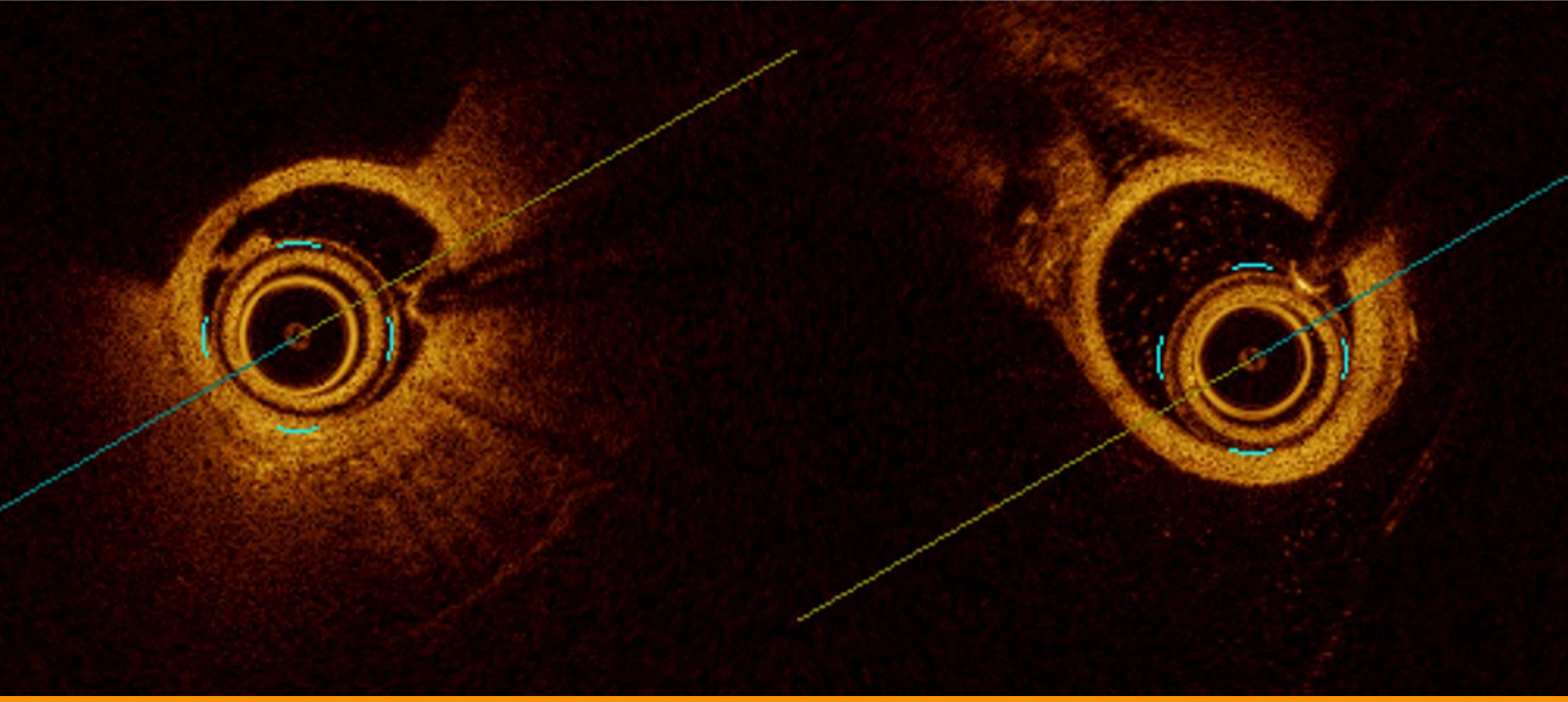


OBTENCIÓN DE IMAGEN MOLECULAR INTRACORONARIA MEDIANTE EL USO DE NANOCOMPUESTOS FUNCIONALIZADOS COMBINADOS CON TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA

FERNANDO RIVERO CRESPO

TESIS DOCTORAL. MADRID. 2022

Directores:
DR. FERNANDO ALFONSO MANTEROLA
DR. RÍO AGUILAR TORRES

UAM
Universidad Autónoma de Madrid

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA

Departamento de Medicina
Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

Obtención de imagen molecular intracoronaria mediante el uso de nanocompuestos funcionalizados combinados con tomografía de coherencia óptica

DOCTORANDO:

Fernando Rivero Crespo

DIRECTORES:

Dr. Río Aguilar Torres
Departamento de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Fernando Alfonso
Departamento de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS **6**

RESUMEN **7**

GLOSARIO **9**

1 CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN **12**

1.1 CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: DE LA ATEROSCLEROSIS PRECLÍNICA AL SCA 13
1.1.1 Xantoma y engrosamiento intimal 15
1.1.2 Progresión de placa secundaria a la inflamación 15
1.1.3 Fibroateroma 16
1.1.4 Fibroateroma de cápsula fina 17
1.1.5 Lesiones ateroscleróticas asociadas a trombo intraluminal 17
1.1.6 Rotura de placa aterosclerótica 17
1.1.7 Erosión de placa aterosclerótica 18
1.1.8 Nódulo calcificado 18
1.1.9 Roturas cicatrizadas 19

1.2 INESTABILIZACIÓN DE PLACA Y ATEROTROMBOSIS: EL CONCEPTO DE PLACA VULNERABLE 20
1.2.1 Factores ligados a la aterotrombosis coronaria 20
1.2.2 Factores anatómicos: de las autopsias a los grandes registros prospectivos con imagen intravascular 21
1.2.3 Inmunidad e inflamación 23
1.2.4 La tomografía de coherencia óptica: una ventana a la histología coronaria 25
1.2.5 La imagen intravascular actual de la placa vulnerable 27
1.2.6 La brecha entre ciencia básica y clínica: necesidad de fenotipar la enfermedad coronaria 32
1.2.7 Dianas posibles para la detección de placas ateroscleróticas de alto riesgo 33
1.2.8 Nanopartículas para la imagen cardiovascular 37

1.3 MOTIVACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO 42
1.3.1 Plan de trabajo 43

2 CAPÍTULO 2. EN BUSCA DE LA SEÑAL POR OCT **49**

2.1 CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE EMISIÓN LÁSER DEL EQUIPO DE OCT CLÍNICO 50
2.1.1 Motivación y objetivos 50
2.1.2 Material y métodos 50
2.1.3 Resultados y conclusiones 50

2.2 SELECCIÓN DE NANOCOMPUESTOS PARA LA OBTENCIÓN DE UNA SEÑAL LUMÍNICA ÓPTIMA CON OCT 51
2.2.1 Motivación y objetivos 51
2.2.2 Material y Métodos 52
2.2.3 Resultados 53
2.2.4 Conclusiones y discusión 57

2.3 APLICACIÓN POTENCIAL DE LOS SISTEMAS DE OCT PARA LA DETECCIÓN INTRAVASCULAR DE GNP INDIVIDUALES TANTO

EN CONDICIONES EN CONDICIONES ESTÁTICAS Y DINÁMICAS 59
2.3.1 Motivación y objetivos 59
2.3.2 Material y Métodos 59
2.3.3 Resultados 62
2.3.4 Conclusiones y discusión de los resultados 68

2.4 EXPLORACIÓN DE LA POSIBILIDAD DE OBTENCIÓN DE CONTRASTE MULTIMODAL (OCT Y FLUORESCENCIA) MEDIANTE NANOPARTÍCULAS: LOS QUANTUM DOTS 68
2.4.1 Motivación y objetivos 68
2.4.2 Material y Métodos 70
2.4.3 Resultados 73
2.4.4 Conclusión y discusión de los resultados 79

2.5 EN BUSCA DEL CONTRASTE ÓPTICO NEGATIVO MEDIANTE NANOPARTÍCULAS ABSORBENTES Y NO REFLECTANTES ATRÁS EXCITACIÓN EN ESPECTRO DE OCT 80
2.5.1 Motivación y objetivos 80
2.5.2 Material y Métodos 80
2.5.3 Resultados 85
2.5.4 Conclusión y discusión de los resultados 93

2.6 CONCLUSIONES 96

3 CAPÍTULO 3. SÍNTESIS Y DEMOSTRACIÓN DE EFICIENCIA DIAGNÓSTICA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS **98**

3.1 DETECCIÓN CELULAR CON OCT TRAS MARCAJE INESPECÍFICO MEDIANTE NAOPARTÍCULAS INTERNALIZADAS 99
3.1.1 Motivación y objetivos 99
3.1.2 Material y métodos 99
3.1.3 Resultados 101
3.1.4 Conclusiones y discusión 105

3.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ESTÁTICO MEDIANTE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS 106
3.2.1 Antecedentes y motivación 106
3.2.2 Material y métodos 107
3.2.3 Resultados 112
3.2.4 Conclusiones y discusión 116

4 CAPÍTULO 4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR IN VITRO MEDIANTE OCT Y USO DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS EN ENDOTELIO ARTERIAL HUMANO BAJO CONDICIONES DE FLUJO **118**

4.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN 119

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS 121
4.2.1 Funcionalización de GNS mediante unión al péptido anti ICAM-1 121
4.2.2 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las GNS funcionalizadas 122
4.2.3 Cultivo celular y activación inflamatoria con TNF-α 122
4.2.4 Citometría de flujo para comprobación de hiperexpresión ICAM1 tras activación de HMEC TNF-α 123
4.2.5 Experimentos de adhesión de anti-ICAM1- GNS 123

4.3 RESULTADOS 125
4.3.1 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las GNS funcionalizadas 125
4.3.2 Citometría de flujo para la demostración de la hiperexpresión de ICAM1 tras activación de HMEC con TNF-α 127
4.3.3 Demostración de la adhesión específica de las GNSs@aICAM la superficie de las HMEC mediante microscopía de campo oscuro en condiciones estáticas 128
4.3.4 Demostración de la adhesión específica de las GNSs@aICAM la superficie de las HMEC mediante microscopía de campo oscuro en condiciones dinámicas 130
4.3.5 Demostración de que la adhesión específica de las GNSs@aICAM en la superficie de las HMEC produce un aumento en la señal de OCT 134
4.4 CONCLUSIONES 135

5 CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO 137
5.1 CONCLUSIONES 138
5.2 LIMITACIONES 139
5.3 PERSPECTIVAS DE FUTURO 139

6 REFERENCIAS 144

"Ring the bells that still can ring
Forget your perfect offering
There is a crack, a crack in everything
That's how the light gets in"

Leonard Cohen
Anthem-The Future-

AGRADECIMIENTOS

Veinte años atrás, cuando era residente de segundo año de cardiología, conocí al Dr. Río Aguilar. En aquellos tiempos se comenzaba a conocer la microcirculación coronaria, y se nos ocurrió modelizarla con un cartucho de hemodiálisis conectado a una bomba de perfusión que metíamos en una bañera para bebés. Recuerdo los paseos a la ferretería en busca de abrazaderas y tuercas. Pasamos tardes y tardes observando la llegada de las burbujas en las fibras del cartucho de diálisis, registrando datos y dibujando curvas. Eso despertó en mí el gusanillo de la investigación. Río, siempre te estaré agradecido por el entusiasmo que transmites, y por tu paciencia y dotes docentes. Qué suerte que este proyecto nos haya reunido veinte años después y nos haya regalado nuevos retos para compartir desesperación y disfrute al mismo tiempo.

Esta tesis y, probablemente, todos mis trabajos de investigación no habrían sido posibles sin el soporte y la guía del Dr. Fernando Alfonso. Fernando representa una vida por y para la investigación, en una búsqueda constante cargada de ilusión y perseverancia que nos anima a seguir luchando a pesar de las dificultades.

Pero si hay algo que me satisface especialmente de este trabajo de tesis, es haber conocido al grupo de Nanomateriales para Bioimagen del departamento de Física de Materiales de la Universidad Autónoma de Madrid. Mi profundo agradecimiento a la humildad, generosidad, dedicación y pasión por la ciencia de su líder, el Dr. Daniel Jaque, así como a la experiencia, ayuda, talento e insustituibles razonamientos del Dr. José García Solé. Por supuesto, gracias a la ayuda y dedicación de los Dres. Francisco Sanz, Emma Martín, Dirk Ortgies y Hu Jie y al trabajo de Tamara Muñoz. Estos años compartidos con ellos me han permitido adentrarme en el apasionante mundo de la investigación básica, antes desconocido para mí y muy diferente de la investigación clínica a la que estaba acostumbrado. Gracias a todos ellos he convivido y comprendido las particularidades y dificultades de la ciencia fundamental y lo valioso de la colaboración entre básicos y clínicos.

Gracias a Laura, Olivia y Patricia por el tiempo robado que nunca me reclaman, y gracias a Fernando y Charo, mis padres, por haberme inculcado el valor del esfuerzo. Dedico esta tesis a Fernando, mi padre, un ejemplo de sabiduría y humildad del que aprendí que el trabajo puede ser algo muy divertido.

Todos los experimentos de esta tesis han sido financiados a través de dos Proyectos de Investigación en Salud de las convocatorias de la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (PI16/00812 y PI19/00565).

RESUMEN

Antecedentes y motivación

La enfermedad aterotrombótica coronaria es responsable de una elevada morbimortalidad en los países desarrollados. Son necesarias nuevas técnicas de diagnóstico molecular *in vivo* para mejorar el conocimiento y la orientación terapéutica personalizada de la enfermedad coronaria. La tomografía de coherencia óptica (OCT) es la técnica diagnóstica de mayor resolución espacial para el diagnóstico de la aterosclerosis coronaria. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de marcadores moleculares mediante nanopartículas funcionalizadas contra diferentes dianas, que puedan ser reconocidas mediante tomografía de coherencia óptica.

Material y métodos

En primer lugar, se han caracterizado las propiedades fisicoquímicas de diferentes nanopartículas, para la selección de potenciales agentes de contraste intravascular. Posteriormente se han seleccionado aquellos con mejores propiedades y se ha investigado su capacidad para ser reconocidos mediante OCT, así como aquellas que podrían utilizarse para imagen dual en combinación con la fluorescencia. Se ha estudiado la compatibilidad biológica y citotoxicidad de las nanopartículas seleccionadas. Finalmente, se ha probado la capacidad de funcionalización de las nanopartículas mediante la unión de anticuerpos para la adhesión selectiva a moléculas diana en modelos *in vitro* y *ex vivo*.

Resultados

Dado que la señal de la tomografía de coherencia óptica se basa en la radiación dispersa de un láser que emite a 1320 nm, se han investigado diversos tipos de nanopartículas de oro (nano-bastoncillos, nano-estrellas y nano-esferas dobles (GNSs) mediante diversas técnicas, incluyendo microscopía electrónica, microscopía de campo oscuro y espectroscopia fotoacústica. Hemos estudiado el nivel de contraste en la OCT dado por diversas nanopartículas, tanto en modelos de imágenes estáticas como en condiciones dinámicas. Posteriormente, se ha estudiado el contraste producido por los GNSs, tanto en células como en tejidos, dadas las excelentes propiedades de estas nanopartículas. Para ello, se han incubado en células HeLa y Jurkat, comprobando la señal en OCT y por microscopía de campo oscuro. Además, hemos valorado la posibilidad de obtener imagen dual mediante fluorescencia con nanopartículas de cristales semiconductores (puntos cuánticos) al ser excitados por el láser del sistema de la OCT. También se ha estudiado la posibilidad de contraste oscuro mediante la síntesis de nanopartículas de sulfato de cobre. Una vez seleccionadas las nanopartículas potencialmente útiles se ha estudiado su seguridad biológica. Tras la elección de las nanopartículas con mejor capacidad de contraste, se procedió a valorar su capacidad de emitir señal para la OCT tanto en células aisladas como en tejidos biológicos. Finalmente, se comprobó, en modelo in vitro con células

endoteliales humanas activadas mediante estímulo TNF, la capacidad de adhesión específica de las nanopartículas funcionalizadas con péptido anti-ICAM1 y su señal en OCT.

Conclusiones

Las nanoesferas de oro se presentan como las mejores agentes de contraste para la OCT coronaria debido a sus propiedades físicas y mayor retrodispersión. El excelente contraste proporcionado por las GNSs permite detectar nanopartículas individuales tanto en condiciones estáticas como dinámicas. Se ha demostrado que los puntos cuánticos emisores de infrarrojos son capaces de proporcionar un contraste simultáneo para OCT e imágenes de fluorescencia infrarroja al excitarse con el láser de la OCT, por lo que se presentan como potenciales marcadores para la obtención de imagen bimodal. Se ha demostrado la posibilidad de obtener señal de intensidad de luz negativa o contraste oscuro mediante la síntesis de NP de sulfato de cobre que han sido observadas mediante OCT tanto en disoluciones aisladas como en tejidos biológicos. Se ha probado la ausencia de citotoxidad de las nanopartículas estudiadas. Las GNSs pueden actuar como agentes de contraste para imagen celular tras su fagocitosis inespecífica. Los resultados *ex vivo* han objetivado la capacidad de realizar funcionalizaciones para permitir la adhesión selectiva de GNSs en el tejido miocárdico. Tras una funcionalización anti-ICAM1, los GNS se unen específicamente a las moléculas ICAM-1 sobreexpresadas por las células HMEC activadas por el TNF-α. Se ha demostrado que esta unión permite detectar la presencia de endotelio arterial activado mediante el subsiguiente aumento en la intensidad de señal de OCT.

GLOSARIO

- EAC. Enfermedad Arterial Coronaria
- ALM. Área Luminal Mínima
- ARNm. ARN mensajero
- CAM. Moléculas de Adhesión
- CCR. Receptor de Citoquinas
- CCD. Dispositivo de Carga Acoplada
- CMOS. Semiconductor Complementario de Óxido Metálico
- DFM. Microscopía de Campo Oscuro
- DI. Agua Desionizada
- DLS. Dispersión Dinámica de Luz
- DMSO. Dimetilsulfóxido
- DO. Densidad Óptica
- EDAC. 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimida
- EDC. N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida
- ESS. Shear Stress Endotelial (estrés de cizallamiento)
- FDA. US Food and Drug Administration
- FDG. Fluorodeoxiglucosa
- FLIM. Imágenes de Vida de Fluorescencia
- FWHM. Anchura a Media Altura
- F-OCT. Tomografía de Coherencia Óptica Funcional
- FTIR. Espectroscopía de Infrarrojos Transformada de Fourier
- GNCs. Nanocajas de Oro
- GNP. Nanopartículas de Oro
- GNPrs. Nanoprismas de Oro
- GNRs. Nanorods de Oro
- GNS. Nanopartículas esféricas de oro
- GNSts. Nanoestrellas de Oro
- GP. Glicoproteína
- HMEC. Células Mamarias Epiteliales Humanas
- HR. Hazard Ratio
- HUVEC. Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana
- IAMCEST. Infarto Agudo de Miocardio Con Elevación del Segmento ST
- IAMEST. Infarto Agudo de Miocardio Sin Elevación del Segmento ST
- ICAM-I. Molécula 1 de Adhesión Intercelular
- ICG. Verde de Indocianina
- IFN. Interferón
- IL. Interleuquina
- IONP. Nanopartículas de Óxido de Hierro
- IR. Infrarrojo
- IR-DFM. Microscopía Infrarroja de Campo Oscuro
- IR-OAS. Espectroscopia Infrarroja Optoacústica

- IR-QDs. Puntos Cuánticos emisores de Infrarrojos
- IVPA. Fotoacústica Intravascular
- IVUS. Ecografía Intravascular
- LDL. Lipoproteínas de Baja Densidad
- LFA-1. Antígeno-1 asociado a la Función Leucocitaria
- LPR. Placas Ricas en Lípidos
- LSPR. Resonancia Plasmónica Superficial Localizada
- MACE. Eventos Adversos Cardiovasculares Mayores
- maxLCBI. Índice Máximo de Carga Lipídica
- MCP-1. Proteína Quimio-atrayente de Monocitos 1
- MDA. Malondialdehído-lisina
- MEC. Matriz Extracelular
- MMP. Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular
- MPO. Mieloperoxidasa
- NHS. N-Hidroxisuccinimida
- NIRAF. Autofluorescencia en el Infrarrojo Cercano
- NIRS. Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano
- NIR. Infrarrojo Cercano
- NP. Nanopartícula
- OCT. Tomografía de Coherencia Óptica
- OCT-FD. Tomografía de Coherencia Óptica Dominio de Fourier
- OCT-PL. OCT de imagen multimodal combinada con Fotoluminiscencia
- oNPs. Nanopartículas Orgánicas Radicales Altamente Luminiscentes
- PAI. Activador del Plasminógeno
- PbS. Sulfuro de plomo
- PBS. Buffer Fosfato Salino
- PCR. Proteína C Reactiva
- PEG. Polietilenglicol
- PET. Tomografía por Emisión de Positrones
- PL. Fotoluminiscencia
- PS. Fosfatidilserina
- QDs. Puntos Cuánticos
- RMN. Resonancia Magnética Nuclear
- ROI. Región de Interés
- ROS. Especies Reactivas de Oxígeno
- RPE. Resonancia Paramagnética Electrónica
- SCA. Síndrome Coronario Agudo
- SCACEST. Síndrome Coronario Agudo Con Elevación del Segmento ST
- SCASEST. Síndrome Coronario Agudo Sin Elevación del Segmento ST
- SCC. Síndrome Coronario Crónico
- SEC. Cromatografía de Exclusión Molecular
- SPECT. Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único
- SPR. Resonancia Plasmónica de Superficie
- TCFA. Fibroateroma de Cápsula Fina

- TEM. Microscopía Electrónica de Transmisión
- TLR. Recepto tipo Toll (Toll-like receptor)
- TNF. Factor de Necrosis Tumoral
- U arb. Unidades Arbitrarias
- VAP. Proteína de Adhesión Vascular

1 CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

1.1 CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: DE LA ATEROSCLEROSIS PRECLÍNICA AL SCA

La enfermedad arterial coronaria (EAC) continúa siendo en la actualidad la principal causa de morbi-mortalidad en los países desarrollados [(1)(2)]. Aunque las tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica en todo el mundo han disminuido en las últimas cuatro décadas, la cardiopatía isquémica sigue siendo responsable de más de un tercio de todas las muertes de las personas mayores de 35 años [(1)(2)]. Se estima que casi la mitad de los hombres de mediana edad y un tercio de las mujeres de mediana edad en los Estados Unidos desarrollarán alguna manifestación de cardiopatía isquémica a o largo de su vida [(3)]. El riesgo de EAC a lo largo de la vida se aproxima al 50% en personas de 30 años sin EC conocida [(4)]. A pesar de las mejoras en la mortalidad asociada al evento inicial de la EAC, la prevalencia de la EAC está aumentando rápidamente también en los países con recursos limitados [(5)].

Actualmente se considera a la EAC como un proceso patológico crónico caracterizado por la aparición de placas ateroscleróticas en las arterias coronarias epicárdicas, tengan repercusión hemodinámica o no. Este proceso puede modificarse mediante cambios en el estilo de vida, terapias farmacológicas destinadas a lograr la estabilización de la enfermedad y procedimientos de revascularización. La EAC se presenta por largos intervalos de tiempo estables, pero también puede volverse inestable en cualquier momento debido a la aparición a un evento aterotrombótico agudo causado por la rotura o erosión de una placa. Sin embargo, la enfermedad es crónica, casi siempre progresiva y, por lo tanto, potencialmente grave, incluso tras intervalos asintomáticos. La naturaleza dinámica del proceso de la EAC da lugar a diversas presentaciones clínicas, que pueden clasificarse como síndromes coronarios agudos (SCA) o síndromes coronarios crónicos (SCC) (Figura 1). El momento aparición de un SCA no puede predecirse en la actualidad. La aparición del fenómeno aterotrombótico coronario supone un auténtico drama en términos de morbimortalidad. Se considera que la mayor mortalidad de la EC se produce en el momento agudo extrahospitalario en los pacientes con Síndrome Coronario Agudo con Elevación de Segmento ST (SCACEST), produciéndose una parada cardiaca extrahospitalaria en un 5 a 10% de los casos [(6)]. Gracias a la atención extrahospitalaria y las revascularizaciones precoces se ha conseguido rebajar en las últimas dos décadas la mortalidad aguda de los SCACEST, pero aún sigue siendo un grave problema de salud pública con una mortalidad hospitalaria y a 30 días de un 2.5 al 10% [(6)]. Los pacientes con presentación clínica como Síndrome Coronario Agudo sin Elevación del Segmento ST (SCASEST), suponen un espectro clínico más variable y, en consecuencia, presentan una mortalidad a 30 días del 3 al 9.5% [(7)]. Además de la mortalidad, la presencia de SCA conlleva el riesgo de desarrollo de eventos graves en el momento agudo como son el ictus, el SCA recurrente, la insuficiencia cardiaca y las hemorragias graves. En el registro GRACE de pacientes con SCASEST, las tasas de insuficiencia cardíaca o shock intrahospitalario, reinfarto, hemorragia grave o ictus fueron del 10, 2, 4, 1, 8 y 0,5%, respectivamente [(6)]. En el ensayo

aleatorizado HORIZONS en pacientes con SCACEST, la tasa de ictus fue de alrededor del 1% y la tasa de reinfarto de alrededor del 2% a los 30 días [(7)]. La mortalidad a largo plazo es similar tras un SCA, con los tratamientos actuales se sitúa en torno al 5-9% al año y riesgo de nuevo SCA de un 6-7% a los tres años [(8)].

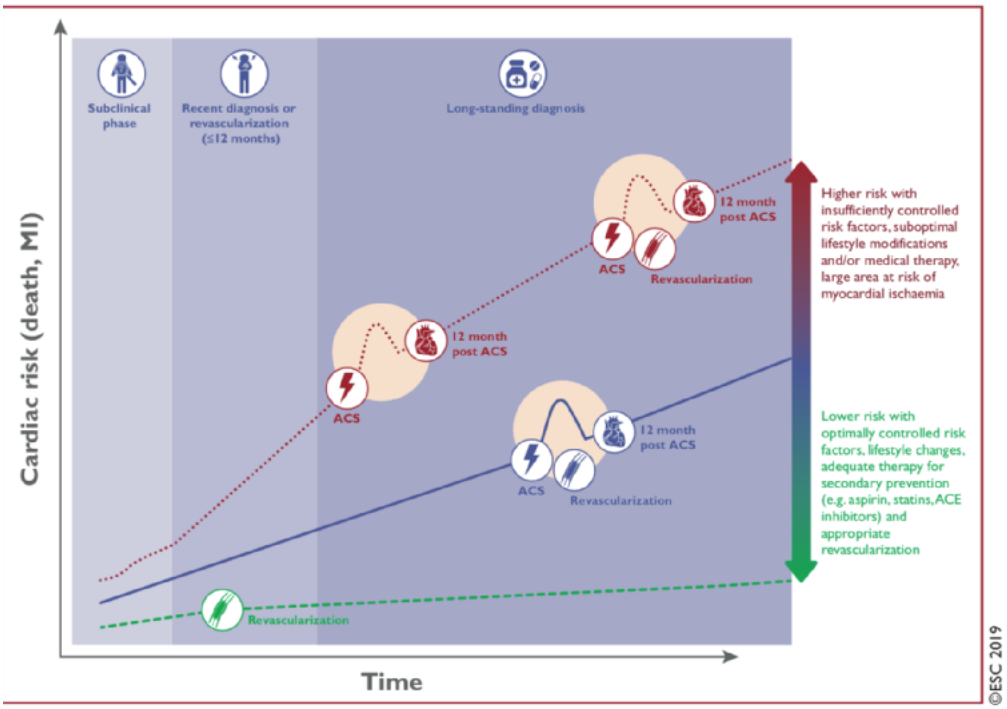


Figura 1. *Evolución temporal de la enfermedad coronaria* [(2)]

Desde la primera descripción de que una ruptura de la placa aterosclerótica coronaria era causante de la trombosis intracoronaria responsable del infarto agudo de miocardio, en 1844 [(9)], se ha llevado a cabo una intensa búsqueda por parte de la comunidad científica sobre las causas de esta aterotrombosis aguda [(10)]. Este descubrimiento ha tenido un enorme impacto en la búsqueda de las terapias destinadas a su prevención y tratamiento, habiéndose reflejado en la disminución de la incidencia y de la mortalidad de la EAC ligada al uso de estos tratamientos [(11)]. No obstante, hoy en día, dos tercios de los eventos coronarios agudos, como el infarto de miocardio, angina inestable y muerte súbita son consecuencia de la rotura de placas ateroscleróticas en las arterias coronarias.

