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-Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Av. Los Naranjos s/n, 46022 Valencia,
46022, Valencia, Spain

PACS: 43.35.Ud, 42.62.Be

Resumen

La imagen fotoacústica permite obtener imágenes moleculares y funcionales en cualquier medio biológico. Empleando contrastes endógenos se pueden estudiar procesos naturales o, mediante cromóforos exógenos, típicamente nanopartículas de oro, se puede mejorar la calidad de las imágenes obtenidas e incluso utilizarlos como marcadores de dianas fisiopatológicas específicas. En este trabajo exploramos la amplia gama de cromóforos empleados en imagen fotoacústica, profundizando especialmente en la viabilidad de utilizar nanopartículas de redes orgánicas covalentes (nCOFs) como agentes de contraste exógeno biocompatible y completamente inocuo. Para ello, se ha comparado la respuesta de dos tipos de nCOFs 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.

Palabras clave: fotoacústica, agentes de contraste exógenos, biocompatibilidad, redes orgánicas covalentes.

Abstract

Photoacoustic imaging allows obtaining molecular and functional images in any biological medium. Using endogenous contrasts is possible to study natural processes and using exogenous chromophores, typically gold nanoparticles, it is possible to improve the quality of the images obtained or even use them as markers of specific pathophysiological targets. In this work we explored the wide range of chromophores used in photoacoustic imaging, especially delving into the feasibility of using nanoparticles of covalent organic networks (nCOFs) as biocompatible and completely harmless exogenous contrast agents. For this purpose, the response of two types of nCOFs has been compared with the current standard. The results obtained point to 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 make it possible to obtain high quality molecular images using high contrast doses and minimizing side effects.

Keywords: photoacoustics, exogenous contrast agents, biocompatibility, organic covalent networks.

1. Introducción

La fotoacústica es una técnica de imagen médica emergente que permite visualizar estructuras y procesos biológicos en profundidad. Esta técnica combina la alta resolución espacial de la tomografía por ultrasonido y la alta sensibilidad al contraste de la espectroscopía óptica [1]. La clave de la imagen fotoacústica radica en los cromóforos, moléculas que absorben la luz y generan señales acústicas detectables cuando son excitadas por pulsos láser. Estos cromóforos, que pueden ser naturales o diseñados químicamente en un laboratorio, desempeñan un papel crucial en la mejora del contraste y la especificidad de la técnica [2].

En este artículo, exploraremos la amplia gama de cromóforos empleados en imagen fotoacústica, desde las propias sustancias presentes en los tejidos biológicos hasta las nanopartículas sintéticas diseñadas para aplicaciones específicas. Examinaremos las propiedades fundamentales de estos cromóforos, sus ventajas y limitaciones, y cómo se han convertido en piezas clave para

la obtención de imágenes detalladas en una variedad de contextos, desde la detección temprana de enfermedades hasta la monitorización de terapias. Además, discutiremos las últimas tendencias en el desarrollo de nuevos cromóforos exógenos orgánicos biocompatibles e inocuos para el organismo y su potencial impacto en la evolución de la imagen fotoacústica en el futuro.

1.1. Cromóforos endógenos

La imagen fotoacústica destaca por su capacidad para aprovechar los cromóforos endógenos (moléculas naturales) presentes en tejidos biológicos, como la hemoglobina, la melanina o los lípidos [3].

La ventaja de utilizar cromóforos endógenos es que no requiere administración de agentes de contraste externos, lo que la hace especialmente atractiva para aplicaciones clínicas. Estos cromóforos naturales proporcionan información valiosa sobre la anatomía y la función de los tejidos, y su capacidad de generación de contraste contribuye al diagnóstico temprano y a la comprensión de diversas enfermedades [3].

La imagen fotoacústica del tejido excitado dependerá de la longitud de onda con la que se ilumine dicho tejido, ya que cada cromóforo tiene un espectro de absorción característico, como se puede ver en la Fig. 1. A continuación, se detallan los ámbitos de aplicación de los cromóforos endógenos más empleados.

La melanina, responsable de la coloración de la piel, el cabello y los ojos, se ha utilizado para la detección y caracterización de lesiones cutáneas, así como para estudios de melanoma [1, 3]. Como se puede ver en la Fig.1, tiene un alto nivel de absorción a múltiples longitudes de onda.

