cultivadas en condiciones normales mostraron una viabilidad celular del 85,14%. Figura 5 (G) muestra la vista superior de la cámara de hipoxia hecha a medida. Las condiciones de hipoxia se crearon con éxito colocando placas de seis o 24 pocillos en esta cámara y purgando gas argón a través de la cámara como

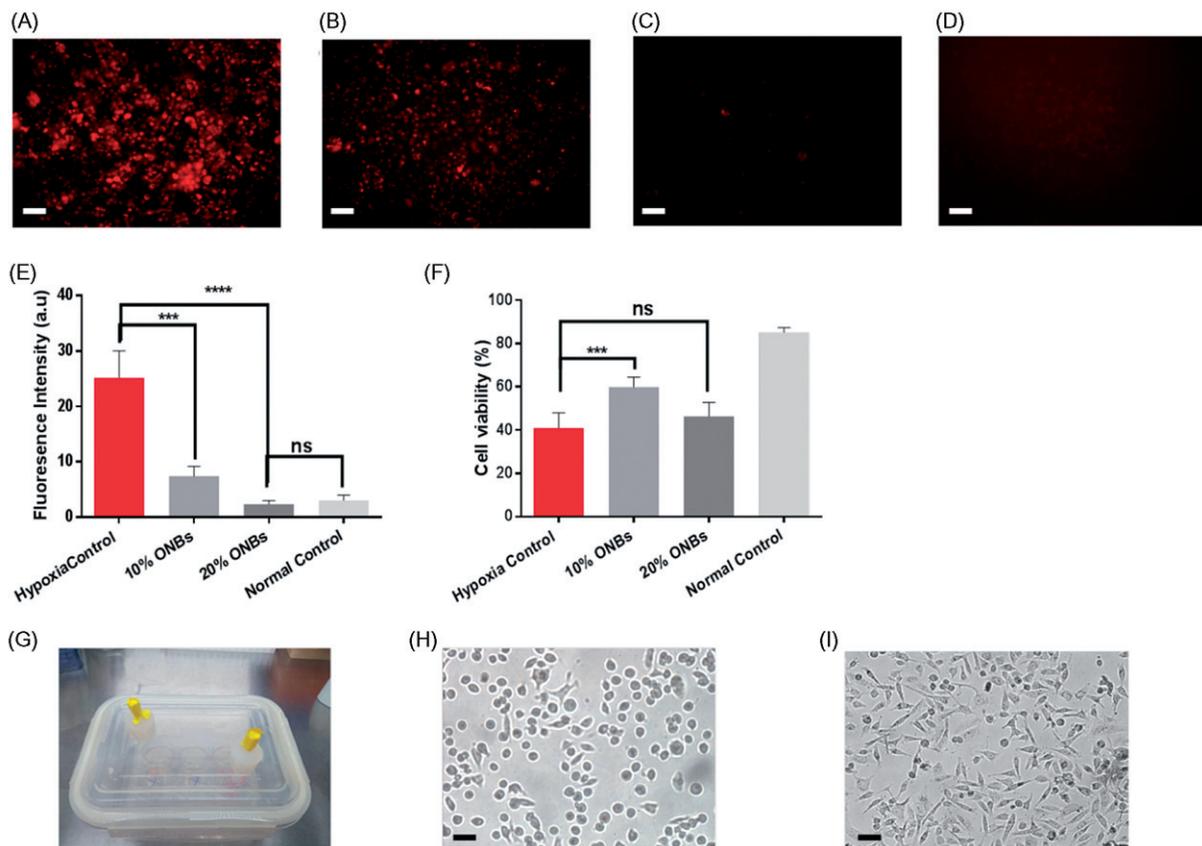


Figura 5. Resultados del experimento de hipoxia. (A) Fluorescencia de Image-iT de células MDA-MB-231 en condiciones hipóxicas. Barra de escala 200 micrometro. (B) Inversión de la hipoxia indicada por la reducción de la fluorescencia cuando se añadió una solución de ONB al 10%. (C) Inversión de la hipoxia indicada por la reducción de la fluorescencia cuando se añadió una solución de ONB al 20%. (D) Fluorescencia del reactivo de hipoxia image-IT en condiciones normales de incubación como control normal. (E) Intensidad de fluorescencia del reactivo de hipoxia image-iT comparada a través del software ImageJ en condiciones hipóxicas, reversión de condiciones hipóxicas y control normal; ---p <.001, ----p <.0001, norte 4. (F) Viabilidad celular medida por tinción con azul tripán en condiciones hipóxicas, reversión de condiciones hipóxicas usando soluciones ONB al 10% y 20%, y condiciones normales; ---p <.001, ns significa que no hay diferencia significativa, norte 3. (G) Imagen de la cámara de hipoxia utilizada para crear condiciones hipóxicas. (H) Morfología celular de la muestra de control cuando las células MDA-MB-231 permanecieron bajo hipoxia y sufrieron muerte celular, barra de escala 200 micrometro. (I) Morfología celular de la supervivencia celular después de la reversión de la hipoxia, barra de escala 200 micrometro.

descrito anteriormente. Se encontró que de seis a ocho horas de incubación era el tiempo óptimo para condiciones hipóxicas. **Figura 5 (H)** muestra la morfología celular de la muestra de control de hipoxia cuando las células no se trataron con ONB. Se encontró que las células tenían forma redonda y morfología diferente. **Figura 5 (I)** muestra la morfología celular cuando las células se trataron con ONB al 10% y la mayoría de las células sobrevivieron después del tratamiento con ONB al 10%.