La EAC es un proceso inflamatorio crónico dinámico que refleja cambios anatómicos relacionados con la presentación clínica. Los conocimientos actuales derivan de estudios de autopsias y de imagen coronaria con las consiguientes limitaciones que esto conlleva en su traslado a la clínica.

Actualmente se definen los siguientes subtipos anatomopatológicos que se consideran progresivos (Figura 2):

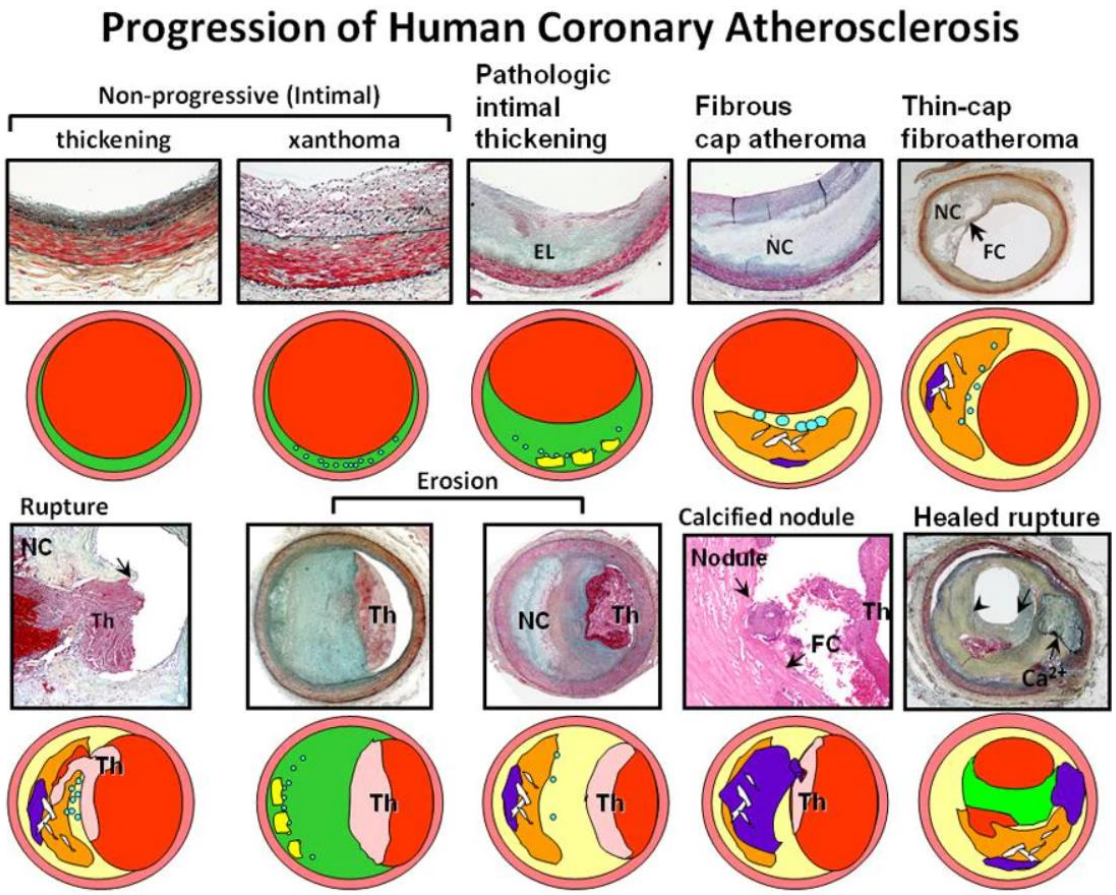


Figura 2. *Histopatología de los diferentes estadios histopatológicos de la progresión de la enfermedad coronaria humana* [(12)]

1.1.1 Xantoma y engrosamiento intimal

El xantoma intimal se caracteriza por la presencia de macrófagos cargados de lípidos que se localizan dentro de la capa íntima, generalmente en territorios cercanos a las bifurcaciones arteriales. Se ha descrito su presencia tanto en niños como en adultos hasta la tercera década de la vida. El engrosamiento intimal se debe a la presencia de células musculares lisas dentro de una matriz de proteoglicanos localizados en la capa íntima con escaso o nulo contenido celular inflamatorio. La evolución de estos hallazgos tempranos da lugar al denominado "engrosamiento patológico de la íntima" caracterizado por la aparición de depósitos lipídicos extracelulares sobre una matriz de proteoglicanos. Estos depósitos se localizan cerca de la capa media arterial y pueden dar lugar a microcalcificaciones por necrosis de las células musculares lisas [(13)].

1.1.2 Progresión de placa secundaria a la inflamación

Se cree que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la pared arterial es la responsable del inicio y la progresión de la aterosclerosis, en un complejo sistema inflamatorio en el que participan macrófagos, células endoteliales y células musculares

lisas. La presencia de lipoproteínas intimales y sus productos derivados provoca un aumento de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial. La adhesión de las células inflamatorias implica la expresión de selectinas, que facilitan la adhesión firme de los monocitos a las integrinas endoteliales y la transmigración por medio de las proteínas de unión endotelial [(14)]. Por ejemplo, se ha visto que las LDL oxidadas son capaces de inducir quimioatracción de macrófagos mediante la inducción a la secreción de MCP-1 por las células endoteliales [(15)]. Además, los macrófagos expresan varios receptores scavenger, que pueden unirse a un amplio espectro de ligandos, incluyendo lipoproteínas modificadas, lipoproteínas nativas y fosfolípidos aniónicos, muchos de los cuales facilitan la acumulación masiva de ésteres de colesterol intracelular y colesterol libre. Tanto los macrófagos como las células endoteliales expresan en su superficie receptores transmembrana *toll-like* (TLRs). Los TLRs activan el factor de transcripción proinflamatorio kappa-B, dando lugar a la producción de citoquinas que aumentan la inflamación local y la proliferación de las células musculares lisas [(16)]. Estudios in vitro han demostrado que la expresión basal de TLR-4 por parte de los macrófagos está regulada por las LDL oxidadas y que la captación de lípidos oxidados en los macrófagos está facilitada por un heterotrímero CD36/TLR4/TLR6 que inicia la señalización de TLR4. Estos datos proporcionan un posible vínculo fisiopatológico entre la acumulación de lípidos, las citocinas inflamatorias y la aterosclerosis [(16)].

1.1.3 Fibroateroma

El fibroateroma se considera la primera forma de placa aterosclerótica avanzada y se caracteriza por la presencia de una capa de tejido conectivo que envuelve un núcleo lipídico. La capa fibrosa está formada exclusivamente por células musculares lisas en una matriz de colágeno y proteoglicano, con diversos grados de infiltración de macrófagos y linfocitos. El núcleo necrótico está causado por la muerte de macrófagos cargados de lípidos, también denominados células espumosas. Las células espumosas contienen ésteres de colesterol y colesterol libre. A medida que las placas progresan, el contenido de colesterol libre de la lesión de la placa aumenta, al igual que la relación entre el colesterol libre y el esterificado. Se ha demostrado que una relación elevada entre el colesterol libre y el fosfolípido en la membrana celular es tóxica para las células y, por tanto, la citotoxicidad inducida por el colesterol libre puede contribuir a la apoptosis de las células espumosas [(17)]. Es probable que tanto la citotoxicidad celular inducida por el colesterol libre como la eliminación defectuosa de las células apoptóticas contribuyan al crecimiento del núcleo necrótico [(18)]. Por otro lado, la hemorragia intraplaca puede también contribuir al crecimiento del núcleo necrótico. La presencia del ambiente hipoxémico generado por el infiltrado inflamatorio intraplaca genera la aparición de *vasa vasorum* desde la adventicia. Estos *vasa vasorum* intraplaca son frágiles debido a la ausencia de membrana basal y escasez de uniones endoteliales. Se ha visto que parte de los cristales de colesterol derivan de la membrana de los eritrocitos, que, por otro lado, es la célula con mayor contenido de colesterol libre en su membrana [(19)]. Debido a los fenómenos inflamatorio y a las microhemorragias, el fibroateroma puede continuar su

crecimiento en volumen, dando lugar a una estenosis funcionalmente significativa cuando genera una reducción de la luz arterial (compensada por el remodelado positivo del vaso o fenómeno de Glagov) o bien producir un fenómeno aterotrombótico por ruptura de la superficie íntimo-endotelial que lo contiene.

1.1.4 Fibroateroma de cápsula fina

El fibroateroma parece ser la lesión precursora del fibroateroma de cápsula fina (TCFA, por sus siglas en inglés), aunque no se han mostrado datos definitivos in vivo que lo demuestren. Se define la presencia de TCFA en aquel fibroateroma con una anchura intimal inferior a 65 µm. Esta definición deriva del análisis morfométrico de una serie de 41 placas rotas [(20)]. El TCFA se distingue de las lesiones anteriores por la pérdida de células musculares lisas, la abundante matriz extracelular y el infiltrado inflamatorio. El núcleo necrótico que subyace a la cápsula fibrosa fina suele ser grande; suele haber hemorragia y/o calcificación y los *vasa vasorum* intraplaca son abundantes [(21)]. La presencia de TCFA se ha relacionado en series de necropsias con la presencia de rotura de placa, apareciendo el 60% de las roturas aunque pueden encontrarse hasta en un 30% de pacientes estables [(22)].

1.1.5 Lesiones ateroscleróticas asociadas a trombo intraluminal

La mayoría de los SCA se producen por una obstrucción aguda de la luz arterial secundaria a la aparición de material trombótico intraluminal. El mecanismo por el que esta aterotrombosis acontece no se conoce en la actualidad. Tres diferentes patrones histológicos han sido asociados con este fenómeno: rotura, erosión y, mucho menos frecuentemente el nódulo calcificado (Figura 2). En ocasiones pueden observarse en un mismo segmento coronario diferentes tipos anatómicos en el mismo momento. Los estudios de autopsias han demostrado que cuando se identifican trombos intraluminales en pacientes con muerte súbita cardíaca e infarto agudo de miocardio (IM), la patología subyacente es la rotura en el 55 al 75% de los casos, la erosión en el 25 al 40% de los casos y los nódulos calcificados en menos del 5% de los casos [(21)]. Los estudios in vivo realizados en pacientes que presentan un IAMCEST, utilizando imágenes intravasculares, de las placas culpables han mostrado una distribución similar de las variantes morfológicas [(23)]. En el IAMCEST, aproximadamente el 75% de los casos se debe a la rotura de la placa, mientras que el 25% restante se puede atribuirse a la presencia de erosión [(24)]. Sin embargo, cuando la presentación clínica conlleva ausencia de elevación del ST, la presencia de rotura se identifica sólo en un 47% de los pacientes [(25)(26)].

1.1.6 Rotura de placa aterosclerótica

Virchow, en 1858, definió el término "ateroma" por su equivalencia anatomopatológica con un quiste dérmico ("Grützbalg"): una masa grasa encapsulada. Siguiendo el

argumento de Virchow, la capa fibrosa que recubre la placa aterosclerótica es análoga a la cápsula que contiene un absceso cutáneo, y como tal, la placa puede romperse [27]. La rotura de placa se relaciona con el 60% de las personas fallecidas por muerte súbita [12]. Morfológicamente, una placa que se ha roto muestra un trombo intraluminal (rico en plaquetas) que recubre una capa fibrosa fina disgregada y que está infiltrada por macrófagos y linfocitos T [22]. La cápsula fibrosa está formada principalmente por colágeno de tipo I con diversos grados de macrófagos y linfocitos, mientras que el componente de células musculares lisas dentro de la cubierta está ausente o es escaso. En las lesiones que se han roto, el grosor medio de la cubierta fibrosa es de 23±19 micrómetros, y el 95% de la cubierta mide menos de 65 micrómetros [22]. Aunque se ha aceptado ampliamente que la rotura de la cápsula fibrosa se produce en su punto más débil, a menudo cerca de las regiones proximales, los estudios de autopsia que utilizan secciones cortadas en serie demuestran un número igual de roturas que se producen en la parte media de la cápsula fibrosa [20].

1.1.7 Erosión de placa aterosclerótica

La erosión se caracteriza histológicamente por la ausencia de endotelio en el lugar de la erosión, estando formada la íntima expuesta predominantemente por células musculares lisas vasculares y proteoglicanos. Curiosamente, existe escasa actividad inflamatoria en las proximidades de la zona erosionada. El mecanismo por el que la erosión acontece es totalmente desconocido, no habiéndose conseguido demostrar áreas de denudación endotelial espontánea en modelos animales ateroscleróticos [23]. Tampoco parece plausible que la simple descamación del endotelio en una arteria de alto cizallamiento conduzca a un proceso trombótico que desemboque en la oclusión de la arteria. Las erosiones son más frecuentes en las mujeres jóvenes y en los hombres de menos de 50 años edad y se asocian con el tabaquismo, especialmente en mujeres premenopáusicas. La coincidencia en el perfil clínico hace que se postule la presencia de vasoespasmo como fenómeno desencadenante de la erosión.

1.1.8 Nódulo calcificado

Una minoría de los pacientes con aterotrombosis coronaria presentan histológicamente una lesión secundaria a la presencia de nódulos protuyentes en la luz que son densos y fibro-calcificados que generan una rotura de la capa fibrosa. El nódulo calcificado genera una erosión hacia el lumen, permitiendo que el calcio entre en contacto directo con la sangre lo que induce la formación de trombos. Curiosamente, estas lesiones se encuentran predominantemente en el segmento medio de la coronaria derecha, siendo esta la región coronaria sometida a mayor estrés de torsión. En algunos pacientes, la rotura de la placa podría estar relacionada con la cristalización brusca del colesterol dentro de una placa propensa a la rotura [28]. El trombo formado sobre estos nódulos no suele ser oclusivo. Estas lesiones son difíciles de identificar in vivo dada la limitada

resolución de la angiografía, pero se han identificado en aproximadamente el 8% de los pacientes con SCA mediante OCT [(29)].

1.1.9 Roturas cicatrizadas

Las roturas cicatrizadas se caracterizan por una disrupción de la capa fibrosa que está rellena de células musculares lisas, dentro de una matriz de predominancia en proteoglicanos y colágeno tipo III inicial o colágeno tipo I, en función de la fase de cicatrización en que se encuentre [(30)(31)]. Las lesiones con roturas cicatrizadas pueden presentar multicapas de lípidos y núcleo necrótico, lo que sugiere episodios previos de trombosis [(32)]. Un estudio de 2019, en el que se utilizaron imágenes intravasculares de OCT, objetivó que los pacientes con SCA recurrente tienen un fenotipo aterosclerótico distinto en comparación con los que padecen síndromes coronarios crónicos, incluida una prevalencia mucho menor de roturas coronarias cicatrizadas. Estos resultados sugieren que, aunque el fenotipo y la carga de la enfermedad aterosclerótica son factores importantes que predisponen a la enfermedad coronaria aguda, otros factores, incluida la cicatrización de la placa, pueden conducir la historia natural de un paciente hacia la recurrencia de eventos agudos o la estabilidad clínica a largo plazo [(33)].

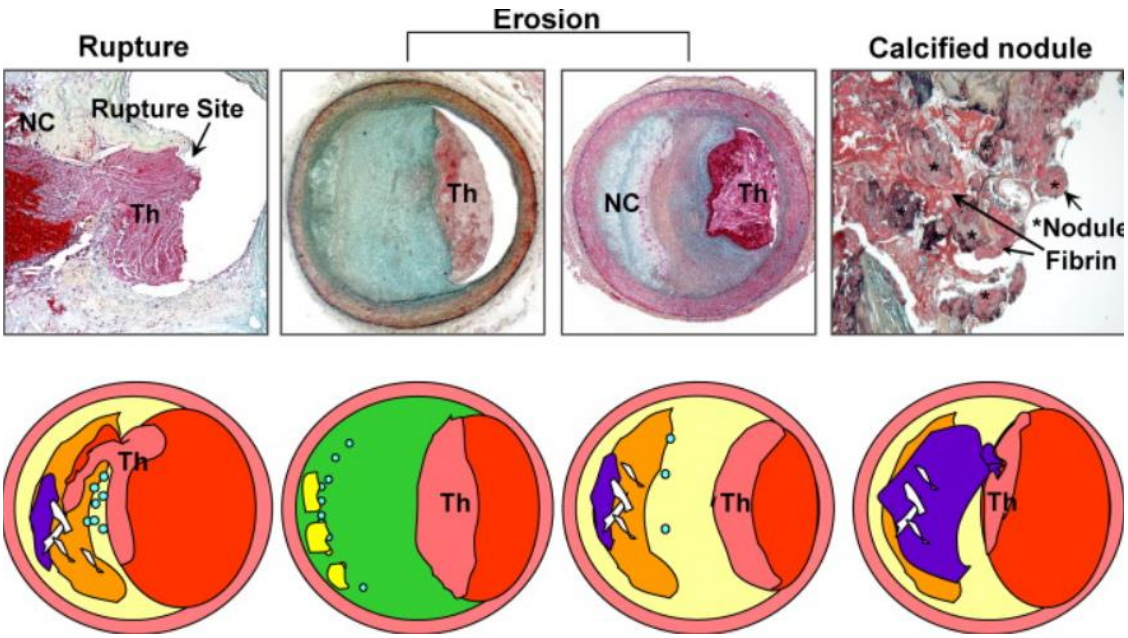


Figura 3. *Lesiones asociadas a aterotrombosis coronaria y SCA.*

1.2 INESTABILIZACIÓN DE PLACA Y ATEROTROMBOSIS: EL CONCEPTO DE PLACA VULNERABLE

A pesar de que han pasado tres décadas desde que James Müller propuso por primera vez el concepto de placa vulnerable y, 18 años desde que Naghavi et al. publicaron su documento de consenso que resumía los conceptos de los pacientes y las placas vulnerables, existen, hoy en día, grandes limitaciones a la hora de comprender la placa vulnerable [(34)(35)]. Actualmente se considera probado que la mayor parte de las placas que dan lugar a una muerte súbita son de escasa relevancia hemodinámica previa. También se conoce que la mayoría de los fenómenos de erosión y rotura de placa son clínicamente silentes. Además, en las últimas décadas, dada la dificultad para la predicción de la evolución anatómica de un fenotipo histológico concreto, se tiende a cambiar el paradigma de la placa vulnerable por el del paciente vulnerable. Hoy es conocido, gracias a las series de imagen intravascular, que es excepcional poder hacer responsable a una única placa de la etiología de un SCA, ya que pueden encontrarse varias zonas de placas inestables en un mismo paciente, tanto en la arteria responsable como en otros territorios [(14)]. Por lo tanto, actualmente las consecuencias clínicas derivadas del hallazgo de placas de riesgo por técnicas de imagen presentan un muy bajo valor predictivo positivo y, por tanto, dudosa utilidad clínica. Una mejor comprensión de los procesos patológicos que dan lugar a la inestabilización de la placa aterosclerótica coronaria es fundamental para desarrollar una medicina personalizada basada en el riesgo individual y la terapia personalizada. Hasta conseguir esta meta, tendremos que seguir conformándonos con el diagnóstico de placa vulnerable o placa activa, tras el evento clínico que queremos predecir.

Actualmente, la teoría fisiopatológica más aceptada, en relación a la inestabilización y aterotrombosis de una placa estable, es la propuesta por Libby [(36)]. Esta hipótesis propone un efecto fundamental a la inflamación mediada por citoquinas que dan lugar a la expresión de proteasas e inhiben la acción de los inhibidores proteolíticos [(36)]. La principal limitación de esta hipótesis de inflamación/proteasa es que no sabemos cuándo el proceso inflamatorio se convierte en "crítico". De hecho, se ha demostrado en animales la presencia de una actividad proteasa elevada en lesiones estables durante las fases tempranas de la enfermedad aterosclerótica. Por otro lado, la teoría de Hansson defiende una respuesta autoinmune de respuesta a las lipoproteínas oxidadas mediada por células T [(37)].

1.2.1 Factores ligados a la aterotrombosis coronaria

La mayoría de los SCA son el resultado de la pérdida de integridad de la cubierta protectora de una placa aterosclerótica. Esto se debe bien a la rotura de la placa, cuando la cubierta fibrosa que la recubre se rompe, o con la erosión, cuando se altera el revestimiento endotelial de la placa. Esta alteración de la cubierta protectora permite que la sangre entre en contacto con el contenido altamente trombogénico del núcleo

necrótico. En la zona de la rotura, el trombo luminal suele ser rico en plaquetas, lo que da lugar a un aspecto groseramente blanco (trombo blanco), mientras que, en las zonas proximal y distal, cerca de los lugares de propagación de la trombosis, tiene un aspecto rojo (trombo rojo), ya que está compuesto por capas de fibrina y glóbulos rojos. Con el tiempo, la cicatrización del trombo se caracteriza por una infiltración de células musculares lisas, acumulación de proteínas de la matriz extracelular (es decir, proteoglicanos y colágeno), neovascularización, inflamación y reendotelización de la superficie luminal. La disrupción de la cubierta fibrosa permite que los elementos celulares y no celulares de la sangre entren en contacto directo con los componentes altamente trombogénicos del núcleo necrótico siendo el responsable del inicio de la cascada de coagulación.

Aunque los mecanismos precisos que dan lugar a la rotura de placa no se conocen con precisión, es aceptado hoy en día que la disrupción de la cubierta se produce en zona de placa con TCFA que se encuentra profusamente infiltrada por linfocitos T y macrófagos, siendo el núcleo necrótico grande y asociado a una activación sistémica de la inmunidad adaptativa [(38)].

1.2.2 Factores anatómicos: de las autopsias a los grandes registros prospectivos con imagen intravascular

Figura 4. *Evolución del concepto de placa vulnerable desde su descripción hasta los registros prospectivos actuales.*

La comprensión de los factores que hacen evolucionar una placa estable a una placa de alto riesgo que pone en peligro la vida es necesaria para predecir los eventos aterotrombóticos y tratar mejor la aterosclerosis coronaria. Los estudios patológicos *postmortem* han demostrado sistemáticamente que las placas con un fenotipo de fibroateroma de capa delgada (TCFA), que incluyen una capa fibrosa fina (<65 mm), una gran infiltración lipídica y un núcleo necrótico grande, microcalcificaciones, cristales de colesterol, infiltrados inflamatorias, incluyendo macrófagos activados y la hemorragia intraplaca, aparecen en el 60% de los episodios de rotura de placas [(39)]. Por otro lado, las placas responsables de aterotrombosis por erosión presentan características histológicas diferentes a las de la rotura. La gran revolución en la valoración de las placas responsables de aterotrombosis se produjo hace 30 años, con la aparición de la ecografía

intravascular (IVUS) [(40)]. Sin embargo, estudios clínicos posteriores basados en el IVUS demostraron que esta tecnología carecía de la resolución suficiente para poder distinguir de forma fiable los componentes individuales de la placa que actualmente se consideran determinantes de la vulnerabilidad. El estudio más ambicioso inicial para determinar factores anatómicos predictores de aterotrombosis fue el estudio PROSPECT (Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree) [(41)]. En este estudio pionero en la identificación de placas potencialmente de riesgo basado en sus características anatómicas, se incluyeron 697 pacientes en los que se estudió todo el árbol coronario mediante IVUS e histología virtual con un seguimiento medio de 3.4 años. Se consiguieron definir una serie de características asociadas a un aumento de eventos con un HR de 11,05 ($p < 0,001$) (lesiones ateroscleróticas con un área luminal mínima derivada de la IVUS menor a 4 mm^2, una carga de placa del 70%, y un fenotipo histológico virtual TCFA). Sin embargo, el valor predictivo positivo (VPP) de estas características de la placa de alto riesgo para posteriores eventos cardiacos agudos fue bajo (18,2%). De igual modo, el estudio PREDICTION (Prediction of Progression of Coronary Artery Disease and Clinical Outcome Using Vascular Profiling of Shear Stress and Wall Morphology) que usó las características angiográficas y de ecografía intravascular para predecir necesidad de revascularización en función del estrés de cizallamiento estimado y las características anatómicas in vivo [(42)]. De nuevo, la combinación de predictores independientes basales tuvo sólo un 41% de VPP en la predicción de progresión de la estenosis que requiere revascularización. Después de estos estudios de inicios de la década de los años 2010, hubo un parón en los grandes estudios de progresión natural de la aterosclerosis hasta la publicación en 2019-2021 de cuatro grandes estudios: LRP, CLIMA, PROSPECT II y el COMBINE OCT-FFR.

El estudio LRP (Identification of patients and plaques vulnerable to future coronary events with near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound imaging: a prospective, cohort study) incluyó a 1563 pacientes, cuyas arterias coronarias fueron observadas mediante la utilización de IVUS unido a la tecnología de espectroscopia cercana al infrarrojo (NIRS) [(43)]. La presencia de alta cantidad de contenido lipídico en placas no obstructivas, medido mediante NIRS, se asoció discretamente con un aumento del número de eventos a dos años (HR ajustado= 3·39 [1·85-6·20; p<0·0001]). Posteriormente se publicó el estudio CLIMA utilizando OCT en la arteria descendente anterior como predictor de eventos clínicos a un año (44). En un total de 1.776 placas lipídicas, la presencia de ALM <3,5 mm2 [HR= 2,1; IC95%:1,1-4,0], FCT <75 µm (HR=I 4,7; IC95%: 2,4-9,0), extensión circunferencial del arco lipídico >180° (HR= 2,4; IC95%: 1,2-4,8) y la presencia de macrófagos definidos por la OCT (HR= 2,7; IC95%: 1,2-6,1) se asociaron con un mayor riesgo de eventos. La combinación pre-especificada de características de la placa (presencia simultánea de los cuatro criterios de la OCT en la misma placa) se observó en el 19% de los pacientes que experimentaron el criterio de valoración primario y fue un predictor independiente de eventos (HR 7,54; IC del 95%: 3,1-18,6) [(44)].

Se han publicado recientemente los resultados del estudio PROSPECT II [(45)]. En este estudio, se combinaron de nuevo la NIRS con el IVUS en 898 pacientes para predecir factores anatómicos relacionados con eventos clínicos a 4 años. las lesiones de elevado contenido lipídico fueron un factor predictivo independiente de los eventos relacionados con la lesión no culpable a nivel de paciente (*odds ratio* ajustada 2-27, IC 95% 1,25-4,13) y de los específicos de la lesión no culpable (7,83, IC 95% :4,12-14,89). Las lesiones con una gran carga de placa según la ecografía intravascular y grandes núcleos ricos en lípidos según la NIRS tuvieron una tasa de eventos cardiovasculares mayores relacionados con la lesión no culpable del 7% (IC del 95%: 4-10%) a los 4 años. Finalmente, el estudio europeo COMBINE demostró que en pacientes diabéticos con lesiones sin repercusión funcional, los pacientes TCFA-positivos representaron el 25% de esta población y se asociaron con una tasa cinco veces mayor de eventos cardiovasculares mayores a 18 meses [(46)].

Por otro lado, dos estudios que utilizan la tomografía computarizada cardíaca han observado que una puntuación elevada de calcio, incluso en pacientes sin enfermedad coronaria conocida o una la presencia de una alta carga de placa de baja atenuación en pacientes con angina estable predicen la muerte y/o el infarto de miocardio a 5 años, especialmente cuando se integraban con factores de riesgo como la diabetes mellitus [(47)(48)].