La hemoglobina, presente en los glóbulos rojos de la sangre, es uno de los cromóforos endógenos más utilizados en fotoacústica. Su capacidad para absorber la luz en el rango del infrarrojo cercano permite aprovechar esta ventana óptica para detectar y visualizar vasos sanguíneos con una alta sensibilidad y a profundidades de varios centímetros, siendo de gran aplicación en investigación cardiovascular, detección temprana de enfermedades vasculares y la monitorización de la oxigenación en tejidos [1, 3]. Seleccionando excitaciones a 700 nm o 950 nm, se visualizarán venas o arterias respectivamente.

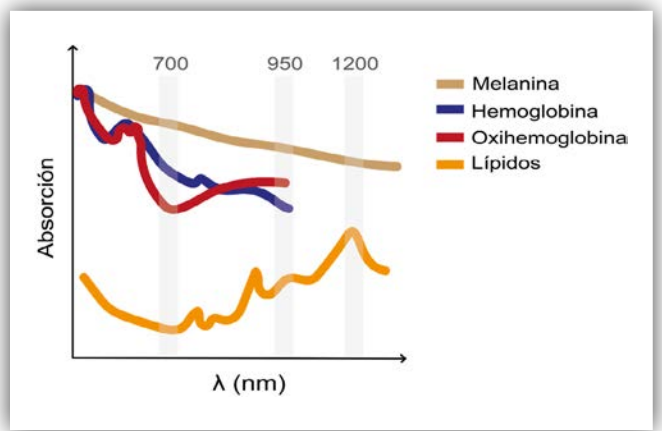


Figura 1. Espectro de absorción de los principales cromóforos endógenos empleados en fotoacústica [1].

Sin embargo, para estudiar enfermedades relacionadas con la acumulación de grasa, como la aterosclerosis o la obesidad, suele seleccionarse una excitación a 1200 nm para obtener imagen de los lípidos, componentes esenciales de las membranas celulares y tejidos adiposos [1, 3].

1.2. Cromóforos exógenos

Además de las moléculas naturalmente presentes en el organismo, la fotoacústica utiliza cromóforos exógenos, también conocidos como agentes de contraste, para ampliar su versatilidad y aplicaciones en la visualización de tejidos y procesos biológicos con alta precisión y sensibilidad [3]. Los cromóforos exógenos son nanopartículas diseñadas para interactuar selectivamente con tejidos o estructuras específicas y que, al ser irradiadas con pulsos láser, pueden generar una mayor respuesta acústica que los cromóforos endógenos y, por tanto, mejorar el contraste en las imágenes fotoacústicas obtenidas.

La versatilidad de los cromóforos exógenos en la imagen fotoacústica permite una amplia gama de aplicaciones. Estos agentes de contraste específicos proporcionan información detallada sobre tejidos y estructuras determinadas, lo que mejora la precisión del diagnóstico y la monitorización terapéutica. La investigación continua en el desarrollo de nuevos cromóforos exógenos promete expandir aún más el alcance de la imagen fotoacústica en el campo de la medicina y la biología.

Actualmente, las nanopartículas de oro son uno de los cromóforos exógenos más utilizados. Su fuerte capacidad para absorber luz en el rango de infrarrojo cercano y generar señales fotoacústicas las hace ideales para la visualización de tumores y su monitorización [4].

Por otro lado, las nanopartículas de sílice se utilizan comúnmente para la entrega dirigida de fármacos [3]. Estas partículas pueden cargarse con fármacos y dirigirse a lugares específicos, lo que permite la liberación controlada de medicamentos y el seguimiento de la respuesta terapéutica a través de la imagen fotoacústica. También pueden cargarse con agentes de contraste fluorocarbonados o tintas, que se utilizan en aplicaciones gastrointestinales y pulmonares, y ofrecen un contraste excepcional en tejidos ricos en agua. Esto los convierte

en herramientas valiosas para la detección de patologías y el seguimiento de la función pulmonar.

1.2.1. Características del diseño

Los cromóforos exógenos diseñados para imagen fotoacústica deben ser selectivos, eficientes y seguros [3], además de poseer las siguientes características específicas:

- Buena absorbancia en el rango de interés.
- Alta eficiencia de conversión de energía óptica en señales acústicas detectables.
- Estabilidad y biocompatibilidad.
- Targeting específico. Deben poder dirigirse a estructuras concretas, permitiendo la visualización selectiva de las áreas de interés.
- Buen contraste entre la estructura que se está investigando y su entorno.
- Capacidad de carga de fármacos.

