TECNIACÚSTICA
CUENCA 2023

Imagen fotoacústica empleando nanopartículas de redes orgánicas covalentes (nCOFs) como agente de contraste

Irene Pi-Martín [1], Carla María Vidaurre Agut [2], Alejandro Cebrecos [1], Juan J. García-Garrigós [1], Noé Jiménez [1], Pablo Botella Asunción [2], Francisco Camarena [1]

[1] *Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular (i3M)*
[2] *Instituto de Tecnología Química (ITQ)*
Universitat Politècnica de València- CSIC, Camino de Vera S/N, 46022, Valencia, Spain

RESUMEN

La imagen fotoacústica permite obtener imágenes moleculares y funcionales en cualquier medio biológico. Empleando contrastes exógenos (típicamente nanopartículas de oro) se puede mejorar la calidad de las imágenes obtenidas y utilizarlos como marcadores de dianas fisiopatológicas específicas. En este trabajo se ha estudiado la viabilidad de utilizar nanopartículas de redes orgánicas covalentes (nCOFs) como agentes de contraste exógenos para imagen fotoacústica. Para ello, se ha comparado la respuesta de dos tipos de nCOFs (TAPB-PDA y LZU-1) con el estándar actual. Los resultados obtenidos señalan a ambos tipos de nCOFs como agentes de contrastes muy prometedores para imagen fotoacústica debido a su satisfactoria respuesta y su biocompatibilidad. El empleo de nCOFs biocompatibles permitirá obtener imágenes moleculares de alta calidad empleando altas dosis de contraste y minimizando los efectos secundarios.

ABSTRACT

Photoacoustic imaging allows molecular and functional imaging in any biological medium. Using exogenous contrasts (typically gold nanoparticles) can improve the quality of the images obtained and be used as biomarkers for specific pathophysiological targets. In this work we have studied the feasibility of covalent organic frameworks (nCOFs) as exogenous contrast agents for photoacoustic imaging. For this purpose, the response of two types of nCOFs (TAPB-PDA and LZU-1) has been compared with the current standard. The results obtained point both types of nCOFs as very promising contrast agents for photoacoustic imaging due to their satisfactory response and biocompatibility. The use of biocompatible nCOFs will allow obtaining high quality molecular images using high contrast doses and minimising side effects.

Palabras Clave— fotoacústica, agentes de contraste exógenos, biocompatibilidad, redes orgánicas covalentes.

1. INTRODUCCIÓN

La imagen fotoacústica proporciona información funcional y molecular sobre el organismo, que puede utilizarse tanto como herramienta diagnóstica como para el seguimiento del tratamiento [1, 2]. El uso de contrastes externos, como nanopartículas de oro (NPAu) o tintas, puede mejorar el contraste y la profundidad de penetración de las imágenes [3-5]. Estos agentes de contraste exógenos pueden acumularse pasivamente en zonas de interés, por ejemplo, en tumores. Sin embargo, también pueden ser moléculas complejas diseñadas para tener una afinidad activa por dianas muy específicas [2, 6]. El principal inconveniente de las moléculas utilizadas convencionalmente como agentes de contraste exógenos es su acumulación en el organismo. Se asume que el organismo no será capaz de deshacerse del contraste administrado y, por tanto, para minimizar el estrés oxidativo generado por su administración se emplean concentraciones muy bajas [7-10].

En los últimos años, se ha trabajado en el desarrollo de moléculas menos dañinas para el organismo o, al menos, que el propio cuerpo sea capaz de desintegrarlas por completo [11-16]. En concreto, este trabajo se centra en evaluar la viabilidad de las nanopartículas de redes orgánicas covalentes (nCOFs), materiales 100% orgánicos, inocuos para el organismo y biodegradables, como agentes de contraste exógenos. Idealmente, estas estructuras químicamente complejas pueden cargarse con fármacos que se liberan localmente en la zona de iluminación láser o con otro tipo de agentes [11] sintonizables a la longitud de onda deseada, en función de la excitación láser utilizada para obtener la imagen fotoacústica [15].