Aunque los criterios de inclusión, las tecnologías utilizadas para el análisis de morfología de placa y el seguimiento fueron muy heterogéneos, hoy en día, podemos decir que tenemos una idea de las características anatómicas que podrían dar lugar a eventos futuros una vez identificadas. Sin embargo, la asociación entre estas características y la aparición de inestabilización de placa es complicado de establecer dada la baja tasa de mortalidad e infarto de miocardio en los grupos estudiados (inferior al 2% al año). Además, estos eventos no fueron relacionados en su mayoría con aterotrombosis de la placa en riesgo, ya que la mayoría de los eventos incluidos en el objetivo primario fueron nuevas revascularizaciones en pacientes con síndromes coronarios crónicos y la mayoría de los SCA fueron por angina progresiva sin criterios de IAM. Por otro lado, como veíamos antes, los estudios de autopsia han puesto de manifiesto que la mayoría de las placas se rompen de forma asintomática y contribuyen a la progresión de la enfermedad en lugar de causar un infarto agudo de miocardio o una muerte súbita. Esto ayuda a explicar la observación de que la mayoría de los eventos en PROSPECT, LRP, CLIMA, PROSPECT II y COMBINE OCT-FFR fueron revascularizaciones o rehospitalizaciones por angina progresiva en lugar de muerte/infarto de miocardio.

1.2.3 Inmunidad e inflamación

Actualmente se acepta que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica de bajo grado. Es bien conocida la presencia de infiltrados inflamatorios en las placas ateroscleróticas cuyo cambio se asocia a eventos en la historia natural de la enfermedad, así como un aumento de los biomarcadores inflamatorios en pacientes con

aterosclerosis avanzada o SCA [18][49][50]. Durante las últimas décadas, las complejas interacciones entre los componentes inflamatorios, tanto a nivel celular como molecular, han sido objeto de investigación para intentar comprender los fenómenos de formación y desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Aunque se desconoce cuál es el mecanismo desencadenante inicial de la aterogénesis, se acepta que la presencia de niveles elevados circulantes de LDL generan una acumulación subendotelial colesterol rico en lipoproteínas LDL. Las placas iniciales tienden a localizarse en lugares de flujo sanguíneo turbulento, lo que perfila el estrés mecánico de cizallamiento del endotelio como posible cofactor en el inicio de la enfermedad aterosclerótica. La expresión superficial endotelial de moléculas de adhesión (CAM) como VCAM-1, P-selectina y E-selectina puede ser el paso inicial que genere una inflamación subendotelial inicial. De hecho, se ha demostrado que, en modelos murinos de aterosclerosis acelerada, el bloqueo genético de las CAM reduce tanto el número como el volumen de las lesiones ateroscleróticas [51][52]. También es conocido que la presencia de CAM endoteliales precede al infiltrado inflamatorio por leucocitos [52]. Mediante la interacción de las moléculas de adhesión endotelial y las integrinas, los leucocitos son conducidos a la pared arterial. La primera población reclutada son los monocitos clásicos (CD16+/CD14-), que expresan el receptor de citoquinas CCR-2, CCR-5 y el receptor CXC3R-1 [53]. En el interior de la pared vascular, los monocitos maduran hasta convertirse en macrófagos y expresan receptores scavenger para lipoproteínas, como el receptor scavenger A (SR A) y el CD36, logrando así la capacidad de internalizar las lipoproteínas modificadas, en particular las partículas LDL oxidadas. A través de fagocitosis de las partículas lipídicas, los macrófagos desarrollan el peculiar fenotipo de formación del núcleo necrótico de la placa aterosclerótica, secretando además citoquinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6, IL-12 o el TNF-α [54]. Éstas potencian la expresión de más CAM en la superficie endotelial que amplifica la infiltración leucocitaria, incluyendo linfocitos-T CD4+ que son reclutados a través de la superfamilia de citoquinas CXC [55]. Una vez dentro de la placa y tras la exposición a un antígeno que aún es desconocido (se han propuesto varios como LDL oxidadas, la ApoB10 o la proteína HSP60) las células T alcanzan el perfil inflamatorio Th1, que mantiene y amplifica una respuesta inflamatoria crónica intraparietal, responsable de la progresión y/o inestabilización de la placa [56].

Además de los factores anatómicos previamente descritos, se considera que la inflamación juega un papel en la inestabilización de la placa que lleva a la aterotrombosis a través de dos posible mecanismos [57]:

- Liberación de metaloproteinasas (MMPs), colagenasas y gelatinasas que degradas la membrana basal endotelial, así como las fibras de colágeno de la cápsula fibrosa [58]. De este modo, la probabilidad de inestabilización de la placa se debería a un desequilibrio entre factores proteolíticos y antiproteolíticos dentro de la placa, donde la inflamación desempeña un papel determinante a favor de la proteólisis.
- La liberación de IFN- γ por las células T activadas inhibe la síntesis de colágeno en los fibroblastos, así como la apoptosis de células endoteliales [59].

- Los mediadores inflamatorios podrían además tener un papel fundamental en la formación del trombo, una vez producida la pérdida de integridad endotelial. Las cascadas moleculares de la inflamación y la coagulación muestran grandes áreas de solapamiento, dibujando un mecanismo de retroalimentación positiva. Así, La IL-6 induce la producción de inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) e inhibe la producción de antitrombina, la IL-6 inhibe también la escisión del factor von Willebrand, mientras que la proteína C reactiva (PCR) regula el factor tisular e inhibe la producción de prostaglandinas, con el efecto neto de un estado pro-trombótico e hipo-fibrinolítico [(60)]. En resumen, un estado pro-inflamatorio no sólo impulsaría la inestabilidad de la placa aterosclerótica, sino que también promovería un estado pro-trombótico local y sistémico, que llevaría a la formación de trombos de mayor tamaño y, en última instancia, a sufrir una isquemia aguda grave tras la rotura de la placa.

1.2.4 La tomografía de coherencia óptica: una ventana a la histología coronaria

Las técnicas de imagen intravascular coronaria y, en particular, la OCT, han supuesto una revolución en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad coronaria. La tomografía de coherencia óptica es una modalidad de imagen intravascular que utiliza un catéter de fibra óptica que emite ondas de luz cercana al infrarrojo (1250–1350 nm) y registra su señal dispersa produciendo imágenes de alta resolución de 10 a 15 μm, lo que supera con creces la resolución de una angiografía convencional, siendo 10 veces superior a la del IVUS. Dependiente del tipo de tejido, la OCT presenta una penetración de 1 a 2mm, siendo muy inferior a la de los ultrasonidos, siendo una herramienta ideal para la exploración de arterias coronaria pero limitada para su uso en vasos de mayor entidad. El catéter de OCT presenta un perfil de 2,5F y se avanza sobre una guía de angioplastia convencional de 0,014". Dado que la luz de longitud de onda cercana al infrarrojo no es capaz de atravesar la sangre, es necesaria la utilización de un medio líquido transparente (generalmente contraste radiológico) que desplace la sangre durante la adquisición de las imágenes por OCT. Un desplazamiento de la sangre de buena calidad permite diferenciar el contorno del lumen y la pared del vaso, lo que permite medición automática fiable de los diámetros del lumen, el área del lumen y marcar la estenosis máxima y los segmentos de referencia distal y proximal Las imágenes se muestran en transversal, longitudinal o en 3D, según la elección del operador. La alta frecuencia de imágenes (de 158 a 180 fotogramas/s) y la rápida velocidad de retroceso (36 a 40 mm/s) de la OCT permite obtener imágenes de segmentos coronarios largos (50 a 75mm) en breves segundos con inyecciones de contraste de 3-5 ml/sg durante 3-4 s. La seguridad de la OCT en la práctica clínica habitual ha sido demostrada repetidamente (incluso en pacientes que presentan un IAMCEST o una trombosis del stent) [(61)]. Actualmente, existen dos tipos de sistemas OCT para uso clínico (ILUMIENTM OPTISTM, OCT de dominio de frecuencia, Abbot Vascular Inc., St Paul,

Minnesota, EE. UU.; y LUNAWAVETM, imagen óptica en el dominio de la frecuencia, Terumo Corporation, Tokyo, Japan).

La OCT es la técnica de referencia en la evaluación morfológica de pared arterial con aterosclerosis. La caracterización anatómica de los tejidos por la OCT se basa en la intensidad de señal (backscattering) y en la atenuación de la señal lumínica [(62)]. La pared de los vasos sanguíneos tiene tres capas distintivas: la íntima, la media y la adventicia. Los estudios postmortem validaron la OCT en la diferenciación de placas fibrosas, calcificadas y las placas lipídicas con una alta sensibilidad y especificidad [(63)]. La morfología básica de los distintos tipos de tejidos y estructuras en la imagen OCT puede identificarse con relativa facilidad mediante estos cinco atributos binarios: posición (pared del vaso/lumen) reflexión (brillante/oscuro), atenuación de la luz (sombras leves/grandes sombras), delineación (nítida/difusa) y homogeneidad del tejido (homogéneo/heterogéneo). En las imágenes de OCT, una placa fibrosa es una región homogénea y rica en señales (altamente retrodispersada). Una placa fibrocalcificada tiene las características de tejidos fibrosos junto con áreas de calcio, que aparecen como una región pobre en señal o de señal heterogénea con bordes nítidamente bordes definidos. Dado que la OCT puede penetrar en el calcio, es posible medir el grosor, el área y el volumen de la calcificación. La calcificación puede clasificarse en microcalcificaciones y macrocalcificaciones según los hallazgos de la OCT. Las microcalcificaciones se consideran la etapa inicial de la calcificación de la placa aterosclerótica y se han asociado a la placa vulnerable y complicada en estudios OCT e histopatológicos [(64)]. Por el contrario, las macrocalcificaciones o láminas de calcio de asocian con placas estables no inflamadas. No obstante, la calcificación extensa en grosor o distribución circunferencial se ha asociado con la infraexpansión del stent, que a su vez se asocia a unos peores resultados clínicos por lo que su identificación es de gran utilidad para favorecer el empleo de terapias que permitan la expansión del stent y mejoren sus resultados clínicos ulteriores [(65)]. Dentro del lumen, una estructura brillante de baja atenuación brillante suele ser un trombo blanco y una estructura oscura de alta atenuación estructura oscura con superficie brillante es un trombo rojo. El fibroateroma de capa fina (TCFA) se define como un núcleo necrótico de alta atenuación delineado de más de 90 grados de la circunferancia en la imagen de corte transversal con un grosor intimal fino de <65-70 µm. Un estudio en el que se evaluó la capacidad de la OCT para detección del TCFA derivado comparado con la histología como patón de oro mostró una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y precisión diagnóstica de la OCT para TCFA de 100, 97, 41, 100 y 98%, respectivamente [(66)].

1.2.5 La imagen intravascular actual de la placa vulnerable

El desarrollo y uso clínico habitual de la OCT ha revolucionado nuestra comprensión de la enfermedad arterial coronaria. Los estudios de OCT in vivo han ido paralelos a los avances en la dinámica de fluidos computacional, lo que ha proporcionado información adicional sobre los diversos factores hemodinámicos que influyen en el crecimiento y la estabilidad de la placa. Además, el uso de la OCT ha permitido descubrir la frecuente presentación de patrón de placa cicatrizada y ha permitido, a diferencia del IVUS, el estudio morfológico de placas más longevas con calcificación calcificadas y la descripción de tres subtipos de patrones calcificados responsables de SCA: el calcio superficial, los nódulos eruptivos de calcio y la protusión de calcio luminal (Figura 5).

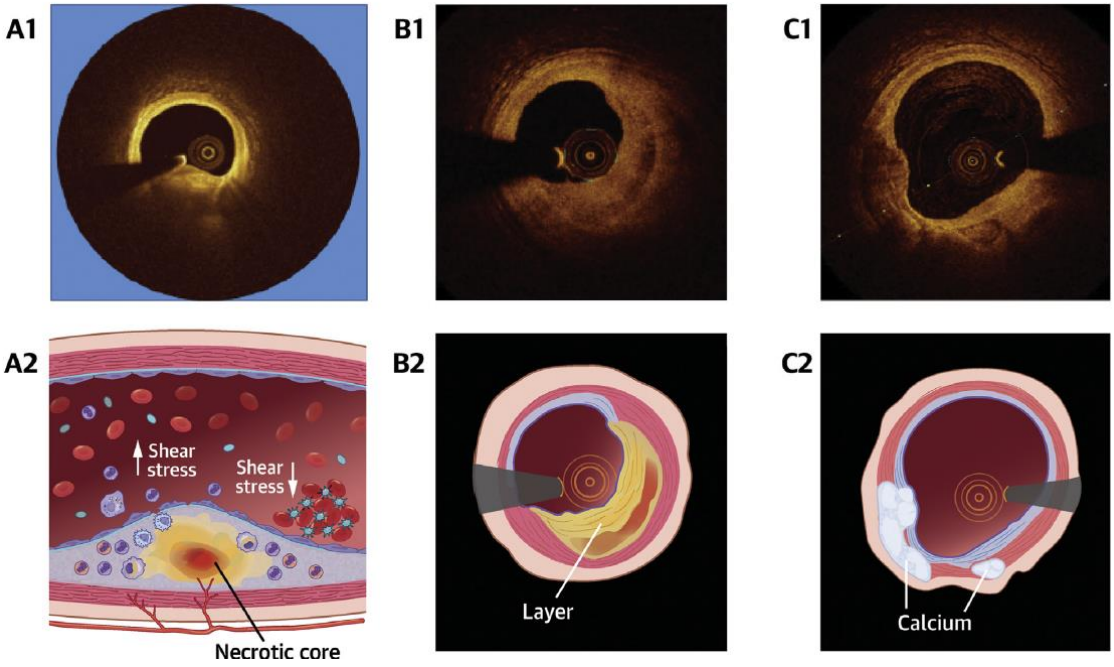


Figura 5. *A1. Imagen de OCT de placa coronaria fibrocalcificada ligera. A2. La presencia de irregularidades parietales en la luz arterial genera alteraciones reológicas en flujo sanguíneo, lo cual genera una inflamación crónica con crecimiento del núcleo necrótico. B1. Patrón por OCT de placa en capas. Se observan dentro de la placa diferentes capas bien delimitadas de diferente densidad. B2. Representación esquemática del patrón multicapas. C1. Placa calcificada con discreta protrusión luminal con disrupción del tejido intimal (entre la 7 y las 9). C2. Representación esquemática de los hallazgos de OCT* [(67)].

1.2.5.1 Importancia del estrés de cizallamiento en la progresión e inestabilización de la placa

Los estudios de dinámica de fluidos computacional con modelos de OCT, han demostrado la importancia del estrés de cizallamiento o shear stress endotelial (ESS) en el desarrollo y desestabilización de la placa [(68)]. Estos hallazgos se unen a la demostración en estudios in vitro de los cambios estructurales endoteliales con aumento de la permeabilidad endotelial y producción de señales proinflamatorias y trombogénicas en respuesta a bajos ESS [(69)]. Las zonas con menor ESS muestran cápsulas de fibroateroma más finas, con mayor infiltración celular y mayor arco lipídico que las localizadas en zonas con alto EES [(70)]. Además de una tendencia a la presencia de placas vulnerables en relación con el estrés de cizallamiento, también se ha demostrado mediante estudios por OCT, una mayor prevalencia de erosión de placa en zonas con elevado estrés oscilatorio de cizallamiento , mecanismo propuesto como desencadenante de la erosión por Frank et al y Quilliard et al [(71)(72)(73)].

1.2.5.2 Ruptura de placa vs erosión como responsables de SCA

La ruptura de placa, junto con la erosión, son los principales desencadenantes de la aterotrombosis que da lugar a los SCA. El estudio de imagen intravascular mediante OCT permite la distinción entre ambas entidades, habiéndose demostrado que la evolución clínica es peor y hay una mayor incidencia de necesidad de revascularización de lesiones no culpables tras un SCA en los que se evidencia ruptura de placa [(74)]. Además, las características de las placas sometidas a erosión muestran menor prevalencia de TCFA en la lesión culpable, así como un menor número de placas complicadas en las arterias no culpables que en los pacientes con ruptura como culpable del SCA [(75)]. Un estudio con exploración sistemática de los tres vasos mediante OCT en 675 pacientes con IAMCEST, demostró que los pacientes con erosión mostraban menor número de placas vulnerables y se localizaban más cerca de las bifurcaciones. Así mismo, la presencia de erosión se asoció a una menor vulnerabilidad global, definida según los criterios CLIMA [(76)]. Sin embargo, la ruptura de placa es un nicho con sustratos anatómicos más heterogéneos, que incluye tanto placas ricas en lípidos, TCFA como placas fibróticas [(77)].

1.2.5.3 Placa calcificada culpable

Aunque la erosión y la ruptura son responsables de la gran mayoría de los SCA, las lesiones culpables calcificadas constituyen un 2-7% de las placas responsables de SCA por aterotrombosis, siendo más frecuentes en pacientes ancianos o con insuficiencia renal crónica [(78)]. Aunque el sustrato anatómico fue descrito en las primeras series de estudios postmortem, la utilización generalizada de la OCT ha llevado a un mejor

conocimiento de esta patología. Se cree que, debido al movimiento cíclico coronario, las zonas con calcificación extensa pueden romperse a la luz donde el depósito de calcio y fibrina da lugar a los nódulos calcificados. Estos, al crecer pueden irrumpir dentro de la luz, dando lugar a los nódulos eruptivos. Se ha visto en estudios anatomopatológicos, que es frecuente el depósito de fibrina y de células inflamatorias entre las espículas cálcicas, con pérdida de matriz extracelular y aumento de la vascularización, hallazgos que se consideran un indicador potencial de hemorragia recidivante intra-placa y su posterior cicatrización. Sugiyama et al observaron, en un estudio de OCT que incluyó más de 1200 pacientes con SCA, que el nódulo calcificado era responsable del 13% de los SCA. De estos pacientes, la prevalencia de nódulos eruptivos, calcio superficial y nódulo calcificado fue de 26, 67 y 7% respectivamente [(79)]. Además, la calcificación superficial se asoció a peor flujo inicial y a una mayor estenosis angiográfica que los otros dos patrones. En esta serie se demostró que era más frecuente la presencia de trombo blanco en la calcificación superficial que en los nódulos eruptivos, que mostraron con más frecuencia trombo rojo [(79)].

1.2.5.4 Imagen bimodal de placa vulnerable.

Desafortunadamente, en la actualidad, somos incapaces de predecir con fiabilidad eventos clínicos de placa con las herramientas de imagen intravascular más actuales. Hoy en día, las técnicas de imagen intravascular permiten definir el tipo de placa y sus características histológicas, pero no son capaces de detectar los mecanismos celulares y moleculares, que parecen jugar un papel determinante en la inestabilización de las placas ateroscleróticas arteriales. Para hacer frente a este reto, tanto ingenieros como investigadores básicos y clínicos han trabajado codo con codo para desarrollar nuevas técnicas de imagen intravascular multimodal, en las que se integran dos o más modalidades complementarias en el mismo catéter de imagen [(80)]. Algunas de ellas ya se han probado en los primeros estudios clínicos, y otras técnicas de nueva generación también están en fase de desarrollo. Estas técnicas incluyen la fotoacústica intravascular (IVPA), la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS)/ Raman [(81)], la OCT sensible a la polarización [(82)], la fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRF) y autofluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRAF) (denominadas en combinación como NIR[A]F) y las imágenes de vida de fluorescencia (FLIM) [(83)]. Aunque cada una de estas modalidades tiene ventajas particulares, ninguna permite la evaluación completa de la placa.

Tabla 1. Estado actual de las diferentes nuevas tecnologías para obtención de imagen dual intracoronaria.

	OCT	NIRS	NIRF/AF	FLIM	IVPA
Utilidad	**Características estructurales**	**Lípidos**	**Inflamación**	**Composición química**	**Lípidos 3D**
IVUS	**OCT-IVUS** First in human *(84)* 3F	**NIRS-IVUS** Comercializado Estudios prospectivos*(43)* 3.2-F	----------	**FLIM-IVUS** *In vivo* en cerdo *(85)* 3.7-F	**IVPA-IVUS** *In vivo* en cerdo 3-F
OCT	**MicroOCT** *Ex vivo (86)*	**NIRS-OCT** *Ex vivo (87)* 4.5-F	**NIRAF-OCT** First in human *(88)* 2.7-F	**FLIM-OCT** *In vivo* en conejo *(89)* 3.2-F	**IVPA-OCT** *Ex vivo* 4.5-F

IVUS-NIRS

La primera técnica de imagen multimodal explorada es la unión de la ecografía intravascular (capaz de observar anatomía vascular) con la técnica NIRS, que permite detectar la presencia de placas ricas en lípidos (LPR). La NIRS es un método espectroscópico que permite detectar la absorción de la luz en el espectro de frecuencias cercano al infrarrojo, obteniendo información sobre la composición química de la estructura analizada. Aunque la NIRS tiene la capacidad de detectar lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias ex vivo [(90)], su capacidad de demostrar y cuantificar de forma precisa y reproducible la presencia de un núcleo rico en lípidos en la placa es la base de su utilidad clínica [(91)(92)]. La información del NIRS, se expresa normalmente en un quimiograma, que es un mapa de probabilidad codificado por colores que indica la ubicación e intensidad del contenido lipídico coronario. A partir de este quimiograma, el índice máximo de carga lipídica del núcleo dentro de una sección coronaria de 4 mm (maxLCBI4mm) se ha utilizado cada vez más para demostrar la presencia de LPR. Se han publicado varios estudios clínicos con esta técnica en la última década. El umbral de maxLCBI4mm >400 se asocia a segmentos culpables de pacientes con IAMEST con una sensibilidad del 64% y una especificidad del 85% [(91)], y, actualmente hay varios estudios prospectivos que demuestran que un maxLCBI4mm elevado es un fuerte predictor de eventos cardiovasculares mayores [(93)(43)].

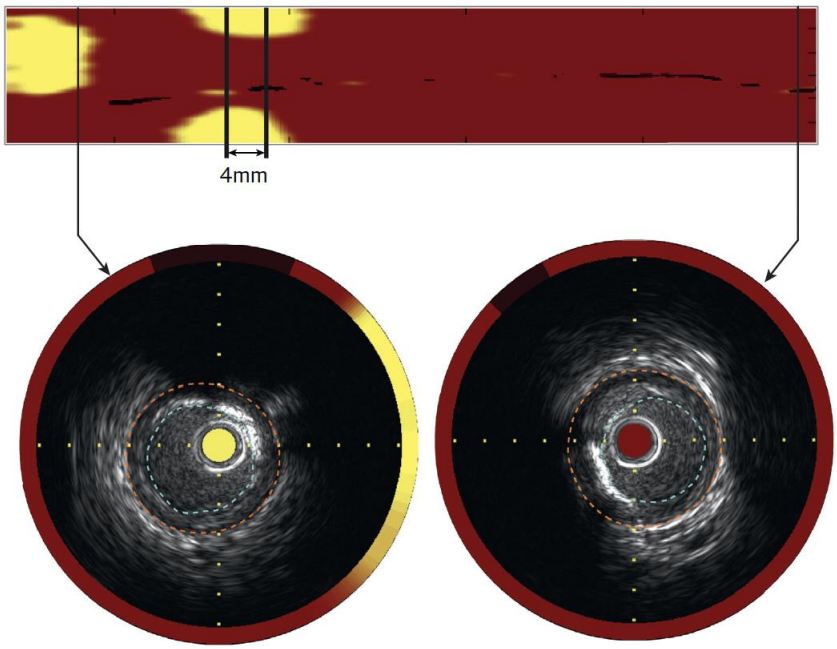


Figura 6. *Ejemplo del quimiograma NIRS integrado en imagen IVUS.*

El estudio más importante publicado (el LRP study) incluyó a 1563 pacientes tratados mediante revascularización percutánea, a los que se les estudió con esta técnica y con un seguimiento clínico a dos años. Para los segmentos con un maxLCBI4mm >400, el HR no ajustado para MACE fue de 4,22 (IC 95%: 2,39 a 7,45; p < 0,0001), lo que demuestra la capacidad de NIRS-IVUS para identificar las características de la placa asociadas a futuros eventos cardíacos agudos, e hizo que se aprobara por la FDA apara la predicción de eventos futuros en pacientes [(43)]. Sin embargo, esta técnica adolece de diferentes limitaciones como son la baja resolución espacial del NIRS y, en menor medida, del propio IVUS, que impiden determinar importantes detalles como el grosor de la capa fibrótica o la endotelización de los struts de los stents. Además, tampoco permite determinar con precisión la profundidad del núcleo lipídico que también parece fuertemente asociada con el desarrollo de futuros eventos.

IVUS-OCT

La unión en un mismo catéter de un transductor de ultrasonidos y una lente para imagen OCT, es plausible y actualmente disponible clínicamente. El primer estudio en humanos que utiliza la modalidad dual IVUS-OCT se publicó en 2018, demostrando las funciones complementarias de la IVUS y la OCT para para obtener imágenes de placas ricas en lípidos, fibrosas y calcificadas [(84)]. La potencial utilidad de esta tecnología tendrá que ser probada en futuros estudios y no disponemos de datos hasta la fecha.

OCT-NIR (A)F

La imagen de fluorescencia utiliza la luminiscencia para poder detectar componentes moleculares. Unido a la alta resolución estructural de la OCT hacen esta combinación especialmente útil en la detección de placa vulnerable. La señal de fluorescencia y de OCT pueden detectarse utilizando unas únicas fibra y lente (no siendo posible con la combinación de IVUS, que requiere un cable eléctrico adicional para la emisión y detección de ultrasonidos). Además de la posibilidad del marcado extrínseco de moléculas (que será descrito más adelante), es posible estudiar las propiedades de autofluorescencia de los tejidos. La señal de autoflorescencia que se ha descubierto en las placas vulnerables parece en relación con la presencia de productos de degradación de las porfirinas que aparecen en las placas vulnerables con episodios de hemorragia intraplaca [(94)]. El primer estudio publicado en humanos con esta tecnología, exploró 17 arterias coronarias, objetivando concordancia entre la señal NIR AF y los criterios de placa de riesgo por OCT [(88)]. La principal limitación de esta tecnología es que la intensidad de la fluorescencia no puede ser determinada de forma cuantitativa, ya que la intensidad de la señal depende de múltiples factores, requiriendo complejos algoritmos para compensar la pérdida de señal con la distancia o por el scattering lumínico para poder obtener datos cuantitativos de la señal de NIR [(95)].

1.2.6 La brecha entre ciencia básica y clínica: necesidad de fenotipar la enfermedad coronaria

Debido al desarrollo durante las últimas cuatro décadas de múltiples y potentes líneas de investigación básica en modelos histológicos *in vitro,* y en modelos animales *ex vivo* e *in vivo*, disponemos en la actualidad una gran evidencia sobre los mecanismos moleculares, celulares y tisulares que intervienen en el desarrollo, progresión e inestabilización de la enfermedad aterosclerótica coronaria. Por otro lado, los hallazgos anatamopatológicos en estudios de autopsias en las décadas de los ochenta y noventa junto con el avance en las técnicas de imagen coronaria, han permitido realizar en los últimos años grandes estudios clínicos prospectivos que han identificado fenotipos de imagen intravascular de alto riesgo para predecir la aparición de eventos clínicos. A pesar de estos importantes avances en el conocimiento de la enfermedad aterosclerótica coronaria, hoy en día el valor predictivo positivo de las consideradas, a la luz del conocimiento actual, placas de alto riesgo, sigue siendo demasiado bajo para tener una relevancia clínica sólida. La incorporación de técnicas que permitan trasladar la abundante evidencia obtenida en los estudios básicos al escenario real clínico parece de una importancia extrema en la actualidad. De este modo, podrían confirmarse (o rechazarse) los múltiples hallazgos reportados desde la ciencia básica en relación con las diferentes y heterogéneas vías moleculares y celulares en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis coronaria. La traslación de estos hallazgos al modelo humano *in vivo* mediante la mejora de la imagen clínica intravascular sería de extrema utilidad tanto para

generar conocimiento como para transformar esos hallazgos en dianas diagnósticas y terapéuticas.