Las nanopartículas metálicas utilizadas como contrastes exógenos presentan problemas de seguridad en aplicaciones médicas, debido principalmente a su acumulación a largo plazo en los tejidos, lo que empuja a buscar alternativas más seguras para los pacientes, como son los contrastes orgánicos [5-8]. Estos contrastes pueden ser diseñados con propiedades ópticas y acústicas a medida. Además, pueden llevar fármacos y liberarlos en sitios específicos, lo que es particularmente valioso para aplicaciones terapéuticas combinadas y abre nuevas posibilidades en el campo de la teranóstica, donde la terapia y el diagnóstico se combinan en una sola plataforma [9]. Por tanto, la investigación en agentes de contraste de marco orgánico permitirá una mejor adaptación de los contrastes a las necesidades específicas de la imagen fotoacústica.

2. Nanopartículas de redes orgánicas covalentes (nCOFs)

Las nCOFs son materiales nanoestructurados que han suscitado un gran interés en el campo biomédico [10-16]. Se caracterizan por su estructura ordenada y altamente porosa, que les otorga propiedades únicas y ventajosas para aplicaciones de fotoacústica médica, como las indicadas a continuación:

- Biocompatibilidad y no toxicidad.
- Estabilidad química y durabilidad, esencial para su uso en aplicaciones médicas a largo plazo.
- Alta superficie específica por su estructura porosa, permitiendo la carga de agentes de contraste o fármacos.

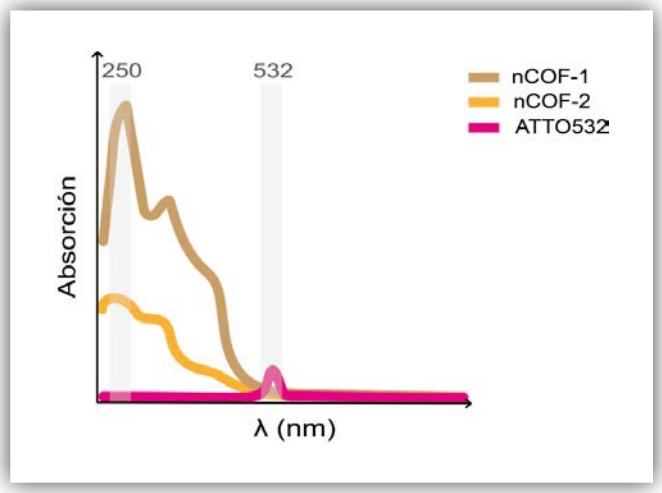


Figura 2. Espectro de absorción de las nCOFs empleadas (nCOF-1 y nCOF-2) y el cromóforo ATTO532.

Afinidad de absorción óptica y generación fotoacústica. Se pueden diseñar para tener una alta afinidad de absorción de luz en el rango de interés.

- Control de propiedades ópticas y acústicas. Su estructura y composición puede ajustarse con precisión, facilitando su adaptación a aplicaciones específicas de imagen fotoacústica.
- Versatilidad en la funcionalización. Es posible adaptarlas para dirigirse selectivamente a biomarcadores o estructuras específicas en el organismo, mejorando la especificidad de la imagen.

3. Motivación

Los agentes de contraste que se utilizan actualmente, como las nanopartículas de oro (NPAu), tienen limitaciones de concentración suministrable debido al estrés oxidativo que generan en el organismo al que se le suministran. Estas nanopartículas se acumulan en las células y no se pueden eliminar a corto ni largo plazo. Por ello, en este estudio se han probado algunas estructuras orgánicas (nCOFs) como agentes de contraste para imagen fotoacústica.

Se han empleado las nanopartículas con su estructura básica, sin sintonizar a una longitud de onda láser artificialmente ni cargar con agentes de contraste, fármacos o agentes con afinidad a estructuras determinadas. El objetivo es determinar la señal base que emitirían estas nanoestructuras, totalmente inocuas para el organismo, y, a partir de estos resultados, evaluar posibles vías futuras, ya sea modificando su estructura para sintonizarlas a determinadas longitudes de onda o cargándolas con diferentes agentes de contraste o fármacos dirigidos.

4. Métodos

Para evaluar si la amplitud de la respuesta PA de las nanopartículas orgánicas propuestas es similar a las de referencia NPAu, se ha seleccionado una excitación láser a 532 nm, correspondiente al verde en la región del espectro visible, donde estas tienen su máximo de absorción óptica. Para ello se han empleado NPAu comerciales a 0.1 mg/ml. Por otro lado, se han sintetizado dos tipos de nCOFs con estructura hexagonal y diferente diámetro de poro (Dp): nCOF-1 (Dp=3.1 nm) y nCOF-2 (Dp=1.8 nm) y se han preparado en disoluciones de 0,1 mg/ml. Finalmente, se han empleado nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) y se han marcado con el cromóforo ATTO532, que tiene su pico de absorción óptica a la longitud láser seleccionada (532 nm). Todas las disoluciones empleadas han sido disueltas en la disolución tampón PBS (Phosphate Buffered Saline), por tanto, se ha medido también la señal PA del PBS como nivel de base.