En este trabajo, nos hemos centrado en evaluar el potencial de los nCOFs LZU-1 [17] y 1,3,5-tris(4-aminofenil)benceno-tereftalaldehído (TAPB-PDA) [18] como agentes de contraste exógenos para tomografía fotoacústica con su estructura original, sin modificarlos ni añadirles ningún cromóforo. Además, se ha utilizado el fluorocromo ATTO532 cargado en nanopartículas de sílice mesoporosa

(MSNs) para utilizarlas, junto con las nanopartículas de oro, como referencia del nivel de respuesta fotoacústica (PA, del acrónimo inglés) adecuado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Montaje experimental

La Fig. 1 muestra un diagrama esquemático del montaje experimental utilizado para obtener la respuesta PA de las nanopartículas. Las muestras objeto de estudio se diluyeron en una disolución tampón PBS (Phosphate Buffered Saline) y se colocaron dentro de cánulas de plástico, paralelas a la sonda receptora, y sumergidas a 25 mm de profundidad en agua desionizada.

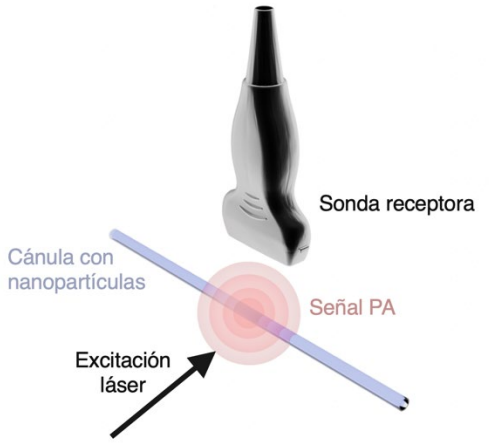


Figura 1. Diagrama del montaje experimental empleado.

El sistema de obtención de imágenes empleado consta de un láser de oscilador paramétrico óptico (OPO) EKSPLA NT350A trabajando a 532 nm, con un haz de diámetro 15 mm, una frecuencia de repetición de pulsos de 10 Hz y duración de 6 ns, sincronizado con el sistema de adquisición Vantage 256^{TM} de Verasonics acoplado a la sonda ultrasónica lineal de de 128 elementos L11-5v.

El sistema implementado es un sistema dual de imagen ultrasónica y fotoacústica. Las imágenes de ultrasonidos proporcionan el posicionamiento de la cánula en el espacio de imagen, y las imágenes fotoacústicas aportan la respuesta PA de las nanopartículas iluminadas por el haz láser.

2.2. Desarrollo experimental

Se han realizado dos estudios experimentales. En primer lugar, se ha evaluado si la amplitud de la respuesta PA de las alternativas orgánicas propuestas es similar a la de referencia. Para ello se ha seleccionado una excitación láser a 532 nm, el estándar de trabajo con NPAu y donde tienen el máximo de absorción óptica, para así comparar la amplitud de la respuesta PA del oro con los dos nCOFs objeto de estudio (LZU-1 y TAPB-PDA) y con las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) marcadas con el cromóforo ATTO532. En este estudio, todas las muestras utilizadas se diluyeron a 0.1 mg/ml, ya que ésta es la concentración máxima de NPAu que suele utilizarse en ensayos.

En segundo lugar, se ha estudiado cómo crece la señal PA con el aumento de la concentración de LZU-1, TAPB-PDA y MSN + ATTO532. Para este estudio, se utilizó la misma excitación láser de longitud de onda fija a 532 nm, y se midieron las muestras a las siguientes concentraciones: 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml y 5 mg/ml.

2.3. Procesado

Para cuantificar la respuesta fotoacústica de cada muestra, en todos los casos se ha obtenido la imagen ultrasónica en modo B empleado un conformador de retardo y suma, que permite definir el interior de la cánula que contiene las muestras. Posteriormente, sin modificar la posición de la cánula ni la sonda, se adquiere la imagen fotoacústica con la sonda y, posteriormente, se integran las señales recibidas para obtener un único nivel de respuesta. La conformación de la imagen fotoacústica se ha realizado empleando un conformador de retardo y suma en modo recepción.