Figura 6 (A) muestra una imagen fluorescente de HIF-1 α proteína como indicador de condiciones hipóxicas. Anti-HIF-1 conjugado con FITC. Se utilizaron tinciones de anticuerpos y DAPI para la formación de imágenes de fluorescencia. De las cifras se desprende claramente que la expresión de HIF-1 α se redujo cuando las células se trataron con la solución de ONB al 10%. **Figura 6 (B)** exhibe la expresión de HIF-1 α proteína evaluada mediante el método ELISA indirecto en comparación con la muestra de control. Las condiciones hipóxicas muestran una expresión máxima de HIF-1 α (valor medio de intensidad 0,26 au, $p < .05$) y cuando las células se trataron con la solución de ONB al 10%, la expresión de HIF-1 α reducida (intensidad media 0,20 au). El HIF-1 α La expresión en condiciones hipóxicas fue significativamente mayor ($p < .01$) cuando las células se mantuvieron en condiciones normales. Las células en condiciones normales mostraron una diferencia no significativa en HIF-1 α expresión con células mantenidas en hipoxia y tratadas con ONB. Por lo tanto, se puede concluir que los ONB suministran oxígeno a través de la difusión y ayudan a revertir las condiciones hipóxicas.

Discusión

En este trabajo, sintetizamos ONB con caparazón de lípidos para el suministro de oxígeno. Las cáscaras de fosfolípidos en combinación con tensioactivos lipídicos PEGilados ayudan a reducir el tamaño de las burbujas al rango nanométrico. Son estables, biocompatibles y capaces de proporcionar la posibilidad de unir grupos funcionales al caparazón de la burbuja. El DSPC se ha utilizado como un lípido base y se ha informado que es más estable que algunas otras fosfocolinas y permite la permeabilidad a los gases [19]. Los ONB se sintetizaron en presencia de un suministro continuo de oxígeno para que los fosfolípidos se autoensamblaran alrededor del gas hidrófobo, formando una capa de monocapa hidrófila. Usamos biotina y amina como grupos funcionales en el

cáscaras de fosfolípidos. La funcionalidad de la biotina se probó utilizando un tinte de fluorescencia FITC-avidina, que se conjugó con éxito con la biotina para hacer las conchas de burbujas fluorescentes que se muestran en los resultados. Esta afinidad se puede utilizar además para añadir varios fármacos o nanopartículas a las cáscaras de los ONB.