En la Fig. 2 se representan los espectros de absorción de las dos nCOFs empleadas (nCOF-1 y nCOF-2) y del cromóforo ATTO532. Como se puede ver en la figura, el máximo de las nCOFs se sitúa alrededor de 250 nm en la región del ultravioleta, sin embargo, se ha mantenido su estructura original para evaluar su respuesta a la longitud de onda láser de 532 nm comúnmente utilizada en imagen fotoacústica. Además, esto permite comparar los resultados obtenidos con el nivel de contraste de las NPAu comerciales.

Para la excitación de las muestras se empleado un láser de tipo 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 de Verasonics acoplado a la sonda ultrasónica lineal L11-5v de 128 elementos. La Fig. 3 representa esquemáticamente el montaje experimental, donde la disolución con nanopartículas se coloca en una cánula de plástico paralela a la sonda y el láser incide perpendicularmente sobre la cánula.

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. La Fig. 4 muestra el resultado de la superposición de imagen ultrasónica, donde se pueden observar las paredes de la cánula, y la imagen fotoacústica, donde se observa la señal proveniente de la excitación láser de las nanopartículas contenidas en su interior.

Para cuantificar la respuesta fotoacústica de cada muestra, se integran las señales de cada píxel en la imagen conformada para obtener un único nivel de respuesta.

5. Resultados y discusión

La Fig. 5 representa la respuesta fotoacústica obtenida para todas las muestras evaluadas: el control (PBS),

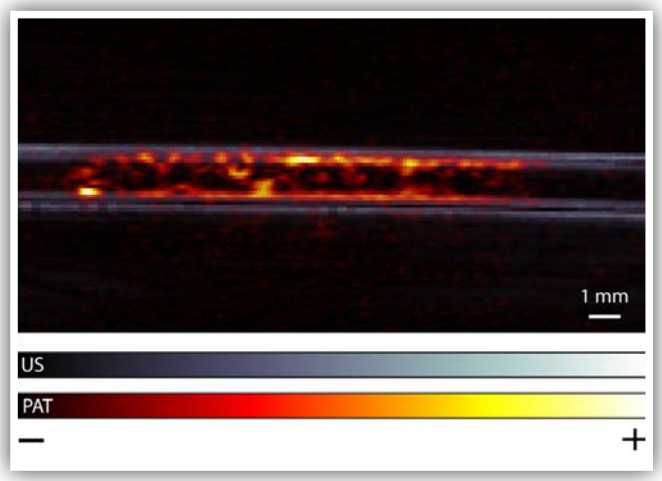


Figura 4. Imagen dual del sistema de imagen ultrasónica y fotoacústica.

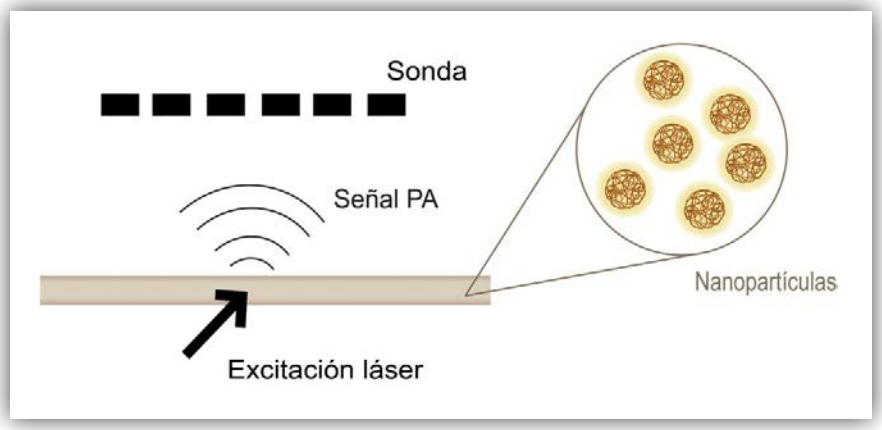


Figura 3. Esquema del montaje experimental empleado.