2.4. Modelo teórico

La presión (p0) generada por el efecto PA en un punto r, suponiendo un calentamiento impulsivo, es proporcional a la densidad de energía óptica absorbida H(r) y se define por

$$p_0(r) = \Gamma H(r) = \Gamma \mu_a(r)\phi(r;\mu_a,\mu_s,g), \qquad (1)$$

donde Γ es el coeficiente de Grüneisen, que es adimensional y depende de las propiedades termodinámicas del medio, ϕ es la fluencia óptica (energía por unidad de superficie), μ_a y μ_s son los coeficientes de absorción y dispersión del medio iluminado y g es su factor de anisotropía.

La fluencia óptica se escribe en función de la ley de Beer-Lambert de absorción óptica a través de un medio como

$$\phi = \phi_0\, e^{-\mu l}, \qquad (2)$$

donde se considera que $\mu = \mu_a+\mu_s$ es el coeficiente de atenuación, ϕ_0 es la fluencia de la luz incidente y l es el espesor del material a través del cual viaja la luz.

Dadas las Ecs. 1 y 2, la presión generada por el efecto fotoacústico queda como

$$p_0 = \Gamma \mu I_0 \, e^{-\mu l}. \quad (3)$$

El coeficiente de absorción depende directamente de la concentración c, según

$$\mu = \varepsilon c ln10, \quad (4)$$

donde ε es el coeficiente de atenuación molar y el factor logarítmico corresponde a sustancias líquidas. Por lo tanto, la expresión teórica de la curva de presión en función de la concentración utilizada para el ajuste de los datos experimentales en la Fig. 3 será de la forma

$$p_0 = ace^{-bc}, \quad (5)$$

donde $a = \Gamma \, \phi_0 \, \varepsilon ln10$ y $b = \varepsilon ln10 l$ son los parámetros de ajuste.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 2 representa la respuesta fotoacústica obtenida para el control (PBS), las nanopartículas de oro (Au), las nCOFs LZU-1 y TAPB-PDA y las MSN marcadas con el cromóforo ATTO532. Todas las muestras están diluidas sobre PBS a una concentración de 0.1 mg/ml. Se realizaron seis réplicas por muestra. El diagrama de caja y bigotes representa la mediana, representada por la línea horizontal, y los extremos inferior y superior de la caja indican los percentiles 25 y 75; los bigotes se han extendido a los puntos de datos más extremos que no se consideran valores atípicos. En estas pruebas no se han detectado valores atípicos.

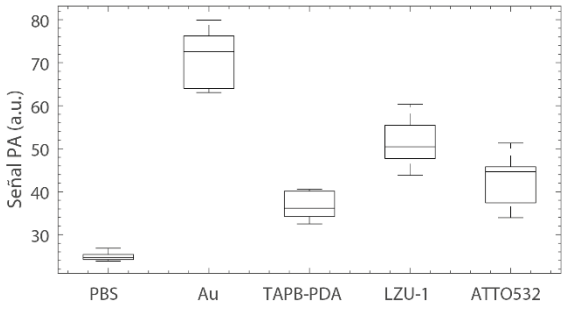


Figura 2. Representación en diagrama de caja y bigotes de la prueba comparativa de nivel de señal PA de nanopartículas de oro (referencia comercial) frente a nCOFs (TAPB-PDA y LZU-1) y MSNs marcadas con el cromóforo ATTO532. La señal PA de control del PBS, medio de disolución de las muestras, determina el nivel PA de fondo. Todas las muestras tienen una concentración de 0.1 mg/ml.