La microscopía óptica y de fluorescencia se empleó con éxito para observar y contar microburbujas. En particular, las microburbujas de más de 5 μm demostró composiciones de núcleo de cáscara transparente en imágenes fluorescentes. Las imágenes de microscopía confocal y las imágenes SEM tomadas con gel de agarosa también mostraron la superficie esférica del caparazón de las microburbujas, mientras que las imágenes TEM revelaron la composición núcleo-caparazón de las nanoburbujas.

Un NTA y un DLS pudieron determinar el rango de tamaño y la estabilidad de los ONB y los resultados de ambos dispositivos mostraron similitudes con tamaños medios en el rango de 200 a 400 nm. El tamaño de los ONB se puede controlar ajustando los parámetros de sonicación y la composición de los lípidos. Pudimos sintetizar una mayor concentración de ONB en el rango de 4.2 10^{11} nanoburbujas / ml de lo que se informó anteriormente en la literatura (1 10^9 burbujas / mL) [8] mediante el uso de una mayor concentración de lípidos constituyentes y aumentando el tiempo de duración de la sonicación. Nuestras muestras incluían burbujas de tamaño micro en el rango de 4 10^7 microburbujas / mL, que es aproximadamente 10^4 veces menor que la concentración de nanoburbujas. Estas microburbujas se pueden filtrar, limitando así el tamaño de las burbujas en el rango nano, que ofrece mayores ventajas terapéuticas debido al EPR [dieciséis].

La formulación de liposomas de los mismos constituyentes sin oxigenación también se utilizó para probar el impacto de los lípidos constituyentes en la viabilidad celular. Los resultados mostraron que una concentración de 416 μg / mL de lípidos g / mL redujeron la viabilidad celular en un 20-30%. Esto se puede atribuir a una mayor concentración de lípidos. Los ONB que tienen una concentración de menos del 10% del volumen de medio fueron beneficiosos para la viabilidad celular durante los experimentos de hipoxia, ya que mejoraron la viabilidad celular en un 20% en comparación con la muestra de control. Los ONB en concentraciones más bajas (menos del 1%) mejoraron la viabilidad celular en condiciones normales al

5% en comparación con la muestra de control. Esto muestra que la oxigenación mejorada a través de ONB se puede utilizar para mejorar la viabilidad celular.

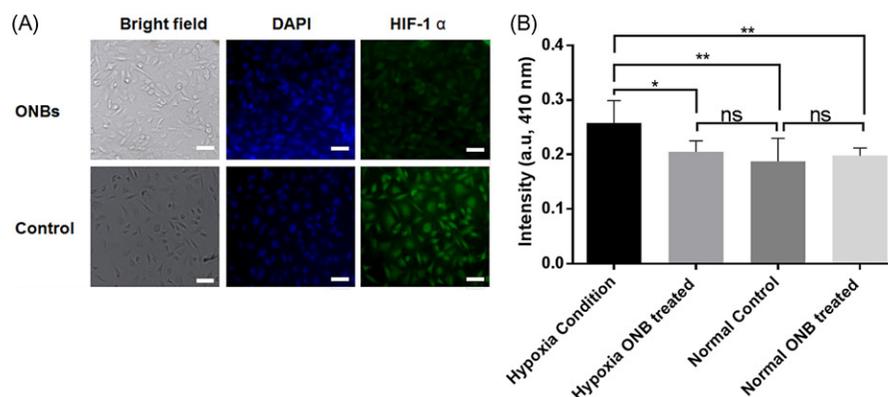


Figura 6. HIF-1 α ensayo de expresión. (A) Comparación de HIF-1 α expresión en control y después de la reversión de condiciones hipóxicas. Anti-HIF-1 conjugado con FITC. Los anticuerpos se utilizaron junto con la tinción DAPI de las células MDA-MB-231. La expresión reducida de anti-HIF-1 α es claramente observable en la imagen fluorescente, lo que indica una degradación exitosa de HIF-1 α proteína debida a ONB. Barras de escala $20 \mu\text{m}$. (B) HIF-1 α expresión evaluada mediante el método ELISA indirecto. El control de hipoxia es la muestra sin tratar en condiciones hipóxicas. Burbuja de hipoxia significa las muestras en la cámara de hipoxia tratadas con ONB. El control normal es una muestra sin tratar en condiciones normales. Burbuja normal significa las muestras tratadas con ONB en condiciones normales; $p < .05$, $p < .01$, ns significa sin importancia, norte $\frac{1}{3}$.