La imagen molecular es capaz de mover nuestros avanzados conocimientos en biología vascular hacia estas aplicaciones. Sin embargo. aún quedan muchos obstáculos por resolver antes de que los métodos de imágenes moleculares puedan aplicarse en la práctica clínica rutinaria. Algunos obstáculos, como la baja resolución espacial de las imágenes nucleares o la de la luz infrarroja cercana, se basan en principios físicos que no pueden mejorarse significativamente. Por otro lado, son necesarios marcadores más específicos y que permitan mayor sensibilidad en su detección por la técnica de imagen utilizada. Las primeras aplicaciones de la imagen molecular se han realizado en el campo de la oncología, donde han experimentado un paulatino avance en la última década [(96)]. Así, la medicina cardiovascular podrá seguir la estela del campo oncológico, donde las imágenes de biomarcadores *in vivo* han encontrado su camino en la asistencia clínica de los pacientes y se utiliza de rutina en grandes ensayos clínicos. De este modo, según vayan aprobándose nuevas dianas y señalizaciones se podrán llevar a modelos clínicos reales los mecanismos moleculares que hayan demostrado su utilidad en modelos pre-clínicos.

Parece que, en nuestro camino hacia la medicina personalizada del futuro, es obligado disponer de técnicas de imagen molecular intracoronaria que permitan identificar pacientes y lesiones que puedan beneficiarse de una terapia individualizada en función de estos hallazgos moleculares y celulares, trasladados de la ciencia básica, y que, integrados con hallazgos clínicos, genéticos y biomarcadores, permitan mejorar la calidad de vida y la supervivencia dependiente de la patología cardiovascular.

1.2.7 Dianas posibles para la detección de placas ateroscleróticas de alto riesgo

La imagen molecular es un campo emergente que integra la tecnología de imagen avanzada con la biología celular y molecular. La imagen molecular permite la detección y cuantificación a escala celular o molecular de diferentes mecanismos fisiológicos o patológicos. Recientemente, la aplicación de las nuevas tecnologías químicas y de nanotecnología han estimulado el desarrollo de agentes de imagen. En paralelo, los ingentes avances en el conocimiento preclínico de los mecanismos que, inician, hacen progresar e inestabilizan la aterosclerosis coronaria permiten diseñar una serie de dianas moleculares, cuya detección podría ser de gran utilidad clínica para establecer un pronóstico y una terapia individualizada en función de los hallazgos. A la luz del conocimiento actual, existen múltiples dianas moleculares que podrían ser de gran interés para su traslación al diagnóstico clínico.

Tabla 2. Potenciales dianas moleculares en aterosclerosis.

Molécula	Trazador	Tipo de estudio	Imagen
VCAM1	Nanopartículas Radiosondas Fluorescencia Microburbujas	Animal *in vivo*	RMN, PET, NIRS, Ecografía
P-selectina	Nanopartículas Radiosondas	Animal *in vivo*	RMN, PET
ICAM-1	MPIOS Nanopartículas	Animal *in vivo*	RMN, PET
Fibrina	Gadolinio Fluorescencia	Animal *in vivo*	RMN, NIRs
GP IIbIIIa	Gadolinio	Animal *in vivo*	RMN
Elastina	USPIO	Humanos	RMN
VAP-1	Radiosondas	Animal *in vivo*	PET
Integrina	Radiosondas	Humanos	PET
Catepsina A	Radiosondas	Animal *in vivo*	PET
MMP	Radiosondas Fluorescencia	Animal *in vivo*	PET, SPECT. NIRs
Fagocitosis	Nanopartículas	Animal *in vivo*	PET, SPECT
Macrófagos	Nanopartículas Radiosondas Fluorescencia	Animal *in vivo*	PET, SPECT. NIRs
Factor XIII	Radiosondas Fluorescencia	Animal *in vivo*	PET, NIRs

1.2.7.1 Inicio de la formación de la aterosclerosis coronaria

La activación endotelial es uno de los pasos iniciales de la inflamación de los vasos y del desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Al activarse, las células endoteliales expresan diversas moléculas de adhesión que desencadenan el reclutamiento de leucocitos a través de la pared del vaso sanguíneo. Las selectinas (e-selectina, p-selectina y l-selectina), las moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1, y las quimiocinas controlan la rodadura

de los leucocitos, la adhesión y la migración de los leucocitos hacia el interior de la pared del vaso. Las moléculas de adhesión se expresan en las células endoteliales activadas, células musculares lisas y macrófagos, reclutando a los leucocitos a través de la unión de la integrina tardía (VLA)-4. Por lo tanto, los enfoques de imagen dirigidos a VCAM-1 utilizan péptidos VLA-4, anticuerpos anti-VCAM-1 y péptidos de la molécula MHC-I que interactúan con VCAM-1. con VCAM-1. Se ha observado que diversos agentes marcadores de VCAM-1 detectan con éxito inflamación vascular y lesiones ateroscleróticas y que se correlacionan con los niveles de ARNm de VCAM-1 intraplaca. Sin embargo, los marcadores moleculares dirigidos a VCAM-1 no detectan exclusivamente el endotelio activado, ya que los macrófagos activados expresan VCAM-1 y otras integrinas en su superficie [(97)]. Marcadores contra las selectinas se han utilizado también para detectar el endotelio activado. En paralelo a la expresión de moléculas de adhesión, la disfunción endotelial y el aumento de la permeabilidad endotelial se consideran eventos iniciadores en la formación de la placa. La pérdida de la barrera endotelial progresiva permite que las lipoproteínas de baja densidad se difundan a través de las células endoteliales y se acumulen en la íntima arterial. La detección del paso transendotelial de agentes marcadores de imagen unidos a albúmina han demostrado su capacidad para la detección precoz de aterosclerosis en modelos animales [(98)]. Mediante el uso de imagen molecular mediante nanopartículas detectables por NIRs, se ha observado que la deposición de estas nanopartículas (debido a un aumento de permeabilidad del endotelio) en zonas de placa hipercelular se asocia a un mayor riesgo de aterotrombosis [(99)]. Durante la aterogénesis., los monocitos se acumulan en la íntima arterial y se diferencian en macrófagos, que ingieren lipoproteínas oxidadas, secretando diversos mediadores proinflamatorios y maduran hasta convertirse en células espumosas. La obtención de imágenes de macrófagos inflamatorios cargados de óxido de hierro se ha realizado con éxito en animales y en humanos y constituye un enfoque prometedor para identificar placas vulnerables [(100)]. El marcado de los macrófagos puede realizarse mediante la inyección directa de nanopartículas en el torrente circulatorio. Sin embargo, la posibilidad de marcado ex vivo de los monocitos y su posterior reintroducción en el sistema circulatorio ha demostrado presentar mayor eficiencia diagnóstica, aunque puede alterar el fenotipo diferenciado de estos monocitos. Por otro lado, los macrófagos activados en la placa aterosclerótica expresan varias integrinas como la αvβ3. Así, la visualización de αvβ3 mediante el uso de trazadores nucleares y agentes de contraste de contraste ha permitido identificar la presencia de macrófagos activados en las placas ateroscleróticas en varios modelos animales [(101)].

1.2.7.2 Marcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo promueve la oxidación de los lípidos y la muerte celular y es considerado uno de los principales desencadenantes de la progresión y desestabilización de las lesiones. Los lípidos oxidados se han detectado en modelos preclínicos de aterosclerosis utilizando agentes de contraste MDA (malondialdehído-lisina). El estrés

oxidativo está mediado predominantemente a través de los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno (ROS). En las placas ateroscleróticas, las ROS son producidas por los macrófagos, los neutrófilos y las células musculares lisas. La mioloperoxidasa (MPO) es la enzima principal implicada en la generación de ROS. Por lo tanto, la detección de la presencia de MPO puede ser útil para la identificación y caracterización de las placas vulnerables [(102)].

Los macrófagos secretan enzimas proteolíticas que pueden degradar las proteínas de la de la matriz extracelular, promoviendo el adelgazamiento y la ruptura de la capa fibrosa. Entre las diversas proteasas existentes, las catepsinas y las metaloproteasas (MMP) se han se han utilizado con frecuencia para la obtención de imágenes moleculares. Mediante trazadores nucleares basados en moléculas inhibidoras de proteasas, que se unen al sitio activo de la enzima de interés y se concentran en zonas de alta concentración de proteasa, puede detectarse placas de alta actividad MMP [(103)]. De manera similar a las MMP, la catepsina también se está utilizando como diana de imagen molecular en las lesiones ateroscleróticas [(104)].

1.2.7.3 Marcadores de apoptosis

La presencia de un núcleo necrótico amplio es una característica que, con frecuencia, se asocia a las placas vulnerables. Las células espumosas cargadas de lípidos son propensas a sufrir apoptosis. Los detritos celulares promueven aún más la inflamación, la secreción de proteasas y, por tanto, la desestabilización progresiva de la placa, lo que acaba provocando ruptura y trombosis. Durante la apoptosis, las flipasas activadas externalizan rápidamente las cadenas de fosfadilserina (PS) de la membrana interna de la doble capa de lípidos a la capa externa de la membrana. Las PS externalizadas PS son reconocidas por la proteína plasmática Anexina V (A5). La A5 se ha utilizado como marcador molecular tanto en modelos preclínicos de como clínicos por SPECT y RMN [(105)].

1.2.7.4 Matriz extracelular y remodelado vascular

Durante la inflamación, el aumento de la proteólisis es responsable de la degradación de proteínas de la matriz extracelular (MEC) y el subsiguiente remodelado vascular. La obtención de imagen molecular de las proteínas de la MEC se ha logrado mediante RMN con Gadofluorina, un agente de contraste basado en Gd dirigido al colágeno, los proteoglicanos y la tenascina [(106)]. De igual modo, la proteína de MEC elastina parece jugar un rol importante en el remodelado vascular aterosclerótico. El ateroma humano y las regiones de la placa ricas en macrófagos muestran un alto contenido de tropoelastina desorganizada, pero carecen de elastina madura. Un agente de RM molecular dirigido a la elastina (ESMA) ha mostrado resultados prometedores para la obtención de imágenes no invasivas de la pared vascular [(107)]. La presencia de microcalcificaciones está asociada a inflamación crónica de pared arterial ateromatosa.

La detección de hidroxiapatita arterial, así como su morfología y distribución, podría ser una futura diana para la imagen molecular coronaria.

1.2.7.5 Ruptura, erosión y aterotrombosis

La presencia de trombo parietal puede detectarse a nivel molecular utilizando marcadores contra la GpIIbIIIa plaquetaria [(108)]. Otro enfoque preclínico utiliza sustratos peptídicos para el factor XIII, un factor importante de los monómeros de fibrina para la estabilización del trombo. Los nanosensores fluorescentes son capaces de revelar actividad del factor XIII en modelos experimentales de trombosis y pueden permitir diferenciar los trombos agudos de los crónicos in vivo utilizando imagen intravascular mediante NIRs [(109)].

Múltiples dianas se han empleado con éxito en modelos preclínicos de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la traslación de estos hallazgos preclínicos a la práctica clínica habitual aún no se ha producido en la enfermedad cardiovascular aterotrombótica. Para elegir una diana perfecta, debemos tener un sólido respaldo de evidencia sobre su expresión y su cinética de cambio; además debe de estar presente en una concentración suficiente para poder ser detectada y diferenciada de su presencia en situaciones no patológicas. En el caso particular de la obtención de imagen molecular intravascular, debe tenerse en cuenta además su localización. Las dianas situadas en la pared arterial requieren la administración del marcador en un lapso suficiente para poder llegar a la zona de interés en concentración adecuada para la obtención de señal. Esto hace más complicado su utilización en la práctica clínica. Las dianas endoteliales parecen más sencillas y rápidas de marcar para el diagnóstico intravascular. Sin embargo, la velocidad de flujo arterial hace que el tiempo de contacto y ligado del marcador específico sea muy corto. La elección de la diana molecular es, probablemente, la piedra angular para poder disponer de métodos de diagnóstico molecular, que, sumado a otros datos genéticos y clínicos individualizados, nos lleven a la medicina de precisión del futuro.

1.2.8 Nanopartículas para la imagen cardiovascular

Para la detección de procesos biológicos específicos a escala molecular o celular, es necesario el uso de agentes de contraste exógenos capaces de detectar o marcar las moléculas o células de interés. Los actuales agentes de contraste de moléculas pequeñas, como la fluorodeoxiglucosa (FDG) para la obtención de imágenes PET, no son específicos de las células y dependen de otras estrategias, como el aumento del metabolismo celular para mejorar la captación. Las estrategias basadas en nanomateriales han sido de gran interés en los últimos años para la administración de agentes de contraste debido a su acumulación selectiva en células y tejidos específicos, en particular en los macrófagos [(110)]. Actualmente disponemos de una tecnología que permite la obtención de diferentes familias de nanocompuestos con potencial como marcadores de

imagen y que han sido probados en estudios preclínicos como las nanopartículas metálicas, polímeros anfifílicos, nanopartículas de núcleo sólido y nanopartículas lipídicas. La estructura atómica de los materiales con tamaños nanométricos favorece la aplicación de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. La señal de imagen molecular proporcionada por estas nanopartículas se debe a su composición, como en el caso de las nanopartículas metálicas de óxido de hierro (IONP) para la RMN o bien, mediante la encapsulación o conjugación de pequeñas moléculas, incluido el tecnecio 99 (99Tc) para la PET [(111)(112)]. Además, es posible marcar una sola célula a través de nanopartículas mediante numerosos métodos, como el uso de elementos de funcionalización como anticuerpos o péptidos y el etiquetado ex vivo [(113)(114)].

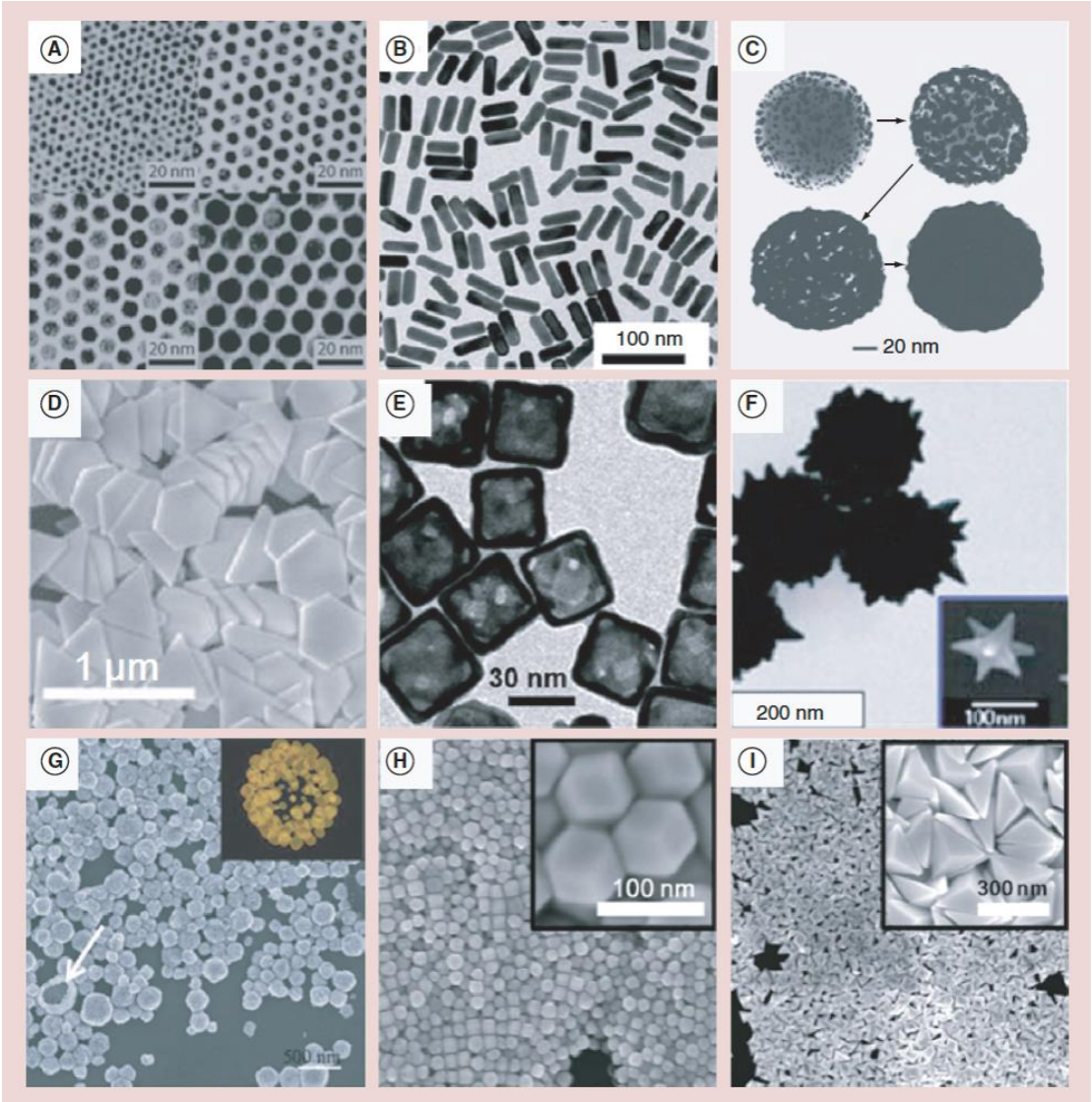
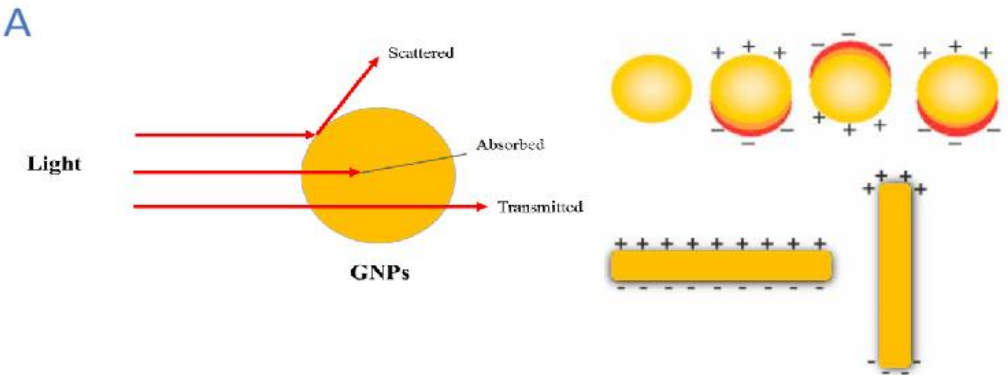


Figura 7. *Ejemplos de nanopartículas sintetizadas de diferentes tamaños y morfologías. (A) Nanoesferas, (B) nanorods, (C) nanoshells, (D) nanoprismas, (E) nanocajas, (F) nanoestrellas, (G) nanovesículas, (H) dodecaedros rómbicos y (I) bipirámides.*

NANOPARTÍCULAS DE ORO (GNP)

Actualmente, las GNP son los nanocompuestos con mayor evidencia en diferentes aplicaciones clínicas, tanto diagnósticas como terapéuticas. El oro es un elemento que presenta una singular mezcla de características físicas y químicas tanto en condiciones macroscópicas como microscópicas. Mientras que las propiedades macroscópicas se refieren a su singular color dorado, estabilidad química y alto potencial redox, a nivel nanométrico, las características del oro se explican por una combinación de su estructura electrónica junto con otros efectos debidos a una alta proporción de átomos de superficie con respecto a los átomos de masa, el confinamiento electromagnético debido a una resonancia plasmónica localizada tras la interacción con una onda óptica, y a los efectos cuánticos, que justifican, por ejemplo, el cambio de carácter metálico a un carácter semiconductor. Su principal ventaja radica en la capacidad de síntesis de diferentes nano-formas geométricas que nos permite individualizar sus propiedades ópticas, adaptándose a las diferentes modalidades de imagen utilizadas. Por otro lado, está ampliamente demostrada su seguridad y biocompatibilidad tras su administración en humanos. En tercer lugar, las GNP tienen capacidad de ser funcionalizadas con diferentes ligandos, lo que permite su uso para diagnóstico y tratamiento en tejidos específicos [(115)]. Las GNP tienen especial utilidad en la obtención de imagen fotoacústica dado su característica resonancia plasmónica de superficie (SPR) (Figura 8A). El efecto SPR se produce cuando las cargas libres en la superficie de las GNPs oscilan con el campo electromagnético, dando lugar a una absorción óptica que es varios órdenes de magnitud mayor que la de los colorantes orgánicos (Figura 8B) [(116)].



B

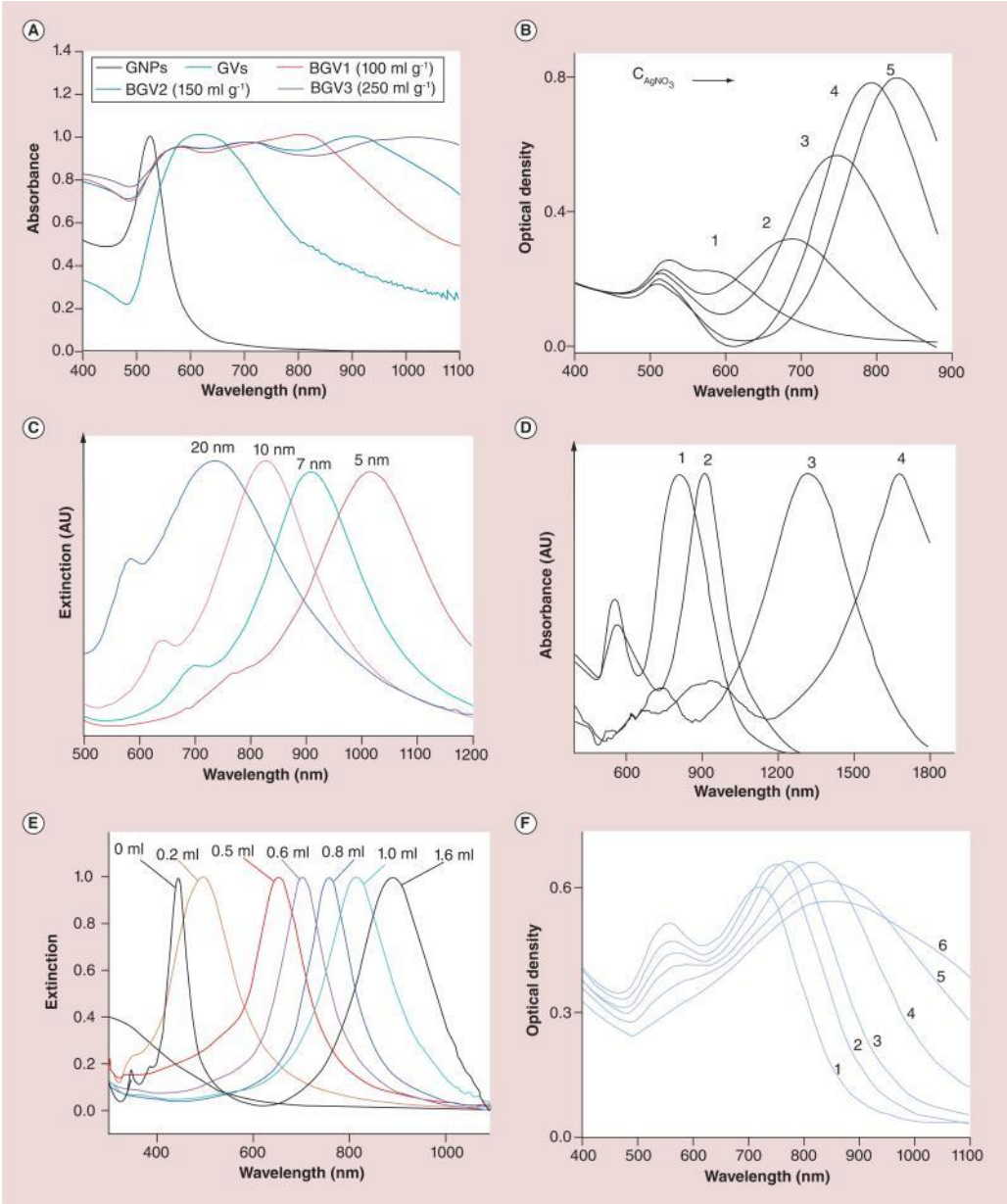


Figura 8. *A. Interacción de una radiación electromagnética con una nanoesfera de oro. Se induce un dipolo eléctrico que oscila en fase con el campo eléctrico de la luz entrante. B. Efecto de resonancia plasmónica de superficie (datos propios).*

Al cambiar el tamaño y la forma de la GNP, también cambia su frecuencia de resonancia, lo que permite aprovechar el rango de longitudes de onda de la "ventana biológica" (650-1100 nm), en la que se produce la menor atenuación de la sangre y los tejidos. Además de las nanoesferas de oro coloidales originales, muchos grupos de investigación han desarrollado nanoestructuras más complicadas, como nanorods de oro (GNRs), nanoshells de oro (GNShs), nanoprismas de oro (GNPrs), nanocajas de oro (GNCs),

nanoestrellas de oro (GNSts), nanovesículas de oro y dodecaedros rómbicos y bipirámides, presentando cada una de ellas diferentes características foto-ópticas (Tabla 3).

Tabla 3. Características foto-ópticas de las nanopartículas de oro

GNP	Tamaño (nm)	Longitud de onda de absorción (nm)	Coeficiente de extinción (M^{-1} cm^{-1})
Esferas	2 - 100	520 - 600	(3.61 ± 0.08) × 106 – (6.06 ± 0.03) × 109 (d = 4 - 40 nm)
Nanorods	2 - 10	650 - 1300	3.3 ± 0.3 × 109 (λ pico = 850 nm)
Nanoshells	50 - 500	700 - 200	8.3 × 109 (30.4 ± 4.4 nm = 7.8 ± 2.2 nm)
Nanoprismas	10 - 40 / 80 - 500	700 - 2000	–
Nanocages	20 - 500	600 - 1200	4.34 × 1010
Nanostrellas	Core de 20 - 60 con espículas de 10 - 30	650 - 900	–
Nanovesículas	200 - 300	650 - 000	–
ICG	< 2	618 - 668	0.8 × 105 – 1.8 × 105

Existe una experiencia limitada en el uso de GNP para el diagnóstico vascular con la OCT. Existe un trabajo previo en el que las GNSs endocitadas por macrófagos dentro de placas ateroscleróticas se diferenciaron de las partículas coloidales por medio de imágenes fotoacústicas espectroscópicas, lo que proporciona un método para la obtención de imágenes intravasculares de los macrófagos fagocíticamente activos dentro de las placas ateroscleróticas [(117)]. También se han explorado varias dianas moleculares inflamatorias mediante el uso de imágenes fotoacústicas basadas en GNP. El ICAM-1, presente en endotelio activado pudo ser diferenciado mediante el uso de GNR funcionalizados *in vitro* [(118)]. Posteriormente, estos resultados se ampliaron mediante la obtención de imágenes por fotoacústicas de GNRs similares conjugados con anti-VCAM-1 y GNShs dentro de la vena cava inferior de un ratón (119). Se ha probado la obtención de imágenes fotoacústicas *in vitro* utilizando GNRs con picos distintos a 715 y 800 nm conjugados con anticuerpos contra ICAM-1 y E-selectina (120).También se ha descrito que los GNRs sin funcionalización se concentran y marcan preferentemente las regiones ateroscleróticas vasculares y que los GNRs pueden ser detectados posteriormente utilizando imágenes combinadas de IVUS/IVPA, incluso en presencia de sangre luminal.