En el gráfico se observa que las muestras orgánicas generan respuestas PA inferiores al estándar comercial (Au), pero significativas. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que tanto las nanopartículas de red orgánica LZU-1 y TAPB-PDA como las MSNs cromoetiquetadas con ATTO532 tienen un gran potencial para su uso como contrastes exógenos en imagen fotoacústica, ya que presentan un nivel de respuesta cercano a la referencia. Cabe resaltar que, dado que las nanopartículas de red orgánica son inocuas para el organismo, existe la posibilidad de administrar dosis de mayores concentraciones del compuesto, aumentando el nivel de respuesta sin perjudicar al futuro paciente, como se demuestra en el siguiente apartado.

La Fig. 3 muestra cómo la respuesta fotoacústica de las nCOFs estudiados y de las MSNs marcadas con ATTO532 aumenta con la concentración. Para cada concentración estudiada se han realizado 24 réplicas. En esta figura se muestran los resultados experimentales obtenidos para cada muestra y el ajuste basado en la aproximación teórica de la señal PA descrita en 2.4. Modelo teórico.

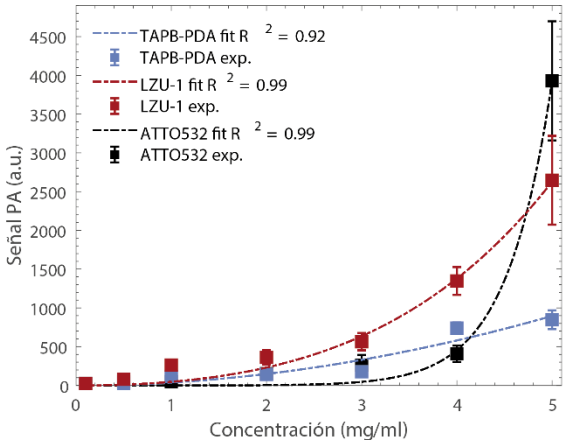


Figura 3. Intensidad PA en función de la concentración de nanopartículas. Los marcadores cuadrados representan la señal media obtenida a partir de las 24 réplicas realizadas para cada muestra, las líneas verticales unidas a ellos representan la barra de error experimental. El ajuste de la expresión teórica (Ec. 5) a los datos experimentales se ha representado con líneas discontinuas.

En primer lugar, se observa que la expresión del modelo teórico describe muy bien el comportamiento observado en los experimentos, teniendo un valor de correlación R superior a 0.9 para los tres casos. Además, se observa una gran ventaja de las redes orgánicas como contraste exógeno para la PA, ya que se demuestra que aumentando su concentración se incrementa la señal generada y, por tanto, el contraste de la imagen obtenida. Dado que las nCOFs son inocuas para el organismo, no es necesario limitarse a la dosis máxima de 0.1 mg/ml comúnmente utilizada con NPAu, pudiendo aumentar la concentración para conseguir niveles de respuesta varios órdenes de magnitud superiores.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha evaluado la respuesta fotoacústica de diferentes nanopartículas con el fin de estudiar su viabilidad como agentes de contraste exógenos en imagen fotoacústica para aplicaciones médicas. Los resultados muestran que las nCOFS estudiadas presentan un nivel de respuesta similar al máximo generado por nanopartículas oro, i.e., para una longitud de onda (532 nm). Además, dado que los nCOFS son inocuas para el organismo, este estudio podría ampliarse a concentraciones mayores, con el resultado esperable de obtener mejores niveles de contraste en la imagen. Estos resultados señalan a los compuestos orgánicos LZU-1 y TAPB-PDA como excelentes agentes de contraste biocompatibles para imagen fotoacústica, permitiendo obtener imágenes moleculares de alta calidad, sin producir efectos adversos en el organismo.

12. REFERENCIAS

[1] P. Beard, Biomedical photoacoustic imaging, Interface focus 1 (2011) 602–631.

[2] B. Park, S. Park, J. Kim, C. Kim, Listening to drug delivery and responses via photoacoustic imaging, Advanced Drug Delivery Reviews 184 (2022) 114235.