Usamos los ONB para liberar oxígeno a través de un mecanismo de difusión, ya que los fosfolípidos son permeables al gas. Debido a la limitación del sensor de oxígeno disuelto para detectar el oxígeno dentro del núcleo de ONB, el experimento fue diseñado para suministrar oxígeno al agua desoxigenada. La liberación de oxígeno de los ONB se comparó con el DPBS oxigenado y la muestra de control. La concentración de oxígeno disuelto antes del experimento de ONB y DPBS oxigenado fue similar (17,1 mg / ml y 16,9 mg / ml, respectivamente). ONBs lanzaron aproximadamente 500 metrog / mL más oxígeno en comparación con DPBS oxigenado, lo que demuestra la síntesis exitosa de ONB con oxígeno gaseoso como parte de su núcleo. Esto proporciona evidencia de que los ONB se pueden utilizar para suministrar más oxígeno en comparación con los DPBS saturados de oxígeno.

Pudimos crear condiciones hipóxicas de manera repetible en nuestra cámara de hipoxia de bajo costo hecha a medida. Sobreexpresión de HIF-1a La proteína y la fluorescencia del reactivo de hipoxia imageIT mostraron que nuestra cámara de hipoxia era capaz de crear las condiciones hipóxicas deseadas. La incubación de 6 a 8 h en la cámara de hipoxia, después de purgarla con argón durante 20 min, fue suficiente para observar la fluorescencia del reactivo de hipoxia imageIT. La viabilidad celular fue aproximadamente del 40% en la muestra de control en el experimento de hipoxia, mientras que aumentó al 60% cuando se usaron ONB al 10% para revertir la hipoxia. Sin embargo, el 20% de ONB no mostró diferencias significativas en la viabilidad celular en comparación con la muestra de control. Esto indicó que una concentración de ONB del 10% o menos es mejor para la viabilidad celular y la reversión de la hipoxia.

La sobreexpresión y estabilización de HIF-1a se ha asociado con una mayor supervivencia de los tumores y, por lo tanto, varios investigadores se han centrado en el silenciamiento / inhibición de HIF-1a para un mejor tratamiento del cáncer. Nuestros resultados indicaron que HIF-1a la expresión se redujo en presencia de ONB y que los ONB se pueden usar para suprimir HIF-1a.

Creemos que este modelo puede repetirse en tumores y que el mecanismo de difusión puede emplearse suficientemente para revertir las condiciones hipóxicas en los tumores. Esto puede eliminar el requisito de utilizar ultrasonido en combinación con burbujas, ya que los ONB pueden penetrar en los tumores mediante el efecto EPR [37].

Conclusiones

En este artículo se presenta una técnica de síntesis para ONB. Los ONB se emplearon con éxito para revertir las condiciones hipóxicas creadas en una cámara de hipoxia hecha a medida, con una reducción en la expresión de HIF-1a, lo que indica que fueron capaces de lograr la reversión de las condiciones hipóxicas. Los ONB se pueden conjugar con fármacos / biomoléculas evaluados mediante ONB fluorescentes.

Declaración de divulgación

Los autores no informaron ningún conflicto de intereses potencial.

Fondos

Este estudio fue apoyado por el Programa de Desarrollo de Tecnología de Nano-Materiales de la Fundación Nacional de Investigación de Corea (NRF) financiado por el Ministerio de Ciencia y TIC (No. 2017M3A7B8061942).