Debido a la tendencia de los GNR a extravasar en los lugares con endotelio disfuncional, las imágenes IVPA pueden utilizarse para identificar la localización de la inflamación aguda dentro de las placas ateroscleróticas [(121)].

1.3 MOTIVACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La enfermedad cardiaca aterosclerótica es un problema epidemiológico mundial que conlleva una reducción tanto de la esperanza como de la calidad de vida en la población. Existe un avance paulatino pero incompleto en la capacidad de detectar fenotipos de enfermedad aterosclerótica coronaria, con los métodos de diagnóstico por la imagen actuales, que conlleven mayor riesgo de progresión o de generar eventos aterotrombóticos responsables de la mayor parte de la morbilidad de la ateromatosis coronaria. La OCT es la técnica diagnóstica con mayor resolución espacial y ha demostrado capacidad de distinguir diferentes patrones de placas de riesgo, aunque con un valor predictivo moderado. El uso de nanopartículas que den señal lumínica con OCT, funcionalizadas con marcadores moleculares específicos para dianas ya descritas como asociadas a alto riesgo de inestabilización en estudios preclínicos, podría permitir un fenotipado más preciso de las características de mal pronóstico de la enfermedad coronaria. Para ello se sintetizarán y se validarán tanto *in vitro*, en condiciones de flujo arterial, nanocomponentes funcionalizados contra receptores de endotelio activado arterial que den señal de contraste en la imagen de OCT.

El objetivo general del proyecto es el desarrollo y valoración de nanopartículas funcionalizadas como un medio de contraste en conjunción con la OCT para permitir diagnóstico molecular *in vivo* en la placa de ateroma coronario.

Para su consecución, proponemos los siguientes objetivos secundarios:

1. Detección de las nanopartículas ópticas que aporten un nivel de contraste óptico a la imagen obtenida por OCT entre el espectro existente en función de sus diferentes tamaños, nanoestructura y resonancia.
2. Diseño y síntesis de nuevas nanoestructuras biocompatibles: NPs luminiscentes en las segunda y tercera ventana biológicas con alta penetración óptica en tejidos.
3. Modificación superficial de las nanoestructuras para dotarlas de altos tiempos de circulación en el torrente sanguíneo y garantizar su capacidad de reconocimiento molecular.
4. Detección de la posible toxicidad celular de las NPs seleccionadas.
5. Funcionalización de nanopartículas como marcadores de apoptosis, disfunción endotelial, neovascularización, inflamación y fibrosis en la placa de ateroma, que se puedan emplear junto con la OCT para diagnosticar el riesgo de la placa.

6. Caracterización de la captación y retención de nanopartículas en un modelo in vitro de endotelio arterial estático.
7. Caracterización de la captación y retención de nanopartículas en un modelo in vitro de endotelio arterial con flujo dinámico arterial.

1.3.1 Plan de trabajo

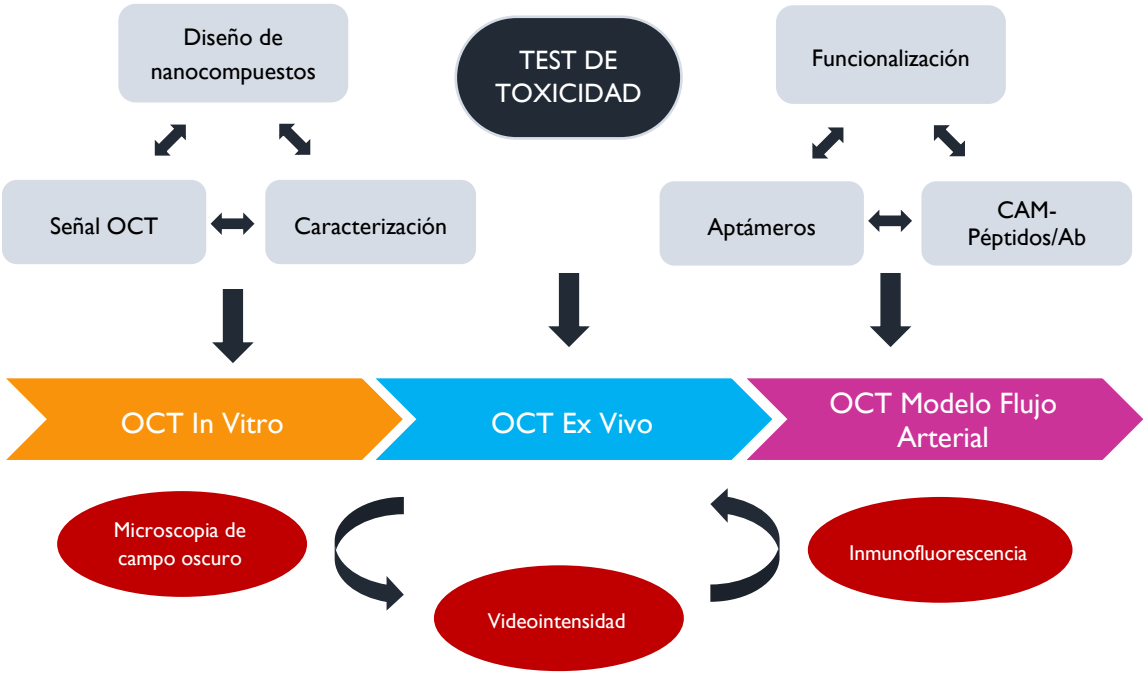


Figura 9. *Plan de trabajo*

Para el desarrollo de las diferentes etapas con el fin de conseguir los diferentes objetivos específicos se han desarrollado los paquetes de trabajo que se describen a continuación.

1.3.1.1 Paquete de Trabajo 1. Selección de nanopartículas con propiedades ópticas óptimas para su uso como medio de contraste por OCT.

- *Tarea 1.1. Prueba de concepto con diferentes nanopartículas.*

  Se realizará experimentación in vitro (en tubo de silicona de 3mm de diámetro, relleno en suero salino al 0,9%). Dentro de éste se insertará el catéter de OCT y se obtendrán diferentes loops de imágenes digitales tras la microinyección en su luz de diferentes nanopartículas (gold nanorods y gold nanoshells de diferentes resonancias). Se realizarán pruebas con diferentes concentraciones hasta localizar la concentración mínima eficaz para cada tipo de NPs ensayada. Las imágenes serán posteriormente analizadas mediante software específico para análisis de videointensidad (Image-J).

- *Tarea 1.2. Caracterización fisicoquímica y óptica de oNPs seleccionadas.*

  Se caracterizará las nanoestructuras que muestren una intensidad de scattering óptima resultantes del Paquete de Trabajo 1.1. Las técnicas a utilizar serán: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Dispersión dinámica de Luz (DLS). Mediante las medidas de TEM se obtendrá la morfología, tamaño y polidispersidad de las NPs sintetizadas. Se estudiarán sus propiedades luminiscentes en el rango 1200-1400 nm (tercera ventana biológica). Se estudiará la sensibilidad térmica de las oNPs, para lo cual, se realizará un estudio sistemático de las propiedades luminiscentes (dispersión espectral, polarización y tiempo de vida) en el rango de temperaturas 20-70°C. Se realizarán estudios comparativos de eficiencia cuántica de emisión mediante técnicas "pump and probe" de doble haz con el fin de determinar aquellas oNPs con mejores perspectivas de aplicación para bioimagen de OCT.

- *Tarea 1.3. Modificación superficial de las nanoestructuras.*

  Sobre las NPs seleccionadas tras los pasos previos se realizará una modificación superficial para dotarlas de altos tiempos de circulación en el torrente sanguíneo y capacidad de reconocimiento molecular, biocompatibilidad y baja citotoxicidad. Para este fin, utilizaremos ligandos poliméricos tipo PEG (polietilenglicol) funcionalizados con grupos funcionales tiolados o aminados capaces de anclarse a la superficie de las NPs, según la experiencia previa en esta técnica. Esta metodología se basa en el recubrimiento polimérico mediante el uso de derivados del copolímero anfífilico Poly (maleic anhydride) modificado con cadenas laterales de dodecylamine. Las cadenas laterales hidrofóbicas interaccionan con los surfactantes de la superficie de las NPs mientras que la cadena principal es hidrofílica debido a la presencia de grupos carboxilos. Este recubrimiento funciona a priori, independientemente del núcleo inorgánico, y permitirá controlar la disolución de iones tóxicos y por tanto la toxicidad de una forma crónica, así como su biofuncionalización.

1.3.1.2 Paquete de Trabajo 2. Biofuncionalización de las oNPs seleccionadas y modificadas para diagnóstico molecular.

- *Tarea 2.1: Selección de dianas y marcado con NPs seleccionadas y modificadas.*

  Alternativamente y a partir de la tecnología desarrollada en la tarea 1.3, basada en el recubrimiento polimérico con co-polímeros anfifílicos, se usarán los grupos carboxilos para que interaccionen con los grupos aminos de los péptidos y anticuerpos diana. La unión se confirmará ópticamente mediante microscopia de fluorescencia o por análisis hiperespectral así como por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Las posibles dianas de marcadores identificados y disponibles comercialmente son: a) Anexina 5: Es el ligando del fosfolípido fosfatidil serina que aparece en la membrana como un marcador de apoptosis. La

apoptosis en la placa debilita su estructura y favorece la rotura. b) Anticuerpos para VCAM y selectina P: La VCAM y la selectina P son proteínas de adhesión que se expresan en las células endoteliales durante la disfunción endotelial. La aparición de estas proteínas es uno de los marcadores tempranos del proceso ateroesclerótico, y favorece su evolución permitiendo la adhesión de células sanguíneas y su posterior infiltración en la pared vascular. c) Péptido RGD: Ligando de la integrina alfaV/beta3, que es un marcador de angiogénesis. El desarrollo de vasos neoformados en el interior de la placa es uno de los factores que contribuye a su progreso y se asocia con una mayor tendencia a la ruptura de la misma. d) Secuencia GGPRQITAG: Es un sustrato de las metaloproteasas de la matriz (MMP). Estos enzimas son producidos por los macrófagos y degradan la matriz extracelular, debilitando la placa y facilitando su ruptura. e) CNA35: Se liga a las fibras de colágeno y se utiliza como un marcador de fibrosis. La formación sobre la placa de una cubierta rica en colágeno se asocia con una menor frecuencia de rotura.

- *Tarea 2.2.- Confirmación in vitro de la capacidad de reconocimiento de las nanopartículas funcionalizadas.*

  Tras la funcionalización, la capacidad de interacción con las moléculas diana será estudiada in vitro mediante Resonancia de Plasmón Superficial (Anexina V-PS, anticuerpos-V-CAM y selectina-P). Se usarán líneas celulares con demostrada expresión de las moléculas dianas a reconocer por las NPs. La PS es un componente de la membrana celular que se encuentra mayoritariamente en el lado citosólico y solo aparece en el lado extracelular en caso de que la célula entre en proceso de apoptosis (muerte celular programada) para ser reconocida por los macrófagos encargados de eliminarlas. Para favorecer el reconocimiento se puede estimular la apoptosis (e.g. con camptothecin) o usar la línea celular J774A.1, que expresa la PS extracelularmente. Para confirmar el reconocimiento se usarán técnicas de microscopía confocal capaces de determinar la co.localización de las NPs con la membrana plasmática. Para ello, ambos sistemas tienen que presentar una señal de fluorescencia. Dado que las nOPs tienen de por sí luminiscencia, habría que marcar con fluoróforos específicos de membrana (e.g. cell mask de Life Technologies) las células. Se utilizarán Kits comerciales existentes para confirmar la eficiencia del reconocimiento.

- *Tarea 2.3. Confirmación in vitro de la capacidad de reconocimiento de las nanopartículas funcionalizadas mediante OCT.*

  Se utilizarán las líneas celulares del mayor espesor posible en cultivo (línea celular tumoral humana HeLa), tras marcado con las NPs funcionalizadas. Tras marcaje funcional y cultivo en placa, se realizará OCT para comprobar capacidad de visualización. Se utilizarán cultivos de la misma estirpe sin funcionalización con NPs como control. Se guardarán archivos digitales para su posterior análisis con software dedicado. Posteriormente, se comprobará la presencia de NPs en las células marcadas, su internalización y su localización intracelular se determinará

por técnicas de microscopía confocal y citometría de flujo. Para ello se marcarán con fluorescencia tanto las células y sus orgánulos como las NPs. Esto permitirá los estudios de colocalización. Los posibles cambios de la química de superficie de las NPs en los medios biológicos (e.g. la formación de una corona de proteínas, la aglomeración en medios biológicos caracterizados por una elevada fuerza iónica y viscosidad, etc.), así como en el entorno celular o del plasma sanguíneo se podrán seguir de forma dinámica y a nivel de partículas individuales.

1.3.1.3 Paquete de Trabajo 3. Detección de la toxicidad celular de las oNPs seleccionadas y modificadas.

- *Tarea 3.1. Evaluación de la citotoxicidad en líneas celulares.*

  Se evaluará la toxicidad de aquellas NPs y nanoestructuras desarrolladas el Paquete de Trabajo 1 que hayan mostrado resultados satisfactorios. Utilizaremos la línea celular tumoral humana HeLa, CRC, LS-174T. Se analizará la toxicidad de los diferentes nanomateriales (funcionalizados o no), así como ensayos de cinética y dosis-respuesta. Establecimiento de posibles fuentes de toxicidad extra- e intracelular tras una exposición celular de los diferentes nanomateriales. A nivel de la membrana plasmática se usarán por exclusión de fluoróforos impermeables tipo azul de tripán, capaz de discriminar células apotóticas de las necróticas, así como la detección de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio extracelular. A nivel de mitocondria mediante ensayos tipo MTT o Resazurin. A través del reconocimiento de marcadores de muerte celular tales como la Anexina. Estos ensayos se realizarán en las células mencionadas anteriormente. La viabilidad y la relación dosis-respuesta se establecerá por técnicas de espectrometría de fluorescencia, por imagen confocal o análisis de citometría de flujo.

- *Tarea 3.2. Evaluación de la hematotoxicidad.*

  Con el objetivo de conocer si las diferentes nanoestructuras que no presentan toxicidad celular *in vitro*, presentan o no un efecto negativo (hemólisis) sobre los eritrocitos. Mediante la incubación de estas con eritrocitos murinos y la observación del porcentaje de hidrólisis mediante espectroscopia de absorción según la literatura. De forma adicional, la posible generación de radicales y especies reactivas de oxígeno (ROS), altamente nocivos a nivel celular, se utilizará una combinación de RPE y trampas de espín basadas en moléculas pequeñas adaptadas al uso en sangre, modelos celulares y en células vivas, según técnicas descritas en la literatura. Radicales y ROS son moléculas transitorias y normalmente por eso no detectables en muestras biológicas con espectroscopia. Usando una sonda (trampa de espín) se pueden observar estas moléculas mediante EPR. La trampa estabiliza a la especie y por su cambio de señal se puede

analizar y cuantificar la producción de los radicales y ROS en la muestra causados por las NPs.

1.3.1.4 Paquete de Trabajo 4. Detección de la capacidad de las oNPs seleccionadas y modificadas para la unión específica a marcadores de inflamación de superficie endotelial in vitro en condiciones estáticas, in vitro en condiciones dinámicas y en modelo animal *ex vivo*.

- *Tarea 4.1. Selección de dianas moleculares y marcado con nanocompuestos seleccionados y modificados.*

  En esta tarea estudiaremos la idoneidad de los nanocompuestos combinados basados en los NP descritos anteriormente (responsables del contraste OCT) y las NPs luminiscentes unidas (nanodots de Ag2S y puntos cuánticos de PbS, responsables de la obtención de imágenes fluorescentes en NIR). Estas nanopartículas se unirán entre sí a través de una "reacción de foto-clic inversa" (descomposición de un tetrazol) en su superficie funcionalizada, lo que puede ocurrir como un paso de funcionalización ortogonal sin interferir con la funcionalización biológica con ligandos y anticuerpos para los marcadores de inflamación arriba regulados en el ateroma (CAMS, por ejemplo, anti ICAM-1, anti VCAM-1, anti E-Selectina). Por lo tanto, los nanocompuestos se obtendrán comercialmente o de grupos colaboradores y luego se funcionalizarán en la superficie con polietilenglicoles (PEG) adecuados con funcionalidades duales (tiol para la unión a la superficie de la nanopartícula y carboxilatos para la funcionalización posterior). En un segundo paso, algunos carboxilatos se harán reaccionar con tetrazoles, seguido de la unión de las NPs luminiscentes al GNS mediante fotoquímica. Por último, de forma ortogonal, los ligandos y anticuerpos seleccionados se unirán a la superficie de la nanoconstrucción combinada mediante la química peptídica clásica (formación de enlaces amid mediante ésteres activos).

- *Tarea 4.2. Confirmación in vitro de la capacidad de reconocimiento de los nanocompuestos funcionalizados en condiciones estáticas y de flujo arterial.*

  En esta tarea, los nanocompuestos funcionalizados se caracterizarán primero morfológicamente (TEM, DLS, análisis elemental) y espectroscópicamente (absorbancia, fluorescencia, dispersión, FTIR). Una vez obtenida esa información, se seleccionarán los mejores compuestos y se someterán a experimentos de microscopía en placas de pocillos que contengan CAM para confirmar su capacidad de unión. A continuación, se realizarán experimentos en condiciones de flujo en una cámara de flujo laminar preparada con las proteínas objetivo mencionadas. Para ello, se probarán velocidades de flujo constantes, pero, lo que es más importante, estos experimentos también se llevarán a cabo en condiciones de flujo arterial (velocidad y presión variables) mediante la utilización de una bomba peristáltica especializada.

- *Tarea 4.3. Confirmación in vitro de la capacidad de reconocimiento de los nanocompuestos funcionalizados mediante OCT.*

  La capacidad de reconocimiento tras la funcionalización de la superficie, también se evaluará mediante experimentos de OCT en los que se incubarán células endoteliales activadas por TNFα con los nanocompuestos funcionalizados seleccionados dentro de un tubo. Se estudiará el efecto de la unión a la superficie de la célula en la intensidad de la OCT obtenida cuando se coloca el catéter dentro del tubo, comparando el contraste de la OCT obtenido para las células libres, las células activadas, las células incubadas y los nanocompuestos libres.

- *Tarea 4.4. Confirmación in vitro de la capacidad de reconocimiento de los nanocompuestos funcionalizados mediante OCT.*

  Los estudios se llevarán a cabo ex vivo con la aorta de rata incubada para determinar las condiciones de trabajo. El modelo ex vivo permite trabajar en condiciones más controladas, sin la interferencia de otros factores como la eliminación o captación de nanopartículas por otros tejidos, y con un menor gasto de fNC en cada experimento. Tras sacrificar a los animales de control, se disecará la aorta torácica desde la válvula aórtica hasta el diafragma, y se lavará con solución salina para eliminar los restos de sangre. Se ligarán las ramas laterales y el extremo distal, y se introducirá una suspensión de nanocompuestos funcionalizados a través de la luz de la arteria, tras lo cual se ligará el extremo proximal para mantener la suspensión en su interior. Se obtendrán imágenes de OCT antes de la administración de fNC y después del lavado intrarterial con solución salina a los 5, 10 y 20 minutos y después de la administración de fNC. El mismo procedimiento se realizará en aortas previamente cultivadas en medio con 100 ng/TNF-α para inducir condiciones inflamatorias. Ambos segmentos se incubarán 20 h a 37°C y se sumergirán en un baño salino a 37°C.

2 CAPÍTULO 2. EN BUSCA DE LA SEÑAL POR OCT

2.1 CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE EMISIÓN LÁSER DEL EQUIPO DE OCT CLÍNICO

2.1.1 Motivación y objetivos

De cara a seleccionar los nanocompuestos con potencial para actuar como marcadores lumínicos en la imagen de OCT, fue necesario determinar el espectro lumínico de emisión y recepción en el que opera el dispositivo. No fue posible obtener esta información a través de la empresa comercializadora, por lo que se diseñó este experimento para su caracterización. Se define la ventana biológica como el rango de longitudes de onda de 650 a 1350 nm donde la luz tiene su máxima profundidad de penetración en los tejidos. Dentro de la ventana biológica, la dispersión es la interacción luz-tejido más dominante, por lo que la luz emitida se difunde en el tejido. La dispersión aumenta con la distancia recorrida por los fotones dentro del tejido, por lo que la probabilidad de absorción de los fotones también aumenta. Dado que la dispersión depende poco de la longitud de onda, la ventana biológica está limitada principalmente por la absorción de luz de la sangre a longitudes de onda cortas y del agua a longitudes de onda largas. La ventana del NIR que se encuentra entre 1000-1350nm, se conoce como segunda ventana biológica, y, es una región óptica muy interesante para la obtención de imágenes biomédicas ya que presenta una absorción óptica menor, dispersión de sustratos biológicos con mínima autofluerescencia tisular y alto contraste.

2.1.2 Material y métodos

Se utilizó un sistema de OCT de uso clínico habitual (catéter Dragonfly™ OPTIS™, Abbott, MA, USA). Se introdujo el catéter espectrofotómetro y, se puso en marcha el dispositivo de obtención de imágenes registrando el espectro lumínico en el que emite el catéter de tomografía FD (Figura 10a).

2.1.3 Resultados y conclusiones

El equipo de uso clínico para la obtención de imagen por FD-OCT estudiado, presenta un consta de dos líneas, una a 1320 nm y otra a unos 650 nm (Figura 10b). Esta segunda línea se debe a que el catéter OCT incorpora un marcador lumínico láser visible (rojo) que es utilizado para comprobar si el catéter está operativo previo a su introducción en el paciente. En conclusión, el catéter de OCT emite un espectro de 1320nm para la obtención de imágenes. Los nanocompuestos que debemos seleccionar deben tener un máximo backscattering lumínico a esta longitud de onda.

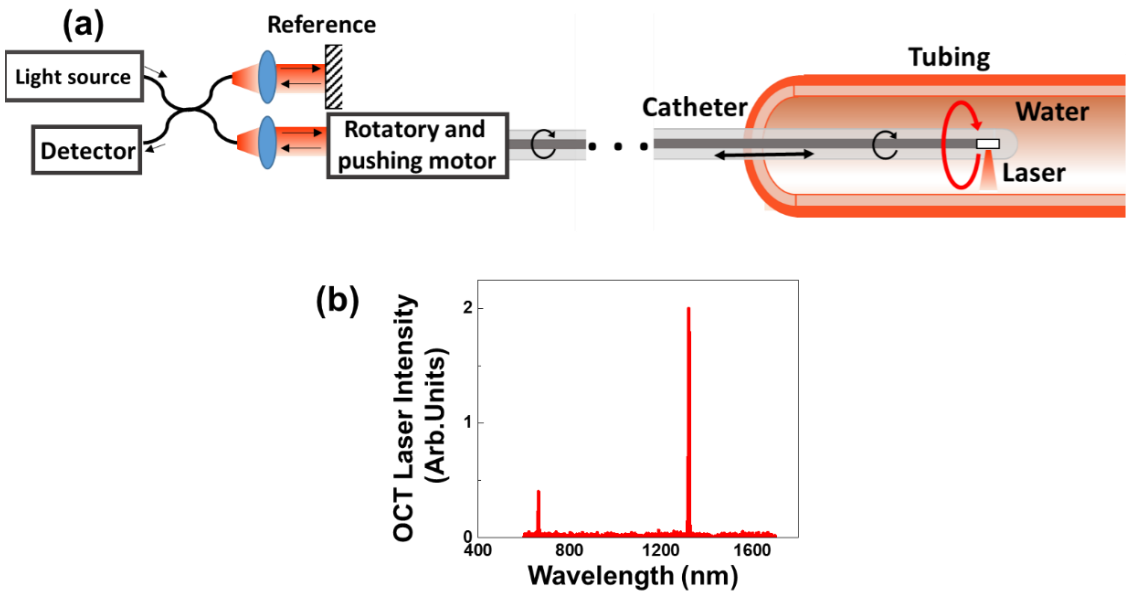


Figura 10. *(a) Representación esquemática de los componentes del catéter de OCT y del experimento con fotoespectrometría. (b) Espectro láser del equipo clínico de OCT.*

2.2 SELECCIÓN DE NANOCOMPUESTOS PARA LA OBTENCIÓN DE UNA SEÑAL LUMÍNICA ÓPTIMA CON OCT [(122)]

2.2.1 Motivación y objetivos

Entre los diferentes nanocompuestos disponibles, las nanopartículas de oro (GNP) parecen los candidatos ideales para la obtención de señal lumínica hiperintensa por OCT. Debido a las ventajas descritas anteriormente, las GNP constituyen potenciales agentes de contraste para la obtención de imágenes OCT, siempre que su SPR se asigne en la segunda ventana biológica (1000-1350 nm) (IIBW). La dependencia de la geometría en la eficiencia de dispersión lumínica de las GNP se ha determinado experimentalmente a 808 nm, ya que esta es la longitud de onda de trabajo de los sistemas OCT para oftalmología [(123)]. Existen numerosos modelos de predicción sobre la respuesta óptica de diferentes GNPs en el II-BW. Sin embargo, aún no se ha demostrado una validación experimental de la dependencia de la longitud de onda de las eficiencias de dispersión y absorción de las GNPs en la IIBW. Proporcionar estos datos experimentales es crucial para la validación funcional de las GNPs como agentes de contraste para la OCT. Además, ayudaría a predecir el calentamiento inducido ópticamente de las nanopartículas de oro, lo que es de especial relevancia para evaluar el calentamiento intrínseco inducido en las nanopartículas de oro.

En este grupo de experimentos, hemos determinado experimentalmente las eficiencias de dispersión y absorción de diferentes GNPs con su SPR extendiéndose (total o

parcialmente) a través de los I y II-BWs. Hemos determinado experimentalmente la eficiencia de dispersión de tres tipos de GNPs [nanorods de oro (GNR), nanoshells de oro (GNS) y nanostars de oro (GNSTs)] que muestran SPR con una extinción significativa en torno a 1,3 μm (la longitud de onda de funcionamiento del dispositivo clínico de OCT).

2.2.2 Material y Métodos

Mediante el método fototérmico se ha dilucidado la dependencia de la longitud de onda en la eficiencia de dispersión midiéndola a 808 nm, 980 nm y 1280 nm. La eficiencia de dispersión determinada por el método fototérmico ha sido corroborada por la combinación de OCT, microscopía infrarroja de campo oscuro (IR-DFM) y espectroscopia infrarroja OA (IR-OAS). Se ha determinado la morfología óptima de las GNP para la mejora del contraste en la OCT y se ha evidenciado la importancia de la dependencia espectral de la eficiencia de la dispersión infrarroja.

Las "gold nanorods" o GNR, son nanopartículas de estructura geométrica cilínidrica. Se utilizaron GNR comerciales (Nanopartz, Inc). Para las mediciones de extinción, estas nanopartículas [recubiertas de polietilenglicol (PEG) para la dispersabilidad del agua] se diluyeron en agua desionizada (DI) de 18 MEG, con una concentración en masa de 0,05 mg/ml. Las NP tipo "gold nano shell" o GNS consisten en un núcleo dieléctrico (sílice) rodeado por una fina capa de oro, con un diámetro del núcleo de 16 nm y un diámetro medio total de 220±23 nm. Estas nanopartículas se recubrieron con polivinilpirrolidona (PVP) (40 kDa) para su dispersión en agua. Para las mediciones de extinción, se diluyeron en agua Milli-Q, con una concentración de masa (0,053 mg/ml), es decir, similar a la utilizada para los GNR. Las gold nanostars o GNS se sintetizaron específicamente para este trabajo siguiendo un protocolo de crecimiento mediado por semillas, tal y como informaron previamente Yuan et al [(124)]. Consisten en nanoesferas de oro sólidas con un diámetro medio de 28±4 nm junto con diferentes lóbulos (en promedio 14) con una longitud media de 14±3 nm. (Figura 10 a).