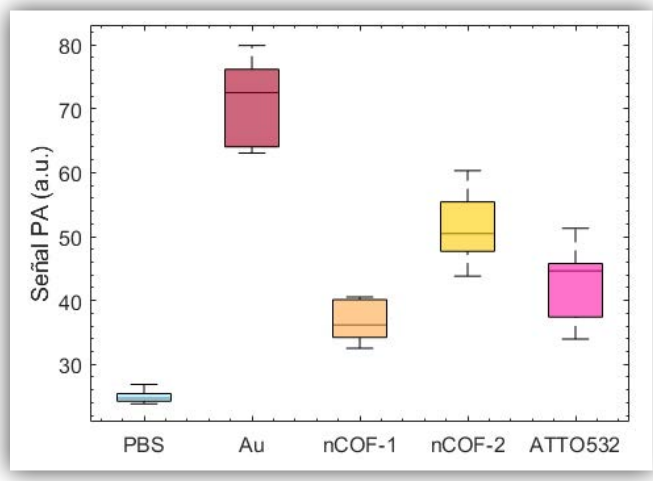


Figura 5. Representación en diagrama de caja y bigotes de la prueba comparativa de nivel de señal PA de nanopartículas de oro (referencia comercial) frente a nCOFs (nCOF-1 y nCOF-2) y MSNs marcadas con el cromóforo ATTO532. La señal PA de control del PBS, medio de disolución de las muestras, determina el nivel PA de fondo. Todas las muestras tienen una concentración de 0.1 mg/ml.

las nanopartículas de oro (Au), las nCOFs nCOF-1 y nCOF-2 y las MSN marcadas con el cromóforo ATTO532. Para cada muestra se realizaron seis réplicas donde el diagrama de caja y bigotes indica: la mediana de los datos, representada por la línea horizontal, y los percentiles 25 y 75, representados por los extremos inferior y superior de la caja; a su vez, los bigotes indican los datos más extremos que no se consideran valores atípicos.

En el gráfico se observa que las muestras orgánicas generan respuestas PA inferiores al estándar comercial (Au) aunque comparables. Así pues, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que tanto las nanopartículas de red orgánica nCOF-1 y nCOF-2 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. Al respecto, las diferencias en el diámetro de poro entre las dos estructuras hexagonales no manifiestan influencia alguna sobre la capacidad de contraste de los materiales. 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 así su nivel de respuesta sin perjudicar al futuro paciente.

6. Conclusiones

La investigación en contrastes de origen orgánico para la imagen fotoacústica es esencial para abordar los problemas de nanotoxicidad y seguridad asociados con los contrastes actuales. Estos contrastes ofrecen la promesa de ser más seguros, versátiles y específicos, lo que puede conllevar avances significativos en aplicaciones médicas y de investigación biomédica. La continua exploración y desarrollo de contrastes orgánicos es fundamental para maximizar el potencial de la imagen fotoacústica en el campo de la salud.

Los resultados experimentales obtenidos en este estudio muestran que las nCOFS (nCOF-1 y nCOF-2) presentan un nivel de respuesta similar al máximo generado por las nanopartículas de oro, a la longitud de onda de 532 nm que se utiliza comúnmente en imagen fotoacústica. Además, dado que los nCOFS son inocuas para el organismo, este estudio podría ampliarse a concentraciones mayores, de forma que se obtendrán previsiblemente mejores niveles de contraste en la imagen final. Además, estas estructuras orgánicas se pueden modificar, cambiando su empaquetamiento o añadiéndoles cromóforos u otras estructuras orgánicas, para poder sintonizar su máximo de absorción a otras longitudes de onda, como podría ser a 532 nm, aumentando todavía más su respuesta fotoacústica.

En definitiva, estos resultados confirman a los compuestos orgánicos nCOF-1 y nCOF-2 como excelentes agentes de contraste biocompatibles para imagen fotoacústica, permitiendo obtener imágenes moleculares de alta calidad, sin producir efectos adversos en el organismo.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo financiero de la Agencia Estatal de Investigación (PID2019-111436RBC22 y PID2022-142719OB-C21) y la Generalitat Valenciana a través de los programas Equipamiento e Infraestructuras FEDER 2021-22 IDIFEDER/2021/004, y Programa de Garantía Juvenil I+D EDGJID/2021/189. N. Jiménez agradece el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU) a través de la beca "Ramón y Cajal" RYC2021-034920-I. A. Cebrecos agradece el apoyo financiero de la Universitat Politècnica de València a través de los programas PAID-10-19 PAID-PD-22. Irene Pi agradece el apoyo financiero de la Generalitat Valenciana a través del programa CIACIF/2021/403.

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

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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-laser-induced phototherapy, ACS Applied Materials & Interfaces 13 (2021) 17243–17254.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.