[3] J. Weber, P. C. Beard, S. E. Bohndiek, Contrast agents for molecular photoacoustic imaging, Nature methods 13 (2016) 639–650.

[4] V. P. Nguyen, W. Qian, Y. Li, B. Liu, M. Aaberg, J. Henry, W. Zhang, X. Wang, Y. M. Paulus, Chainlike gold nanoparticle clusters for multimodal photoacoustic microscopy and optical coherence tomography enhanced molecular imaging, Nature Communications 12 (2021) 34.

[5] C. Xie, X. Zhen, Y. Lyu, K. Pu, Nanoparticle regrowth enhances photoacoustic signals of semiconducting macromolecular probe for in vivo imaging, Advanced Materials 29 (2017) 1703693.

[6] K. Wilson, K. Homan, S. Emelianov, Biomedical photoacoustics beyond thermal expansion using triggered nanodroplet vaporization for contrast-enhanced imaging, Nature communications 3 (2012) 618.

[7] A. Manke, L. Wang, Y. Rojanasakul, et al., Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity, BioMed research international 2013 (2013).

[8] A. Hariri, E. Zhao, A. S. Jeevarathinam, J. Lemaster, J. Zhang, J. V. Jokerst, Molecular imaging of oxidative stress using an led-based photoacoustic imaging system, Scientific reports 9 (2019) 11378.

[9] Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon, W. JahnenDechent, Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage, small 5 (2009) 2067–2076.

[10] J. J. Li, D. Hartono, C.-N. Ong, B.-H. Bay, L.-Y. L. Yung, Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles, Biomaterials 31 (2010) 5996–6003.

[11] Q. Guan, D.-D. Fu, Y.-A. Li, X.-M. Kong, Z.-Y. Wei, W.-Y. Li, S.-J. Zhang, Y.-B. Dong, Bodipy-decorated nanoscale covalent organic frameworks for photodynamic therapy, IScience 14 (2019) 180–198.

[12] D. Wang, Z. Zhang, L. Lin, F. Liu, Y. Wang, Z. Guo, Y. Li, H. Tian, X. Chen, Porphyrin-based covalent organic framework nanoparticles for photoacoustic imaging-guided photodynamic and photothermal combination cancer therapy, Biomaterials 223 (2019) 119459.

[13] Z. Mi, P. Yang, R. Wang, J. Unruangsri, W. Yang, C. Wang, J. Guo, Stable radical cation-containing covalent organic frameworks exhibiting remarkable structure-enhanced photothermal conversion, Journal of the American Chemical Society 141 (2019) 14433– 14442.

[14] J. Feng, W.-X. Ren, J.-L. Gao, F. Li, F. Kong, B.J. Yao, Y.-B. Dong, Core–shell-structured covalent– organic framework as a nanoagent for single-laserinduced phototherapy, ACS Applied Materials & Interfaces 13 (2021) 17243–17254.

[15] Y. Zhu, P. Shao, L. Hu, C. Sun, J. Li, X. Feng, B. Wang, Construction of interlayer conjugated links in 2d covalent organic frameworks via topological polymerization, Journal of the American Chemical Society 143 (2021) 7897–7902.

[16] Q. Guan, L.-L. Zhou, W.-Y. Li, Y.-A. Li, Y.-B. Dong, Covalent organic frameworks (cofs) for cancer therapeutics, Chemistry–A European Journal 26 (2020) 5583– 5591.

[17] Ding, S. Y., Gao, J., Wang, Q., Zhang, Y., Song, W. G., Su, C. Y., & Wang, W. (2011). Construction of covalent organic framework for catalysis: Pd/COF-LZU1 in Suzuki–Miyaura coupling reaction. Journal of the American Chemical Society, 133(49), 19816-19822.

[18] Smith, B. J., Overholts, A. C., Hwang, N., & Dichtel, W. R. (2016). Insight into the crystallization of amorphous imine-linked polymer networks to 2D covalent organic frameworks. Chemical Communications, 52(18), 3690-3693.