Para los tres grupos de GNP se realizaron las siguientes determinaciones:

- Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM)
- Experimentos de extinción: los espectros de extinción a temperatura ambiente de las GNP se midieron con un espectrofotómetro UV/VIS/infrarrojo cercano (NIR) (Perkin Elmer Lambda1050).
- Experimentos de carga térmica: para la determinación de las eficiencias de absorción y dispersión, se registraron los ciclos de calentamiento y enfriamiento correspondientes a una suspensión coloidal de GNP sometida a un rayo láser modulado. Las imágenes térmicas de las suspensiones coloidales se adquirieron utilizando una cámara termográfica (FLIR E40bx). Los láseres modulados en el tiempo que se utilizaron fueron diodos láser de fibra acoplada que operaban a 808, 980 y 1280 nm

- Experimento optoacústico: las señales optoacústicas se obtuvieron utilizando un láser Nd:YAG acoplado a fibra que funcionaba a 1064 nm y proporcionaba pulsos de 8 ns de anchura como fuente de excitación. El láser tenía una velocidad de repetición de 1 kHz y una energía de pulso de 10,5μJ, lo que suponía una potencia media de 10,5 mW. Los GNP se colocaron en una cubeta con un grosor de 4 mm. Para realizar mediciones comparables, la concentración de las GNP en las soluciones se ajustó para proporcionar una densidad óptica (DO) de 10 a la longitud de onda del láser (1064 nm). Las señales optoacústicas generadas en la muestra fueron detectadas por un transductor de ultrasonidos fijado mecánicamente a la cubeta. La señal generada por el transductor de ultrasonidos se envió a un preamplificador de 40 dB y fue recogida por un osciloscopio digital.
- Microscopía Óptica de Campo Oscuro: se utilizó un microscopio óptico convencional equipado con un condensador de campo oscuro (NA 0,80-0,95). La imagen de dispersión frontal se recogió utilizando un objetivo de microscopio de 50× con una apertura numérica de 0,35. La iluminación se realizó empleando una fuente blanca de banda ancha. Las imágenes de campo oscuro se tomaron con una cámara de infrarrojos XEVA-320. Esta cámara se basa en una matriz de InGaAs2D enfriada a 0◦C que hace posible la detección de imágenes de fluorescencia en el rango nmspectral de 900-1700. Se colocó una combinación de filtros infrarrojos de paso largo a la entrada de la cámara infrarroja, de modo que sólo se registrara la radiación dispersa con una longitud de onda de 1300±50 nm.
- Experimentos de señal con catéter de OCT de uso clínico: se utilizó un equipo con software Illumien (Abbott) y un catéter de uso clínico habitual Dragonfly™ OPTIS™, Abbott, MA, USA) tomando imágenes en *loops* estáticos en la propia consola clínica. Para ello, inyectamos una solución coloidal de cada tipo de GNP (GNSs: 0,053 mg/ml, GNRs: 0,05 mg/ml, GNSTs: 0,043 mg/ml) en un tubo de silicona de 3,0mm de diámetro. Una vez que las soluciones acuosas de GNPs están dentro del tubo, el catéter de OCT se introduce en la solución, permitiendo la detección de los GNPs individuales por medio de su eficiencia de retrodispersión.

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Experimentos de extinción y TEMS

La Figura 11a muestra el aspecto de las tres GNP estudiadas en microscopía TEMS. Las GNSs presentan un diámetro del núcleo de 16 nm y un diámetro medio total de 220±23 nm. Las GNRs muestran un diámetro de 11±2 nm y una longitud de 90±20 nm. Por último, las GNSTs presentan una superficie irregular con un diámetro medio de 28±4 nm junto con diferentes lóbulos (media=14) con una longitud media de 14±3 nm, siendo las GNP de menor tamaño entre las estudiadas.

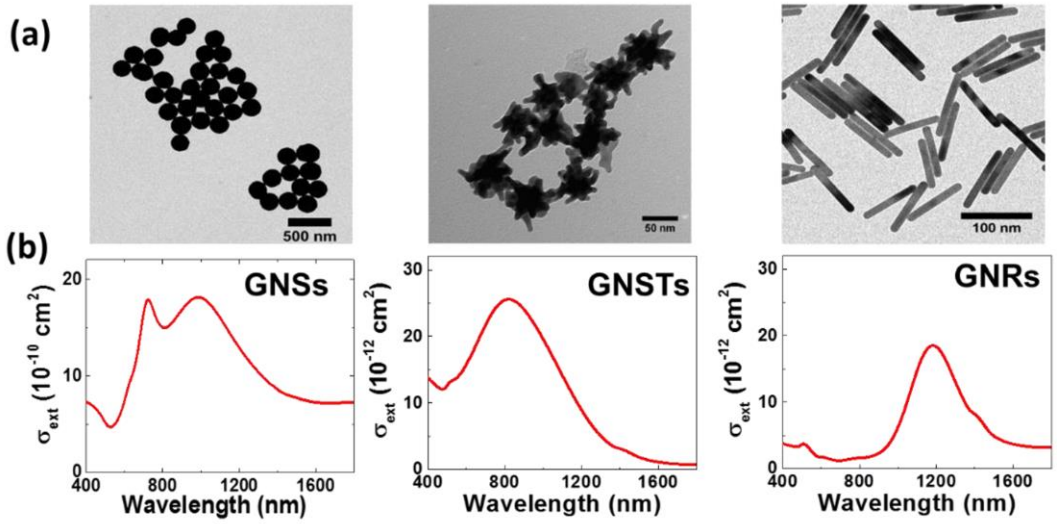


Figura 11. *(a) imágenes de microscopía electrónica de las GNP analizadas. (b) datos experimentales de los espectros de extinción de las GNP estudiadas.*

La Figura 11 b incluye los espectros transversales de extinción de estas tres estructuras. En el caso de los GNS, el espectro de extinción está constituido por una banda muy ancha que resulta del solapamiento espectral entre dos bandas a 730 nm y 1040 nm. Los GNS muestran el espectro de extinción más amplio (de unos 600 nm a unos 1600 nm), a la vez que proporcionan los mayores valores de sección transversal de extinción (unos dos órdenes de magnitud mayores que los de los GNR y los GNST). En particular, su elevada sección transversal de extinción a 1280 nm (1,1×10-9cm2) los hace especialmente adecuados para la OCT. La sección transversal de extinción de las SPR está constituida por una banda plasmónica que alcanza un máximo de unos 800 nm y que se extiende en la región espectral del infrarrojo desde unos 500 nm hasta unos 1600 nm. Estas SPR son resonancias dipolares eléctricas que se derivan de las oscilaciones colectivas de los electrones de Au. Como tales, son sensibles a la forma de la nanopartícula (excepto en el caso de las nanopartículas muy pequeñas), especialmente a lo largo de la dirección de polarización del campo eléctrico de la luz incidente. Finalmente, en los GNRs, el pico de los coeficientes de extinción se sitúa en torno a los 1200 nm (plasmón superficial longitudinal) y se extiende desde unos 900 nm hasta unos 1600 nm, incluyendo las longitudes de onda infrarrojas relevantes que se investigaron en este trabajo; 808 nm, 980 nm y 1280 nm (la longitud de onda de trabajo del OCT).

2.2.3.2 Experimentos de carga térmica

La figura 12 muestra los resultados de aumento de temperatura tras excitación de NP a 1280nm.

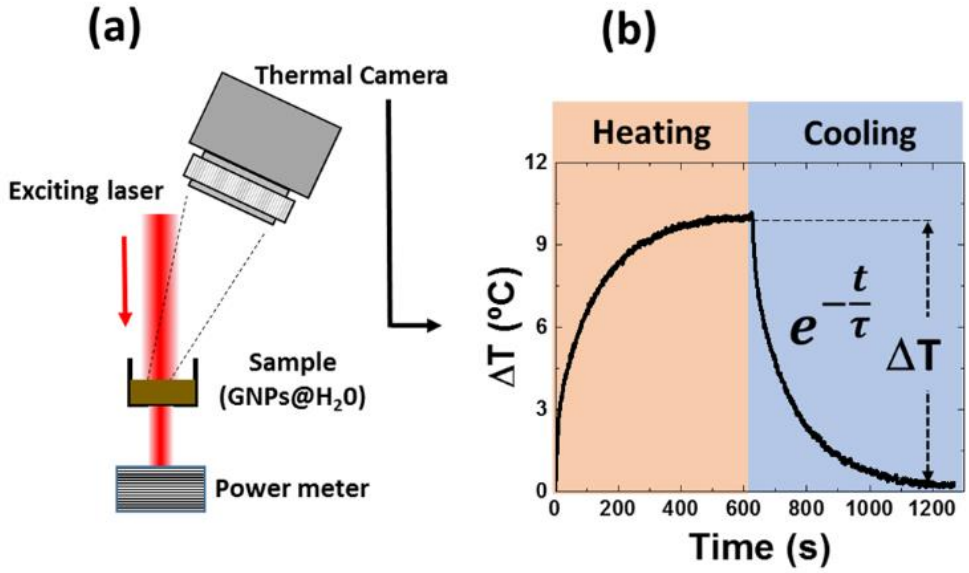


Figura 12. *(a) Diagrama esquemático del montaje experimental utilizado para la determinación de la eficiencia de dispersión de los GNP bajo excitación óptica en el II-BW. (b) Curva representativa de calentamiento y enfriamiento obtenida de una solución acuosa de GNRs bajo excitación óptica de 1280 nm.*

2.2.3.3 Experimentos de dispersión en infrarrojo

Para conocer la eficacia real de la dispersión de las GNP en las longitudes de onda largas, donde los datos calculados y medidos muestran la mayor discrepancia, llevamos a cabo dos conjuntos de mediciones de imágenes para determinar las capacidades de dispersión infrarroja de los tres tipos de GNP mediante IR-DFM y mediante el estudio de la señal en OCT.

2.2.3.3.1 Microscopía de campo oscuro por infrarrojos (IR-DFM)

Para los experimentos de IR-DFM, los GNPs se depositaron en el portaobjetos de microscopio. Los portaobjetos que contenían las GNPs se visualizaron utilizando el IR-DFM, que es capaz de visualizar GNPs individuales utilizando sus capacidades de dispersión a 1300±50 nm. La Figura 13 muestra de manera esquemática el diseño del experimento y la Figura 14 los resultados e imágenes obtenidas.

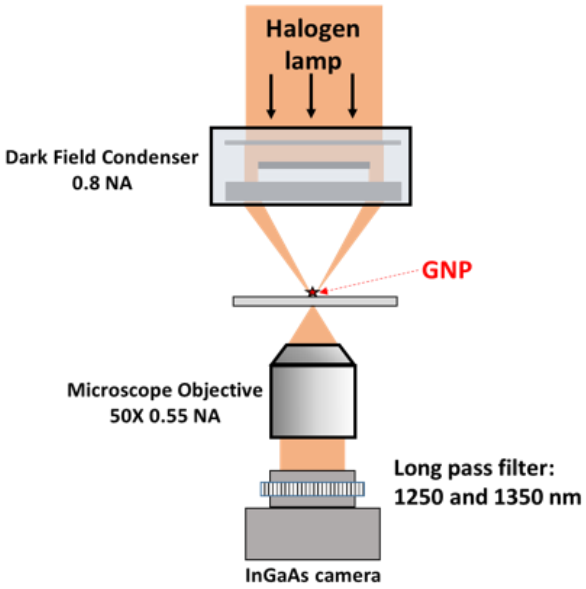


Figura 13. *Diseño del experimento.*

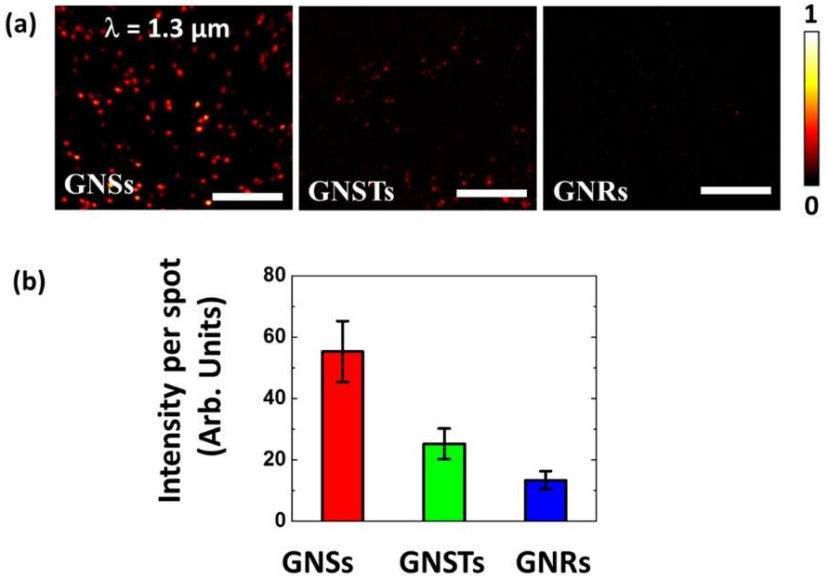


Figura 14. *(a) Imágenes infrarrojas de campo oscuro obtenidas a 1300 nm utilizando GNSs, GNRs y GNSTs como potenciales agentes de contraste. La barra de escala es de 20 µm en todos los casos. (b) Intensidad media por nanopartícula generada por los GNSs, GNRs y GNSTs obtenida a partir del análisis estadístico de las imágenes incluidas en la columna de la izquierda.*

Hasta donde sabemos, estas son las primeras imágenes IR-DFM de GNPs en el II-BW. Como se puede observar, todos los GNPs estudiados pueden ser detectados por IR-DFM, revelando una sección transversal de dispersión no evanescente en los tres casos.

El mayor contraste IR-DFM lo proporcionan los GNS, siendo significativamente mayor que el proporcionado por los GNST y los GNR. Estos datos experimentales confirman que los GNS proporcionan la mayor sección transversal de dispersión infrarroja entre las geometrías estudiadas.

2.2.3.3.2 Experimentos con el equipo de OCT clínica.

Con objeto de investigar la capacidad de señal lumínica por dispersión de los diferentes GNP en torno a 1300nm se estudió la señal lumínica tras adquisición de imágenes con el dispositivo de OCT. En este caso, inyectamos una solución coloidal de cada tipo de GNP, basada en la concentración de mayor rendimiento derivada de los estudios en extinción de infrarrojo previamente descritos (GNSs: 0,053 mg/ml, GNRs: 0,05 mg/ml, GNSTs: 0,043 mg/ml) en un tubo de silicona de 3mm de diámetro. La Figura 15(a) muestra las imágenes de sección transversal de OCT para las soluciones coloidales que contienen las tres GNP investigadas. Una vez más, las tres geometrías estudiadas aquí produjeron una señal OCT significativa. Esto revela de nuevo una sección transversal de dispersión infrarroja no evanescente en torno a 1,3μm.

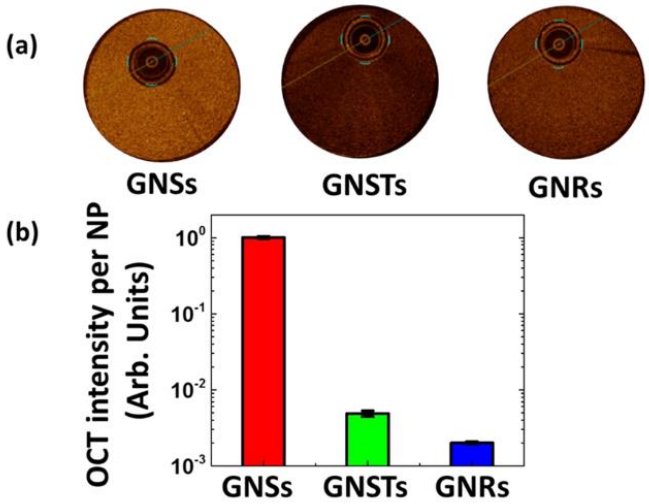


Figura 15. *(a) Imágenes transversales de OCT de las soluciones coloidales que contienen GNSs, GNSTs y GNRs. (b) Intensidades OCT de GNSs, GNSTs y GNRs individuales obtenidas a partir del análisis estadístico de las figuras incluidas en la columna de la izquierda.*

2.2.4 Conclusiones y discusión

Hemos determinado experimentalmente la eficacia de la dispersión infrarroja y la sección transversal de dispersión de los GNP con tres geometrías diferentes: nanorods,

nanoshells y nanostars. Se han llevado a cabo experimentos de carga térmica de múltiples longitudes de onda para determinar experimentalmente la dependencia espectral de la eficiencia de dispersión de estas tres nanopartículas. Tanto los GNS como los GNST muestran que las eficiencias de dispersión dependen en gran medida de la longitud de onda, lo que pone de manifiesto la importancia de tener en cuenta el rango espectral de funcionamiento a la hora de elegir la geometría adecuada para cada aplicación concreta de obtención de imágenes. También se ha comprobado experimentalmente que, en todo el rango espectral del infrarrojo investigado aquí (800-1400 nm), los GNS muestran la mayor eficiencia de dispersión y sección transversal. Esto explica su mejor rendimiento como sondas de imagen cardiovascular. El rendimiento superior de los GNS como unidades de dispersión en el infrarrojo ha sido confirmado por medio de imágenes de campo oscuro en el infrarrojo, tomografía de coherencia óptica y experimentos optoacústicos. En todos los casos, los datos experimentales confirman las conclusiones extraídas de los experimentos fototérmicos y revelan el carácter multifuncional de estos GNP que son capaces de una eficiente dispersión y generación acústica bajo excitación óptica infrarroja. Es importante destacar que los GNS utilizadas aquí tienen un tamaño significativamente mayor que los GNR y GNST investigadas. Este hecho podría explicar en parte la mayor eficiencia de dispersión de los GNSs. De hecho, Jainet al. realizaron una investigación sistemática de cómo la geometría y el tamaño de los GNS y los GNR afectan a sus propiedades espectrales mediante simulaciones numéricas [(125)]. Llegaron a la conclusión de que los GNS deben ser mucho más grandes que los GNR para poder ajustar su SPR al infrarrojo cercano. También propusieron que, para una relación núcleo/total determinada (0,85), la eficiencia de dispersión de los GNS debería disminuir al reducir el radio total de la nanoesfera. De hecho, sería muy interesante comprobar esta predicción mediante mediciones directas de la eficiencia de dispersión, como hemos hecho en este trabajo.

En resumen, los resultados mostrados en este trabajo constituyen el primer estudio experimental de las propiedades de dispersión infrarroja de las nanopartículas plasmónicas y son el primer paso hacia una comprensión completa de sus propiedades ópticas infrarrojas. Esto es, a su vez, esencial si han de utilizarse como agentes de contraste cardiovascular que proporcionen información precisa. No obstante, la alta sensibilidad de la OCT, que ha demostrado detectar incluso nannopartícula aisladas (de unos 5 nm), indica que el las GNSs presentan potencial en su uso como agente de contraste cardiovascular.

2.3 APLICACIÓN POTENCIAL DE LOS SISTEMAS DE OCT PARA LA DETECCIÓN INTRAVASCULAR DE GNP INDIVIDUALES TANTO EN CONDICIONES EN CONDICIONES ESTÁTICAS Y DINÁMICAS *(126)*

2.3.1 Motivación y objetivos

La gran sección transversal de dispersión de excitación plasmónica de algunas GNP los convierte en excelentes candidatos para la obtención de imágenes OCT de alto contraste. La geometría de los GNP y, por tanto, sus propiedades espectrales, desempeña un papel crucial en esta aplicación. En este trabajo, hemos llevado a cabo una investigación sistemática sobre el uso potencial de los GNP previamente estudiados y seleccionados como de mayor potencial en base a sus propiedades tanto teóricas como derivadas de los resultados experimentales previamente expuestos, como agentes de contraste para los sistemas de OCT clínicos basados en la longitud de onda de 1,3 μm para la obtención de imágenes intravasculares. La importancia del solapamiento espectral entre el láser de la OCT y los espectros de extinción de los GNP se investigó mediante la realización de experimentos con GNRs y GNSs que muestran λSPR desde 800 nm hasta 1300 nm. Además, se ha evaluado la relevancia de la sección transversal de retrodispersión en la longitud de onda de funcionamiento del OCT para la mejora de la señal del OCT para los GNP. El objetivo de este grupo de experimentos es identificar las GNPs más adecuadas para la obtención de señal lumínica intravascular por OCT. Además, se ha explorado la aplicación potencial de los sistemas clínicos de OCT para la detección intravascular de las GNP individuales tanto en condiciones estáticas como dinámicas a diferentes flujos.

2.3.2 Material y Métodos

Basados en cálculos teóricos, así como en los resultados obtenidos de los experimentos previos, decidimos estudiar específicamente dos tipos de nanopartículas: GNR y GNS. Un total de seis GNP diferentes fueron estudiadas; cuatro GNR con longitudes de onda de resonancia plasmónica nominal a 800, 1064, 1200 y 1300 nm y dos GNS con resonancias a 856 y 986 nm. Siguiendo una estructura experimental similar a las expuesta en el experimento previo, se obtuvieron para cada una de ellas: imagen en TEMS, experimentos de extinción y análisis de videointensidad de señal en la imagen de OCT clínica a diferentes concentraciones y tanto en condiciones estáticas como de flujo. En la Figura 16 se muestra la representación esquemática de la metodología para la adquisición de imágenes de OCT.

Para este grupo de experimentos, el catéter OCT se introduce en un tubo de plástico de 3 y 3,6 mm de de diámetro interno y externo, respectivamente. Las GNP se inyectaron en la proximidad del catéter OCT utilizando una microaguja. Se introdujo un volumen de 5 µL de cada concentración y tipo de GNPs en solución salina isotónica. Se utilizó una variedad de soluciones que contenían diferentes concentraciones de GNPs. Después de la inyección se realizaron tres tipos diferentes de experimentos para la visualización de las GNP.

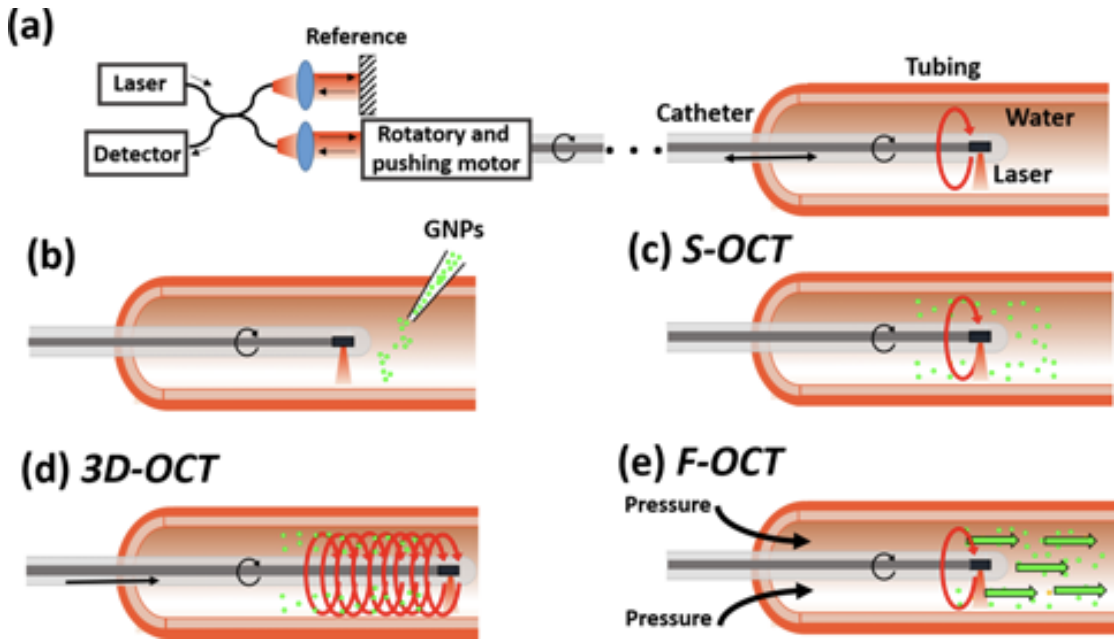


Figura 16. *Representación esquemática de: (a) esquema de losdispositivos que constituyen el catéter de OCT intravascular utilizado en este trabajo. (b) El procedimiento para la inyección de las GNPs en el sistema para visualización de OCT mediante la inyección mediante microaguja de las diferentes diluciones de GNP dentro del tubo de silicona relleno de agua destilada. (c) La disposición para las "mediciones estáticas", en la que las imágenes de OCT se obtienen tanto con la solución de GNPs como con el catéter en condiciones estáticas. (d) El procedimiento seguido para la adquisición de imágenes OCT tridimensionales; el catéter OCT se mueve mientras la solución de GNPs permanece en condiciones estáticas. (e) El procedimiento para la adquisición de imágenes OCT de las GNPs en condiciones de flujo no controlado; el catéter OCT se mantiene en una posición fija mientras la solución que contiene las GNPs es empujada mediante un sistema de presión hidrostática.*

Después de la inyección se realizaron tres tipos diferentes de experimentos para la visualización de las GNPs, dibujados esquemáticamente en las Figuras 16 (c-e).

2.3.2.1 Experimentos de imagen OCT estática (S-OCT) y determinación de la capacidad de visualización de GNP individuales.

Para evaluar el aumento de contraste producido por las GNP, se obtuvieron imágenes estáticas en las que el catéter OCT permanece en la misma posición axial mientras se realizan imágenes transversales del tubo en ausencia de cualquier flujo. El límite de detección del sistema de OCT para cada tipo de GNPs se investigó sistemáticamente inyectando soluciones con diferentes concentraciones de las GNPs que presentaran (desde 5 - 10-2 mg/mL hasta 5 - 10-6 mg/mL).

2.3.2.2 Imagen tridimensional de las GNP (3D-OCT)

La aplicación potencial de la OCT clínica para la localización tridimensional real de las GNP se demostró utilizando la opción de obtención de imágenes pull-back del sistema OCT clínico. En este caso, el fluido dentro del tubo se configuró para que estuviera en condiciones estáticas (no se aplicó presión en ningún extremo del tubo). A continuación, se grabó una secuencia de imágenes OCT durante el pull-back del catéter OCT a lo largo de un recorrido de 50 mm. El análisis posterior de la secuencia de imágenes se llevó a cabo mediante el software Image J, lo que permitió una reconstrucción tridimensional de la distribución de las GNPs a lo largo del tubo. Las imágenes obtenidas se utilizaron para estimar la densidad de las GNP (número de partículas por unidad de volumen).

2.3.2.3 Imágenes OCT de GNPs en flujo (F-OCT)

Para demostrar la capacidad potencial del sistema OCT en condiciones dinámicas, se conectó una jeringa a presión llena de solución salina isotónica al extremo del tubo que contenía tanto el catéter OCT como la solución inyectada de GNPs. Esta jeringa nos permitió aplicar, de forma controlada, una alta presión en un extremo del tubo y, por tanto, un flujo intra-tubo. Como consecuencia de este flujo, la solución que contenía las GNPs fue empujada hacia el extremo abierto del tubo. En estos experimentos, el catéter OCT permaneció en una posición fija. Se grabó un vídeo de 5 s durante el procedimiento de lavado de las GNPs. El análisis de este vídeo mediante el software Image J nos permitió trazar la evolución temporal de la distribución de las GNPs en la posición del catéter OCT.