ORCID

Jonghoon Choi  <http://orcid.org/0000-0003-3554-7033>

Referencias

- [1] Cavalli R, Bisazza A, Giustetto P, et al. Preparación y caracterización de nanoburbujas de dextrano para suministro de oxígeno. *Int J Pharm.* 2009; 381: 160-165.
- [2] Magnosto C, Prato M, Khadjavi A, et al. Nanogotas con núcleo de decafluoropentano y con cáscara de quitosano activadas por ultrasonido para el suministro de oxígeno a los tejidos cutáneos hipóxicos. *RSC Adv.* 2014; 4: 38433-38441.
- [3] Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Vía reguladora del factor inducible por hipoxia (HIF) -1 y su potencial de intervención terapéutica en neoplasias e isquemia. *Yale J Biol Med.* 2007; 80: 51.
- [4] Wigerup C, Pählman S, Bexell D. Orientación terapéutica de la hipoxia y los factores inducibles por hipoxia en el cáncer. *Pharmacol Ther.* 2016; 164: 152-169.
- [5] Razorenova OV, Giaccia AJ. Hipoxia, expresión génica y metástasis. El microambiente tumoral. Nueva York (NY): Springer; 2010. p. 43-58.
- [6] Rapisarda A, Melillo G. Estrategias de combinación dirigidas al factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) para la terapia del cáncer. El microambiente tumoral. Nueva York (NY): Springer; 2010. p. 3-21.
- [7] Kwan JJ, Kaya M, Borden MA, Dayton PA. Entrega teranóstica de oxígeno mediante ultrasonidos y microburbujas. 2012; 2 (12): 1174.
- [8] McEwan C, Owen J, Stride E, et al. Microburbujas portadoras de oxígeno para mejorar la terapia sonodinámica de tumores hipóxicos. *J Control de liberación.* 2015; 203: 51-56.
- [9] Melillo G. Inhibición del factor 1 inducible por hipoxia para la terapia del cáncer. *Mol Cancer Res.* 2006; 4: 601-605.
- [10] Owen J, McEwan C, Nesbitt H, et al. Reducir la hipoxia tumoral mediante la administración oral de nanoburbujas de oxígeno. *Más uno.* 2016; 11: e0168088.
- [11] Eisenbrey JR, Albala L, Kramer MR, et al. Desarrollo de un portador de oxígeno sensible a los ultrasonidos para el suministro de oxígeno al tejido hipóxico. *Int J Pharm.* 2015; 478: 361-367.
- [12] Zhao W, Hu X, Duan J, et al. Liberación de oxígeno de nanoburbujas adsorbidas en partículas hidrofóbicas. *Chem Phys Lett.* 2014; 608: 224-228.
- [13] Li F, Mei H, Gao Y, et al. Co-suministro de oxígeno y erlotinib por complejos liposomales modificados por aptámeros para revertir la resistencia a fármacos inducida por hipoxia en el cáncer de pulmón. *Biomateriales.* 2017; 145: 56-71.
- [14] Malda J, Klein TJ, Upton Z. El papel de la hipoxia en la ingeniería in vitro de tejidos. *Tissue Eng.* 2007; 13: 2153-2162.
- [15] Kheir JN, Polizzotti BD, Thomson LM y col. Fabricación a granel de micropartículas llenas de gas oxígeno concentrado para el suministro de oxígeno por vía intravenosa. *Adv Healthc Mater.* 2013; 2: 1131-1141.
- [16] Fix SM, Borden MA, Dayton PA. Suministro de gas terapéutico a través de microburbujas y liposomas. *J Control de liberación.* 2015; 209: 139-149.
- [17] Legband ND, Feshitan JA, Borden MA, et al. Evaluación de la terapia de oxigenación con microburbujas peritoneales en un modelo de hipoxemia de conejo. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2015; 62: 1376-1382.
- [18] Black KJ, Lock AT, Thomson LM, et al. Efectos hemodinámicos de microburbujas de oxígeno a base de lípidos mediante inyección intravenosa rápida en roedores. *Pharm Res.* 2017; 34: 2156-2162.
- [19] Feshitan JA, Legband ND, Borden MA, et al. Suministro de oxígeno sistémico por perfusión peritoneal de microburbujas de oxígeno. *Biomateriales.* 2014; 35: 2600-2606.