Análisis de vídeo intensidad: para estimar el realce de intensidad de contraste con la OCT, las intensidades se calcularon primero, para cada caso, definiendo una zona de medición dentro del tubo en la que la señal de la OCT era uniforme. A continuación, utilizando el software *Image J* integramos la señal dentro del área de interés. El mismo procedimiento (misma área y mismo procedimiento de integración) se aplicó a todas las

imágenes. Así, a partir de estos análisis podemos obtener fácilmente el aumento del contraste de la OCT (medido en dB) para cada GNP.

2.3.3 Resultados

Las características físicas y ópticas principales de las GNP estudiadas se representan en la Tabla 4. La sección transversal de extinción de los diferentes GNP utilizados en este trabajo se muestran en la Figura 17.

Tabla 4. Propiedades ópticas y físicas de los diferentes tipos de GNPs estudiados en este trabajo.

GNP	Tamaño (nm)	r_{eff} (nm)	Masa/GNP (gr/GNP)	σ_{ext} ($^{\lambda}$OCT) (cm^2)	φ_{abs}	σ_{sct} ($^{\lambda}$OCT) (cm^2)	σ_{back} ($^{\lambda}$OCT) (cm^2)	dB/GNP
GNR 800	25 x 90	21.9	7.72×10^{-16}	3.66×10^{-12}	0.66	1.24×10^{-12}	1.49×10^{-13}	9.80×10^{-11}
GNR 1064	10 x 67	10.8	9.80×10^{-17}	3.24×10^{-12}	0.96	0.12×10^{-12}	0.16×10^{-13}	1.71×10^{-11}
GNR 1200	21 x 171	24.2	7.84×10^{-17}	1.83×10^{-12}	0.76	0.44×10^{-12}	0.62×10^{-13}	2.30×10^{-11}
GNR 1300	10 x 100	12.3	1.47×10^{-16}	5.31×10^{-12}	0.96	0.20×10^{-12}	0.24×10^{-13}	3.00×10^{-11}
GNS 856	15.5 x 117.8	74.1	1.67×10^{-14}	3.61×10^{-10}	0.34	2.40×10^{-10}	0.27×10^{-10}	3.96×10^{-9}
GNS 986	16.4 x 198.1	115.5	4.17×10^{-14}	7.63×10^{-10}	0.37	4.84×10^{-10}	0.69×10^{-10}	1.15×10^{-8}

El espectro de emisión del láser OCT se incluye en ambos casos para poder comparar. El espectro del OCT consta de dos líneas, una a 1300 nm y otra a unos 650 nm. La sección transversal de extinción en la longitud de onda operativa de la OCT de onda ($\sigma ext(\lambda OCT)$) para cada tipo de GNP también se ha incluido en la Tabla 4.

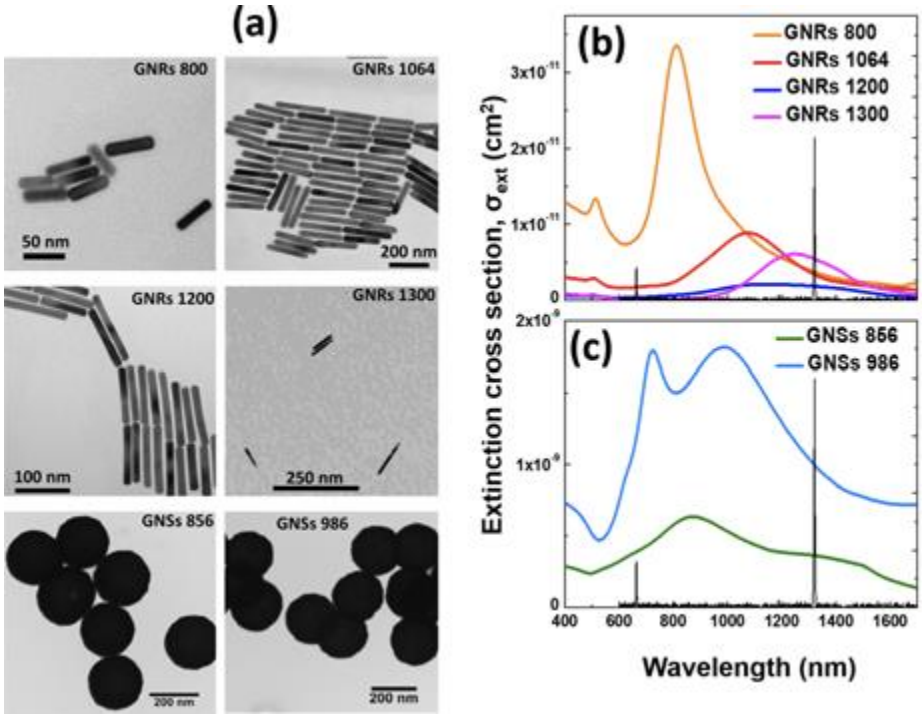


Figura 17. *(a) Imágenes de microscopía electrónica de las diferentes nanopartículas de oro investigadas en este trabajo. (b) y (c) muestran los espectros de sección transversal de extinción obtenidos para las GNRs y GNSs respectivamente. El espectro del láser OCT se muestra en (b) y (c) como una línea negra.*

Los GNRs muestran secciones transversales de extinción no sólo en la longitud de onda de resonancia del plasmón (en la que la sección transversal de extinción alcanza su máximo) sino en un rango espectral bastante amplio. Esta ampliación de los espectros de extinción se atribuye a la existencia de GNRs de diferentes tamaños en la dispersión (polidispersidad). Como la morfología (tamaño y la relación de aspecto) de los GNR determinan la ubicación espectral de su longitud de onda de resonancia del plasmón superficial, tal polidispersidad conduce a un ensanchamiento no homogéneo en los espectros de extinción. Como consecuencia de este ensanchamiento espectral todos las GNP presentan una sección transversal de extinción no evanescente en la longitud de onda de la OCT. Todos los GNRs investigados mostraron secciones transversales de extinción en λOCT del orden de 10-12 cm2 por nanopartícula. En cuanto a los GNSs estudiados, se obtuvieron espectros mucho más amplios en comparación con los GNR. Según trabajos anteriores, se esperan espectros de extinción tan amplios para los GNS debido a la activación óptica de las oscilaciones de carga de la superficie de diferentes órdenes. Debido a este rango superior (aunque ambos GNSs tienen su resonancia de plasmón superficial nominal por debajo de 1000 nm) muestran valores de sección transversal de extinción en OCT de más de dos órdenes de magnitud que los obtenidos para los GNRs, siendo del orden de 10-10 cm2 por nanopartícula para ambos GNS.

2.3.3.1 Resultados de los experimentos con imagen de OCT en estático

La Figura 18 muestra las imágenes de OCT en estático obtenidas para los seis tipos de GNP estudiados. Se observó que la presencia de todas las GNPs estudiadas condujo a una mejora relevante en el contraste de la OCT. Así mismo, la intensidad de contraste inducida depende en gran medida del tipo de GNP utilizado. Se objetivó que para la misma concentración de masa en las GNPs/solución (0,5 mg/mL) las GNSs presentan el mayor contraste OCT.

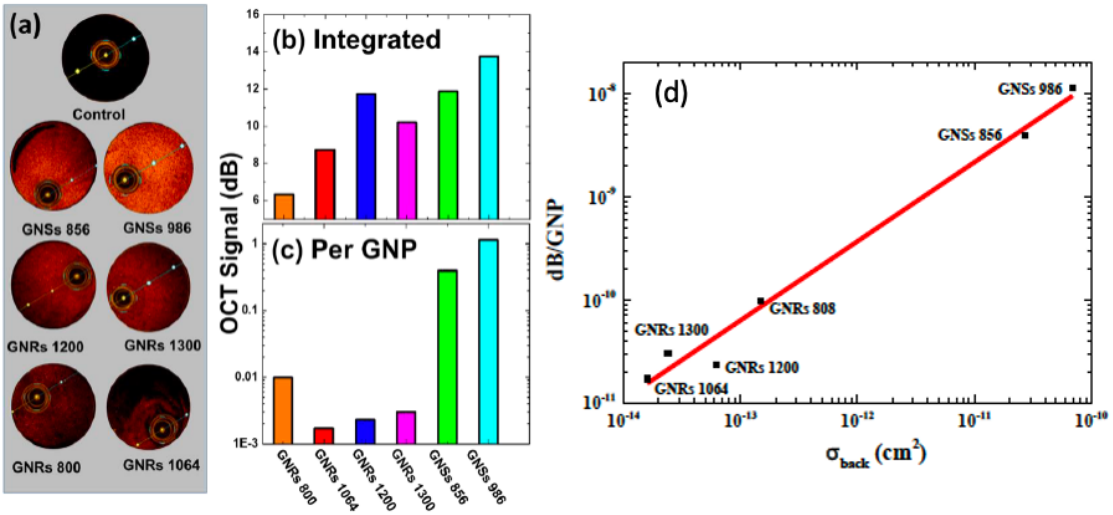


Figura 18. *(a) Imágenes de OCT con una solución salina (control) y con soluciones que contenían diferentes GNPs. En todos los casos la concentración de GNP se fijó en 0,05 mg/mL de GNP. (b y c) Señal OCT integrada obtenida para los diferentes GNPs. (d) Señal OCT normalizada por la densidad de las GNPs obtenida para obtenidos para las GNPs investigadas en este trabajo.*

Las GNSs presentan secciones transversales de dispersión (en la longitud de onda OCT) de dos órdenes de magnitud mayores que los GNR. Esta diferencia explica el diferente aumento de la señal de la OCT de la señal OCT generada por los GNS y los GNR. En particular, el papel dominante de los procesos de retrodispersión en la mejora del contraste de la OCT inducido por los GNRs se manifiesta claramente.

Tras identificar las GNSs986 como las NP estudiadas que ofrecen mayor intensidad de intensidad de contraste con OCT, se realizaron experimentos de cara a determinar el límite de detección de nuestro aparato clínico de OCT. Para ello, realizamos experimentos sistemáticos de imagen OCT utilizando soluciones salinas con diferentes concentraciones de GNS 986. Como se muestra en la Figura 19, para concentraciones elevadas de GNSs (0,05 mg/mL, que conducen a una densidad de GNSs de 7 · 108 GNS/cm3) la imagen S-OCT se caracteriza por una señal homogénea y de alto contraste a lo largo de la sección transversal del tubo. Para estas elevadas concentraciones la separación media entre los GNSs se estimó en 7 µm, distancia que está por debajo de

la resolución axial del sistema OCT (15 μm, según el fabricante). Por lo tanto, para concentraciones elevadas, la detección de las GNS aisladas/individuales no es posible apareciendo una imagen de OCT como un medio homogéneo de alto contraste. Por otro lado, cuando la concentración de GNS se reduce en varios órdenes de magnitud, la imagen OCT aparece constituida por diferentes picos brillantes que corresponden al realce local de la OCT causado por los GNS individuales (véase el zoom de la imagen OCT obtenida de la solución que contiene GNSs 986 a una concentración de 5 · 10-5 mg/mL).

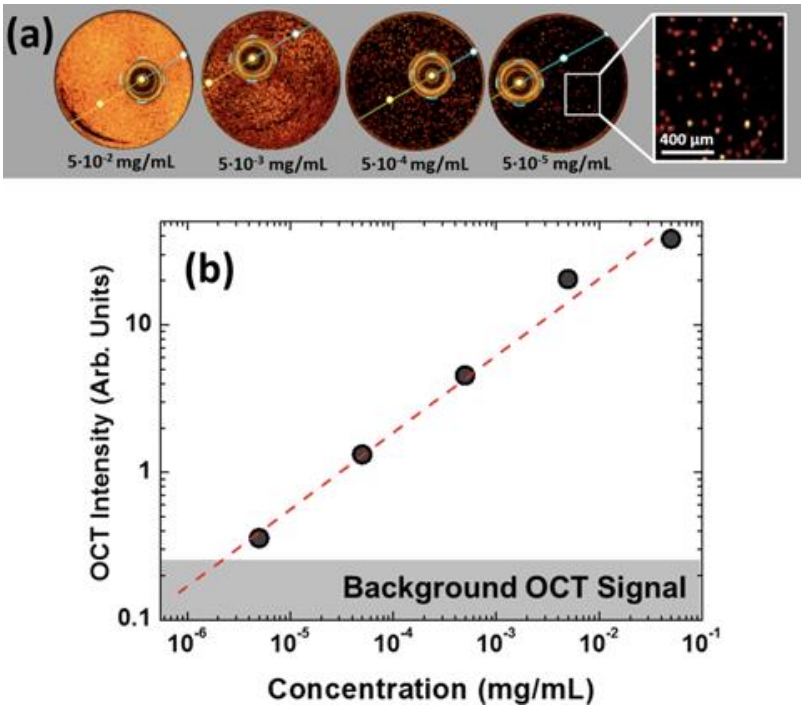


Figura 19. *(a) Imágenes de OCT con soluciones salinas que contenían GNS a diferentes niveles de niveles de concentración. Se incluye también un zoom detallado de la imagen S-OCT de la solución concentrada de 5 · 10-5 mg/. (b) Intensidad integrada de la OCT en función de la concentración de GNS. Los puntos son datos experimentales obtenidos a partir de imágenes SOCT. La señal de OCT de fondo se indica con el área gris. El límite de detección se estima en 3 · 10-6 mg/mL.*

La baja concentración se corresponde a una densidad de GNS de 7 · 105 GNS/cm3 y a una distancia media entre GNSs cercana a los 70 μm. De hecho, esta distancia entre partículas es más de cuatro veces la resolución axial nominal resolución de nuestro sistema OCT. En estas condiciones la visualización de los GNS individuales es posible como se demuestra experimentalmente en las imágenes OCT de soluciones bien diluidas incluidas en la Figura 19(a). Estos resultados revelan la capacidad de las partículas individuales como agentes de contraste local para la OCT y apoya la capacidad potencial de la OCT para obtener imágenes en la nanoescala.

2.3.3.2 Resultados de imagen tridimensional de las GNP (3D-OCT)

Para poder asignar inequívocamente los puntos brillantes que aparecen en las imágenes OCT de soluciones poco concentradas a la presencia de GNS individuales, realizamos un experimento un experimento de OCT en 3D a lo largo de un tubo lleno de una solución de agua que contenía, nominalmente, 3 · 107 GNS/mL. La imagen 3D-OCT obtenida se muestra en la Figura 20(a). La interfaz entre el volumen que contiene GNS y el volumen lleno de solución se encuentra que se encuentra cerca de Z = 1 mm. A partir del análisis de esta imagen 3D-OCT hemos calculado un número total de GNS cerca de 42 · 103 GNSs/cm^3. El volumen que contiene esos GNPs se estima en 8,6 · 10^{-3} mL, lo que lleva a una concentración de GNSs de 107 GNSs/cm^3. Esta cifra es de el mismo orden de magnitud, pero seis veces menor, que la concentración nominal de la solución inyectada (3 · 107 GNS/cm^3). Además, se ha evidenciado la distribución no homogénea de los GNS a lo largo de esta interfaz. También se demuestra que es posible localizar GNSs aislados detrás de la interfaz, es decir, en el volumen acuoso puro (ver flechas rojas). Los datos incluidos en la Figura 20 demuestran el potencial de los sistemas cardiovasculares OCT clínicos para la localización en 3D de GNPs individuales.

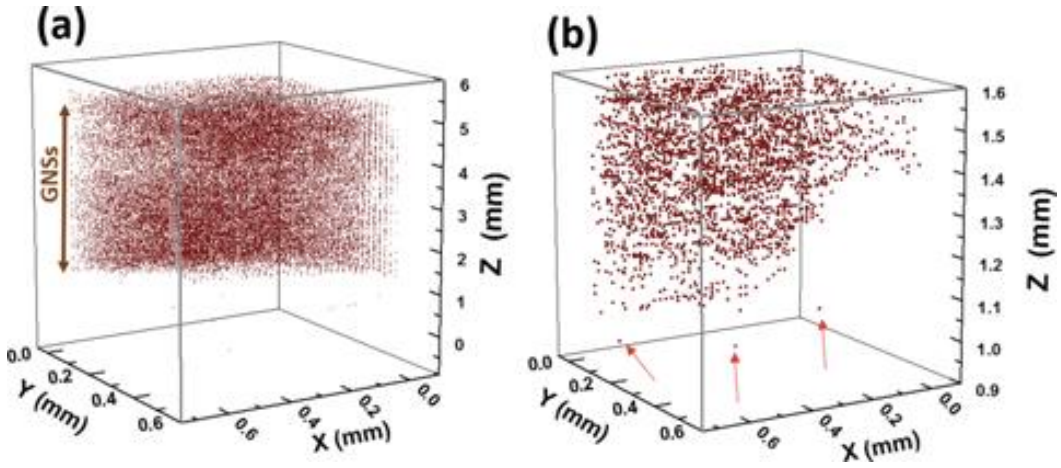


Figura 20. *(a) Imagen 3D-OCT del conducto parcialmente lleno con una inyección de una solución salina que contiene GNS856 a una concentración de 5 · 10-4 mg/mL. Cada píxel que proporciona una señal OCT mayor que el nivel de fondo se ha identificado como un único GNS, indicado con un punto. (b) Imagen 3D-OCT detallada de la interfaz entre la solución de GNS y agua. La presencia de GNS individuales y aislados en el volumen no inyectado del tubo se evidencia con flechas rojas.*

2.3.3.3 Resultados de imágenes OCT de GNPs en flujo (F-OCT)

Por último, se realizaron diferentes experimentos para demostrar la capacidad de nuestro sistema de OCT clínico para monitorizar las GNPs en condiciones de flujo. El análisis de las imágenes de F-OCT obtenidas en condiciones de flujo nos permitió trazar la posición de los GNSs al cruzar el sistema de detección OCT transversal. Un ejemplo de dicho gráfico se incluye en la Figura 21, que constituye una prueba sólida de la capacidad potencial de los sistemas OCT intravasculares para detectar GNPs individuales en condiciones no estáticas.

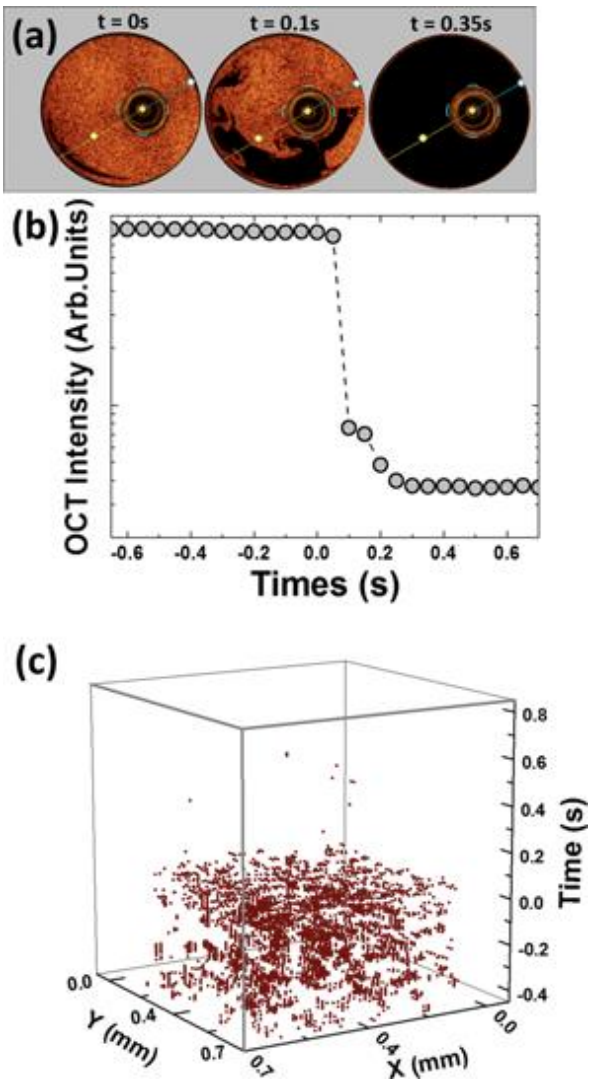


Figura 21. *(a) Imágenes de OCT dinámicas con una solución salina que contenía GNS 986 a una concentración de 0,05 mg/mL, obtenidas en diferentes momentos. (b) Intensidad integrada de la OCT en función del tiempo durante el registro de OCT. (c) Evolución temporal de la imagen OCT transversal durante el registro OCT con una concentración de GNs 986 de 5 · 10^{-6} mg/mL.*

2.3.4 Conclusiones y discusión de los resultados

Hemos demostrado experimentalmente cómo los Nano-Shells de oro que muestran excitaciones plasmónicas multipolares r en el rango espectral de 1000-1500 nm son excelentes agentes de contraste para la imagen de OCT cardiovascular que opera en longitudes de onda en torno a los a 1280 nm. Esta capacidad se basa en los elevados valores de la sección transversal de dispersión (backscattering) que estas nanopartículas muestran a esta longitud de onda específica y son dos órdenes de magnitud superiores que los proporcionados de los nanorods de oro utilizados tradicionalmente como potenciadores de la OCT. El excelente contraste de la OCT proporcionado de las GNSs ha permitido detectar nanopartículas individuales tanto en condiciones estáticas como dinámicas.

Estos hallazgos muestran el gran potencial de este tipo de GNP para su ulterior funcionalización y uso para diagnóstico molecular in vivo. Las perspectivas de las nanocápsulas de oro como nano-contrastes de la OCT en medios fisiológicos, como tejidos y endotelio arterial coronario, parecen muy plausibles. De hecho, dado el buen aumento del contraste obtenido a 1,3 micras en el medio acuático (con un coeficiente de extinción de extinción de aproximadamente 1 cm-1), también es esperable un gran aumento del contraste de la OCT en los tejidos biológicos, donde se espera que los coeficientes de extinción efectivos sean de unos pocos cm-1 en la longitud de onda de la OCT (1,3 μm). Además, los resultados que hemos obtenido podrían constituir también herramientas valiosas para la determinación de los gradientes de flujo y presión para la evaluación de los flujos y severidad de las obstrucciones coronarias.

2.4 EXPLORACIÓN DE LA POSIBILIDAD DE OBTENCIÓN DE CONTRASTE MULTIMODAL (OCT Y FLUORESCENCIA) MEDIANTE NANOPARTÍCULAS: LOS PUNTOS CUÁNTICOS *(127)*

2.4.1 Motivación y objetivos

La aplicación potencial de las NPs como agentes de contraste, se beneficiaría aún más si las NPs utilizadas, además de contraste lumínico en la OCT, pudieran proporcionar un contraste simultáneo de fotoluminiscencia (PL). Esto abriría la posibilidad de de conseguir imágenes intracoronarias multimodales. La unión de la alta resolución anatómica de la OCT con la gran intensidad de señal de la PL sería de especial utilidad. El trabajo pionero Yoo et al. demostró que la adquisición simultánea de imágenes

intracoronarias multimodales de OCT+PL permitía obtener información de imagen microestructural y funcional molecular esencial para la correlación de la enfermedad arterial coronaria y los fenómenos de cicatrización de la pared arterial [(128)]. El mínimo solapamiento entre la absorción del fluoróforo y el láser de la OCT implicaba el uso de dos fuentes de láser en este trabajo, lo que hace más compleja la posibilidad de uso combinado. Para solventar esta complicación, serían necesario el uso de un agente de contraste capaz de proporcionar contraste tanto de luminiscencia como de retrodispersión bajo una única excitación láser a 1300 nm. Además, si una NP se va a utilizar como agente multimodal OCT+PL en aplicaciones cardiológicas, su luminiscencia debe producirse dentro de las llamadas ventanas biológicas infrarrojas. Estas ventanas son rangos espectrales que se extienden desde 700 hasta 1800 nm, rango en el que los tejidos se vuelven parcialmente transparentes, lo que permite una alta penetración en las imágenes de fluorescencia in vivo.

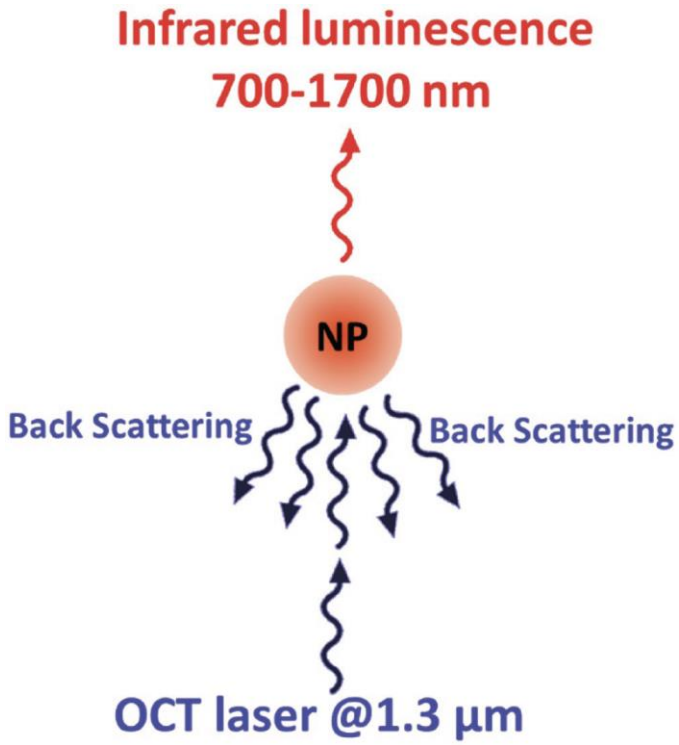


Figura 22. *Esquema de imagen bimodal OCT y fluorescencia.*

Como hemos demostrado previamente, las nanoesferas de oro recubiertas de sílice con resonancia plasmónica cercana a la longitud de onda del láser de la OCT (1280 nm) y altas secciones transversales de retrodispersión son potencialmente los mejores agentes de nanocontraste para la OCT. A pesar de los buenos resultados obtenidos hasta ahora con los GNS, su uso para la obtención de imágenes multimodales (OCT+PL) es limitado, debido a la débil eficiencia de fluorescencia del oro. Aún no se ha descrito una

nanoestructura capaz de obtener un contraste simultáneo de OCT y fluorescencia infrarroja (contraste OCT+IR) bajo una única excitación láser simultánea de 1,3 μm. Los puntos cuánticos (QDs) son nanopartículas coloidales que poseen propiedades ópticas y electrónicas únicas, cuyas excelentes propiedades ópticas los hacen ideales para la obtención de imágenes por fluorescencia de sistemas biológicos [129]. Mediante el control selectivo de las metodologías de síntesis es posible obtener QDs que emiten en la primera (650-950 nm) y segunda (1000-1400 nm) ventana del infrarrojo cercano (NIR), lo que permite obtener propiedades superiores de obtención de imágenes.

En este grupo de experimentos, evaluamos el uso potencial de puntos cuánticos emisores de infrarrojos (IR-QDs) para la obtención de imagen multimodal (OCT+PL) para su posible uso en el diagnóstico molecular intracoronario bajo excitación láser de OCT.

2.4.2 Material y Métodos

Los QDs utilizados a lo largo de este trabajo fueron PbS QDs (CANdots Series C con una longitud de onda de emisión nominal de 1,6 μm) funcionalizadas en superficie con un ligando de PEG (DSPE-PEG-amina) en un proceso de funcionalizado con un ligando de PEG (DSPE-PEG-amina) en nuestro laboratorio, con el fin de lograr la dispersión en el agua. Se usaron CANdots Series C (λem ≈ 1600 nm) PbS QDs en una dispersión de tolueno (10 mg mL-1, 1 mL) a los que se añadieron tras una cuidadosa sonicación a CHCl3 (5 mL) mientras se agitaba a 23 °C. En un segundo matraz, se añadió 1,2-distearoil-sn-glicero-3- fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] de amonio (DSPE-PEG-amina) (21 mg) se disolvió en CHCl3 (10 mL) y tras la disolución completa se añadió gota a gota a la primera mezcla. Las mezclas combinadas se agitaron durante 2 h a 23 °C y luego se eliminó el orgánico a presión reducida. Los QDs recubiertos de DSPEPEG- recubiertos de amina se introdujeron en H2O destilada y su concentración se determinó por reflexión total de rayos X de reflexión total (0,6 mg mL-1).