- [20] Cavalli R, Bisazza A, Lembo D. Micro y nanoburbujas: una plataforma no viral versátil para la entrega de genes. *Int J Pharm.* 2013; 456: 437–445.
- [21] Hernot S, Klibanov AL. Microburbujas en la administración de genes y fármacos activados por ultrasonidos. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1153–1166.
- [22] Unger EC, Porter T, Culp W, et al. Aplicaciones terapéuticas de microburbujas recubiertas de lípidos. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 1291–1314.
- [23] Geers B, Lentacker I, Sanders NN, et al. Microburbujas autoensambladas cargadas de liposomas: el eslabón perdido para una administración de fármacos activada por ultrasonidos segura y eficiente. *J Control de liberación.* 2011; 152: 249–256.
- [24] McDannold N, Zhang Y, Vykhodtseva N. Los efectos del oxígeno en la alteración de la barrera hematoencefálica inducida por ultrasonidos en ratones. *Ultrasonido Med Biol.* 2017; 43: 469–475.
- [25] Sirsi S, Borden M. Composiciones de microburbujas, propiedades y aplicaciones biomédicas. *Bubble Sci Eng Technol.* 2009; 1: 3–17.
- [26] Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Microburbujas de ultrasonido encapsuladas: aplicación terapéutica en la administración de fármacos / genes. *J Control de liberación.* 2006; 114: 89–99.
- [27] Matsuki N, Takuji I, Shingo I, Naoki S, Yoshihito U, Takami Y. Fluido supersaturado de oxígeno que utiliza micro / nanoburbujas finas. *Int J Nanomed.* 2014; 9: 4495.
- [28] Yoon YI, Kwon YS, Cho HS y col. Administración de fármacos y genes mediada por ultrasonidos utilizando un sistema de partículas de microburbujas y liposomas. *Teranósticos.* 2014; 4: 1133.
- [29] Swanson EJ, Mohan V, Kheir J y col. Espuma de microburbujas estabilizada con fosfolípidos para suministro de oxígeno inyectable. *Langmuir.* 2010; 26: 15726–15729.
- [30] Swanson EJ, Borden MA. Suministro de oxígeno inyectable basado en microburbujas con cáscara de proteína. *Nano Life.* 2010; 01: 215–218.
- [31] Gerber F, Waton G, Krafft MP, et al. Microburbujas de larga duración para el suministro de oxígeno. *Artif Cells Blood Subst Biotechnol.* 2007; 35: 119–124.
- [32] Koshiyama K, Wada S. Colapso de una nanoburbuja recubierta de lípidos y posterior formación de liposomas. *Sci Rep.* 2016; 6: 28164.
- [33] Pitt WG, Husseini GA, Staples BJ. Entrega de medicamentos por ultrasonidos: una revisión general. *Opinión del experto Drug Deliv.* 2004; 1: 37–56.
- [34] Bhandari P, Wang X, Irudayaraj J. Seguimiento de nanoburbujas de oxígeno por dispersión de luz en células individuales y tejidos. *ACS Nano.* 2017; 11: 2682–2688.
- [35] Bhandari PN, Cui Y, Elzey BD y col. Las nanoburbujas de oxígeno revierten la hipoxia mediante la programación de metilación. *Sci Rep.* 2017; 7: 9268.
- [36] Kheir JN, Scharp LA, Borden MA y col. Las micropartículas llenas de oxígeno proporcionan un suministro de oxígeno intravenoso. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 140ra88.
- [37] Cavalli R, Soster M, Argenziano M. Nanobubbles: una herramienta eficiente y prometedora para la administración terapéutica. *Ther Deliv.* 2016; 7: 117–138.
- [38] Lee M, Lee EY, Lee D y col. Estabilización y fabricación de microburbujas: aplicaciones con fines médicos y materiales funcionales. *Materia blanda.* 2015; 11: 2067–2079.
- [39] Wang R, Jin F, Zhong H. Una nueva cámara de hipoxia experimental para cultivo celular. *Soy J Cancer Res.* 2014; 4:53.
- [40] Zhang S, Hosaka M, Yoshihara T, et al. Los complejos de iridio emisores de luz fosforescente sirven como una sonda de detección de hipoxia para la obtención de imágenes de tumores en animales vivos. *Cancer Res.* 2010; 70: 4490–4498.