Se realizaron los siguientes grupos de experimentos para demostrar la utilidad de los QD para la obtención de nanocontraste bimodal intracoronario:

2.4.2.1 Caracterización física y de respuesta a la excitación con láser de las NP

La caracterización física y geométrica se realizó mediante microscopía de emisión de electrones (TEM). Los tamaños y formas de los IR-QDs se examinaron con un microscopio JEOL JEM 1010 que funcionaba a 100 kV. Las muestras se prepararon colocando una gota de una suspensión diluida en agua sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y dejándola secar a temperatura ambiente. Las distribuciones de tamaño se determinaron mediante el análisis visual de más de 166 partículas en zonas

seleccionadas al azar de las micrografías ampliadas, con el programa informático "Image tool" para obtener el tamaño medio y la desviación estándar. Se realizó análisis estadístico descriptivo para determinar su geometría. Posteriormente se determinaron los espectros de extinción de los QDs. El espectro de extinción a temperatura ambiente de las soluciones coloidales de IR-QDs se midió con un espectrómetro de absorción de doble haz (Perkin Elmer Lambda1050). Los espectros de emisión a temperatura ambiente de los IR-QDs se obtuvieron excitando la solución coloidal con un láser de fibra acoplada de 1280 nm. La emisión se analizó con una matriz lineal CCD de InGaAs acoplada a un monocromador.

2.4.2.2 Obtención de imagen bimodal en solución coloidal

La disposición experimental representada en la Figura 23 permite perite obtener imágenes OCT+PL bimodales de QDs coloidales introducidos en un tubo de silicona de 3 mm de diámetro (simulando una arteria) que se coloca dentro de un tejido biológico.

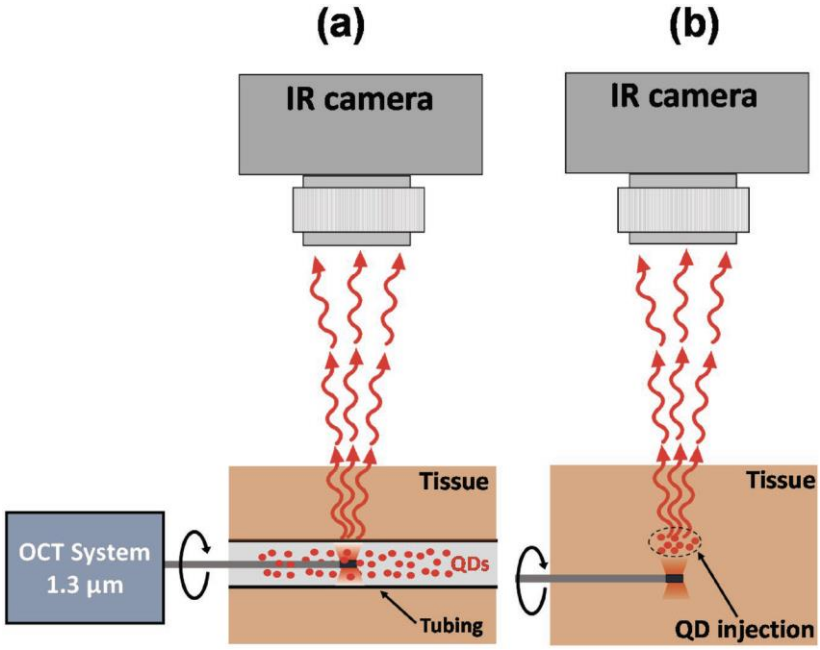


Figura 23. *Representación esquemática de los enfoques experimentales utilizados para probar la capacidad de los IR-QDs para la obtención de imágenes multimodales OCT+PL en un fluido y en tejido biológico.*

Se obtuvieron cortes transversales en estático de imagen de OCT con una suspensión acuosa de IR-QDs (0,06 mg mL-1). Como control, se utilizaron suspensiones de nanopartículas de oro (GNPs) incluyendo dos tipos de GNP para la comparación: GNRs (100 nm longitud y 10 nm de anchura) con una longitud de onda de resonancia plasmónica pico de resonancia plasmónica cercano a 1,3 µm y nanoshells de oro (GNSs, 198 nm de núcleo y 16 nm de cáscara) con una banda plasmónica multimodal que se

extiende desde 0,8 hasta 1,8 μm. Las concentraciones de las soluciones de los GNRs y GNSs se fijaron también en 0,06 mg mL-1. Con el fin de obtener una colección simultánea de la emisión de 1,5 μm de los IR-QDs junto con la señal OCT, todo ello bajo 1320 nm de excitación óptica, se utilizó una cámara infrarroja XEVA-320. Esta cámara cámara se basa en una matriz 2D de InGaAs enfriada a 0 °C que hace la detección de imágenes de fluorescencia en el rango espectral de 900-1700 nm posible. La radiación láser de excitación de 1,32 μm se bloqueó utilizando un filtro de paso largo de 1,5 μm.

2.4.2.3 Obtención de imagen bimodal en tejido biológico

El montaje experimental diseñado para este grupo de experimentos se describe esquemáticamente en la Figura 23. En este caso se utilizó tejido muscular de ave. Se introdujo el catéter de OCT dentro del tejido para obtención de imágenes. Se usó el propio tejido como control y se inyectó mediante microaguja una solución de 200 μL de una suspensión acuosa de IR-QDs (0,6 mg mL-1). Se obtuvieron imágenes trasversales en estático mediante catéter de OCT y concomitantemente imágenes de fluorescencia infrarroja con cámara específica, como se ha descrito con anterioridad. Posteriormente se realizó análisis estadístico de videointensidad de ambas señales mediante software específico.

2.4.2.4 Obtención de imagen tisular en arteria *ex vivo*

Con el fin de probar finalmente la aplicación potencial de nuestros IR-QDs para la obtención de imágenes cardiovasculares multimodales, se realizaron experimentos ex vivo. Las aortas de conejos (cuyas dimensiones son similares a las arterias coronarias humanas) se extrajeron de conejos sacrificados. Los conejos fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de barbitúricos bajo anestesia con propofol, de acuerdo con normas éticas y realizada por personal cualificado. Tras la eutanasia fueron desangrados y se diseccionó la aorta torácica y abdominal y se introdujeron en una solución salina isotónica fría para su conservación. Las ramas laterales se sellaron mediante suturas. El catéter OCT se introdujo en la arteria utilizando una cánula. Una vez introducido el catéter OCT, la arteria se llenó con una solución salina que contenía los IR-QD. A continuación, el catéter escaneó a lo largo de la arteria con una velocidad de 10 mm s-1. Durante el escaneo del catéter de OCT, la fluorescencia generada por los IR-QDs fue detectada por la misma cámara infrarroja de InGaAs utilizada en experimentos anteriores. Este sencillo montaje experimental permitió la adquisición simultánea y en tiempo real de las imágenes de fluorescencia infrarroja de la arteria.

2.4.3 Resultados

2.4.3.1 Caracterización física y de respuesta a la excitación con láser de las NP

El análisis de las imágenes obtenidas por TEM reveló un tamaño medio de IR-QD de 5 nm con con una dispersión de tamaño de ±2 nm, como puede apreciarse en el de la Figura 24a. La figura 24b muestra el espectro de extinción y emisión a temperatura ambiente de los QDs. Se observó un primer pico de absorción en torno a 1420 nm. El espectro de emisión de los IR-QDs está constituido por una única banda ancha centrada en 1500 nm, por lo que se puede aislar espectralmente de la de la radiación láser del IC-OCT.

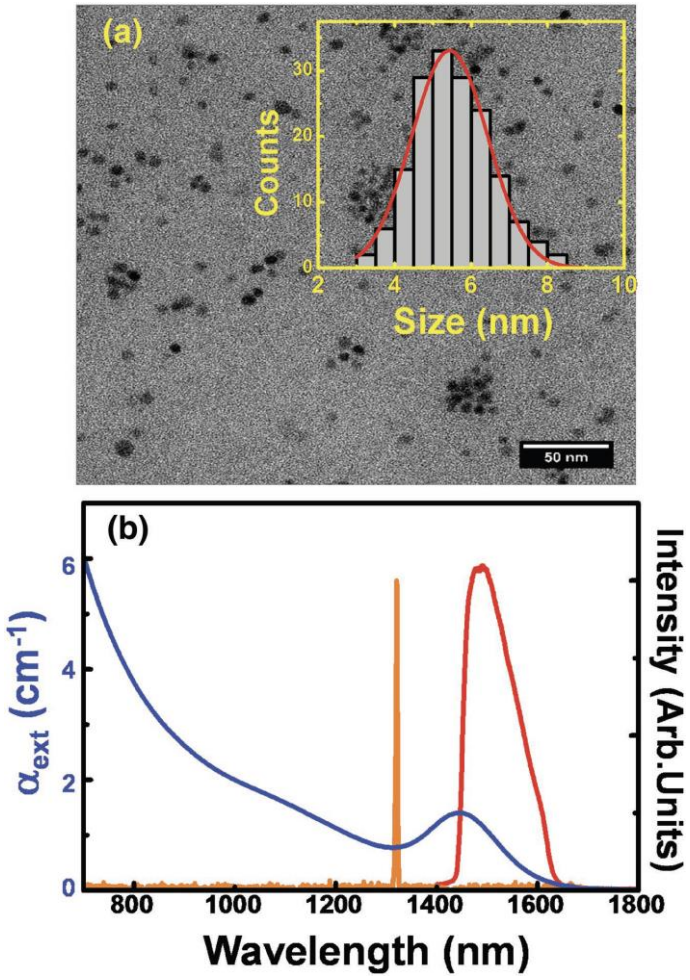


Figura 24. *(a) Imagen TEM característica de los QDs utilizados en este trabajo. El recuadro muestra el histograma de tamaños que revela un tamaño medio cercano a los 5 nm. (b) La línea azul corresponde a los espectros de extinción de los QDs. Los espectros de emisión de emisión de los QDs se muestran con la línea roja. La línea naranja corresponde a la distribución espectral de la radiación láser generada por el catéter de OCT cardiovascular.*

2.4.3.2 Obtención de imagen bimodal en solución coloidal

El análisis de solución coloidal (0.06 mg mL−1) mediante OCT reveló un claro aumento de la señal lumínica, como se muestra en la Figura 25. Se objetivó que, a pesar de su pequeño tamaño, los IR-QDs, son capaces de producir un *backscattering* lumínico a 1300nm de longitud de onda de láser que pueden dar lugar a la localización de nanopartículas brillantes en imagen de OCT. Así mismo, se comparó la señal lumínica producida por QD con la de las GNP previamente estudiadas (GNR y GNS) a la misma dilución que los QD (0.06 mg mL^{-1}). Se observó que los IR-QD presentan una menor intensidad de señal que las nanopartículas metálicas (Figura 25). De hecho, la intensidad de la señal de OCT generada por una sola nanopartícula metálica fue más de diez órdenes de magnitud (Figura 25). A pesar de la reducción de la señal en OCT, es importante señalar que el contraste generado por los IR-QDs, aunque es mucho más débil que el proporcionado por las nanopartículas metálicas, sigue siendo bien medible por el sistema clínico de OCT.

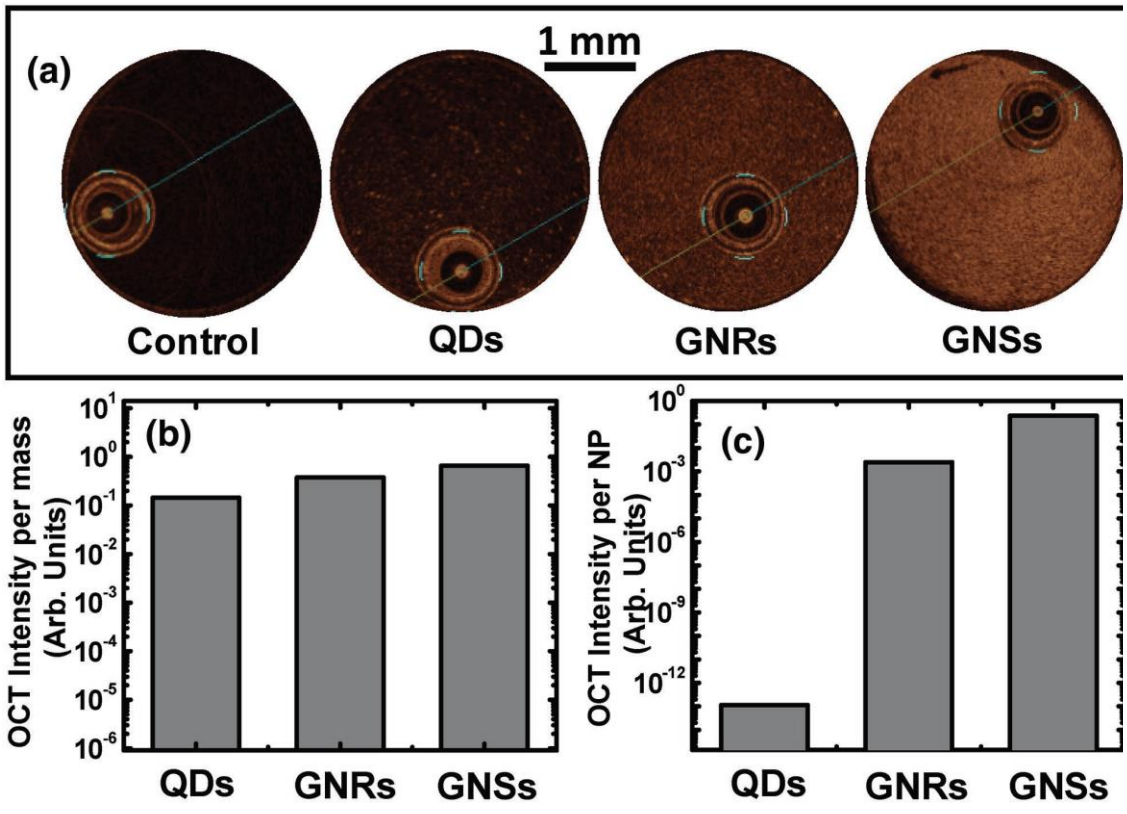


Figura 25. *(a) Imágenes OCT transversales en presencia de tres soluciones acuosas de IR-QDs, GNRs y GNSs. La concentración de nanopartículas en los tres casos se fijó en 0,06 mg mL-1. También se incluye como "imagen de control" la imagen transversal en ausencia de NPs. (b) Intensidad de señal de OCT integrada normalizada por la masa total de NPs como se obtuvo para los IR-QDs, GNRs y GNSs. (c) Intensidad OCT integrada normalizada por el número total de NPs obtenido para los IR-QDs, GNRs y GNSs.*

Una vez demostrada la capacidad de emitir señal para OCT, investigamos capacidad de los QDs para proporcionar señal infrarroja. Como se puede observar en la Figura 26, demostramos la capacidad de una doble emisión de señal, tanto para OCT como para la detección de infrarrojos, tras la excitación con un láser de 1300 nm de OCT. Además, objetivamos el aumento proporcional de ambas señales con concentraciones crecientes de IR-QD.

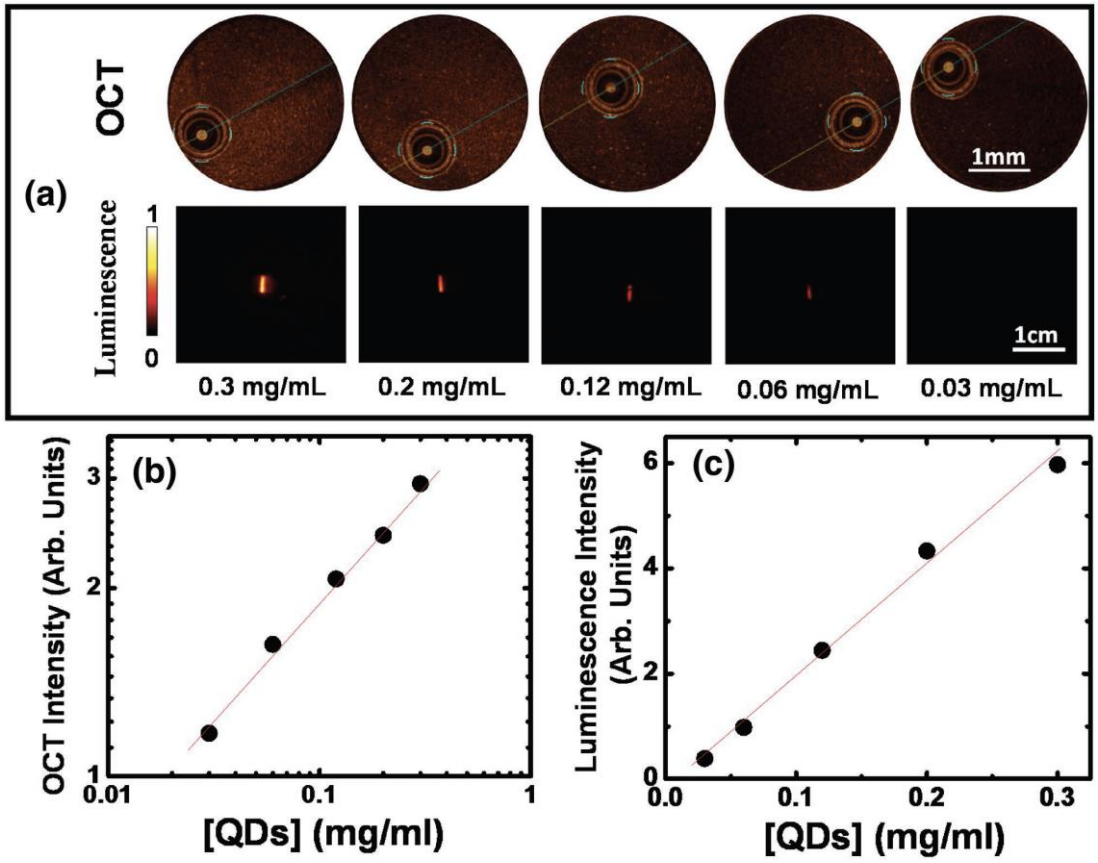


Figura 26. *(a) Sección transversal de OCT e infrarrojos obtenida para diferentes concentraciones de IR-QDs. (b) Intensidad integrada de OCT en función de la concentración de IR-QDs. (c) Intensidad integrada de luminiscencia infrarroja en función de la concentración de IR-QDs.*

Dado que en la aplicación potencial de las imágenes de fluorescencia infrarroja para la localización intraparietal arterial de QDs, bajo excitación con láser del catéter de OCT, vendría determinada por la capacidad de penetración efectiva que se podría alcanzar bajo estas condiciones de excitación. Con el fin de evaluar este importante aspecto, se realizó un experimento sistemático en el que el en el que el grosor del tejido por encima del catéter IC-OCT varió de 0 hasta 6 mm. Se observó una caída exponencial de la intensidad de la señal a medida que aumenta la profundidad de las nanopartículas en el interior del

tejido biológico (Figura 27). De este modo, la señal de infrarrojo a esa concentración (0.06 mg mL^{-1}) es subóptima por encima de los 2 mm de profundidad en tejido (Figura 27).

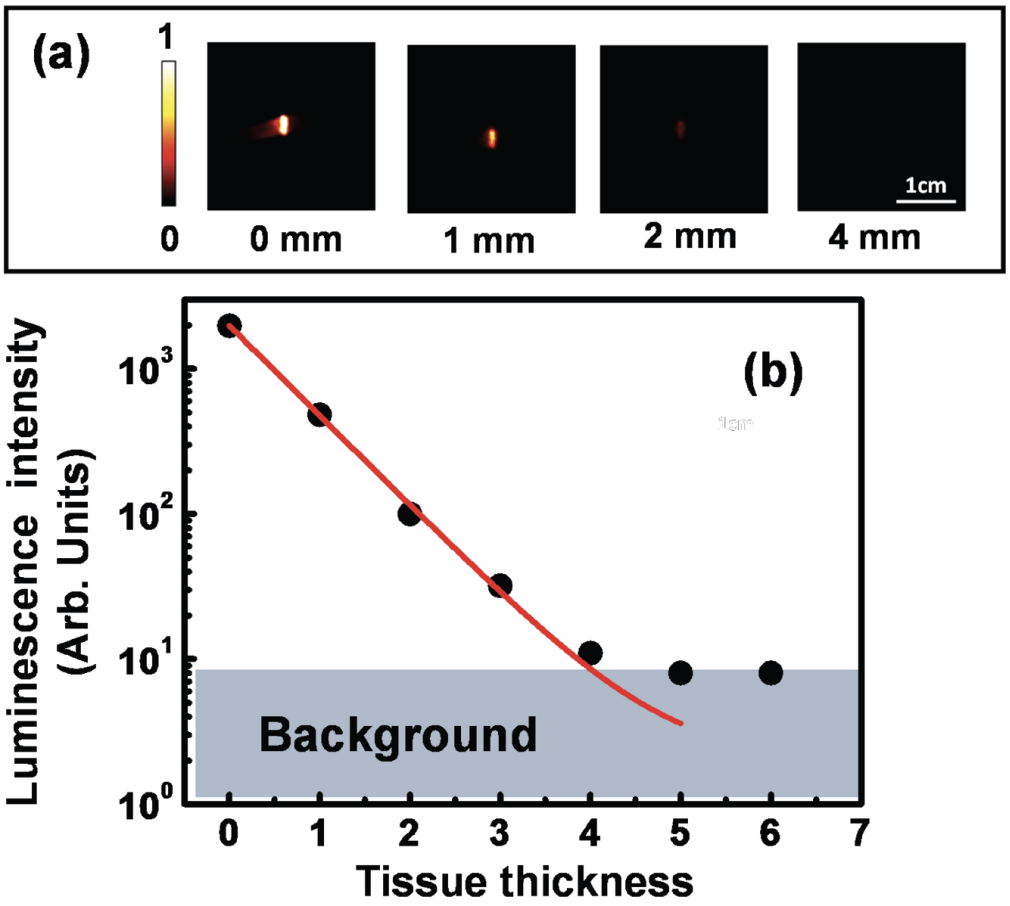


Figura 27. *(a) Imágenes de fluorescencia infrarroja de una suspensión de IR-QD (0,6 mg mL-1) obtenidas para diferentes grosores de tejido. (b) Intensidad de luminiscencia infrarroja integrada en función del del grosor del tejido. La longitud de penetración proporcionada por el ajuste exponencial es de 0,8 mm.*

2.4.3.3 Obtención de imagen bimodal en tejido biológico

La capacidad de los IR-QDs estudiados para la obtención de imágenes de doble contraste OCT+PL en los tejidos fue estudiada con la sistemática mostrada previamente. Como se muestra en la Figura 28, se encontró diferencia visual en la intensidad de señal de OCT producida por los QD respecto al control, que fue plasmada tras el análisis de videointensidad figura 27. La comparación entre la intensidad de la señal de OCT, obtenida antes y después de la inyección de IR-QDs, demuestra un notable aumento de la intensidad

en la ubicación de los de los IR-QDs. De hecho, la señal de la OCT se incrementó en casi 2,5 veces debido a la retrodispersión inducida por los IR-QDs.

Al mismo tiempo, la presencia de los IR-QDs fue demostrada simultáneamente por su luminiscencia infrarroja como se muestra en la Figura 28.

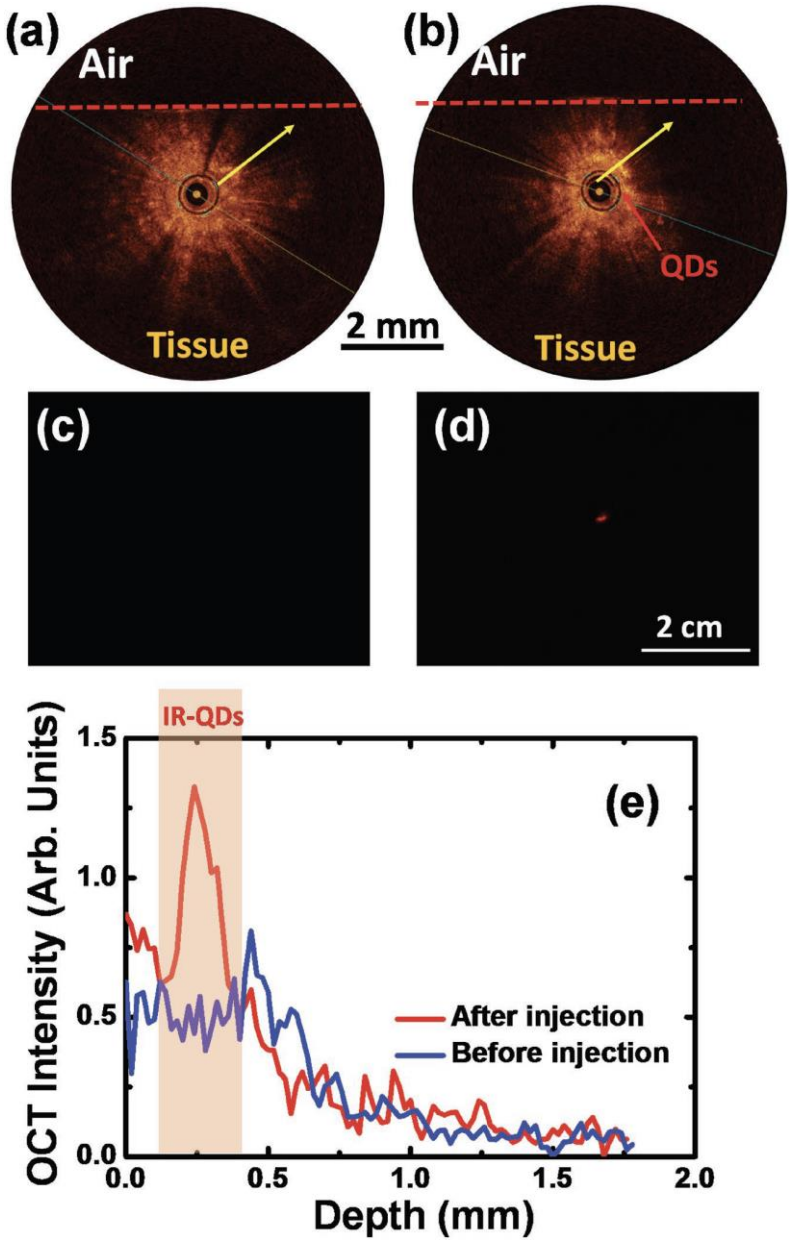


Figura 28. *(a) Imagen OCT transversal de un tejido antes de la inyección de IR-QD; (b) Imagen transversal del mismo tejido después de la inyección de IR-QDs. La ubicación de los IR-QDs se indica con la flecha roja. La línea roja discontinua indica la posición de la interfaz tejido-aire; (c) Imagen de fluorescencia infrarroja del tejido antes de la inyección de IR-QDs; (d) Imagen de fluorescencia infrarroja del tejido después de la inyección de IR-QDs; (e) Perfil de intensidad OCT obtenido a lo largo de las flechas amarillas indicadas en (a) y (b). Se incluyen los datos obtenidos antes y después de la inyección, lo que denota el aumento de la señal OCT debido a la presencia de IR-QDs.*

2.4.3.4 Obtención de imagen tisular en arteria *ex vivo*

Los experimentos ex vivo, mediante la introducción de una solución de IR-QD dentro de una arteria aorta de conejo, demostraron la capacidad de los QD para generar imagen infrarroja tras su excitación con el láser de la OCT como se muestra en la Figura 29.

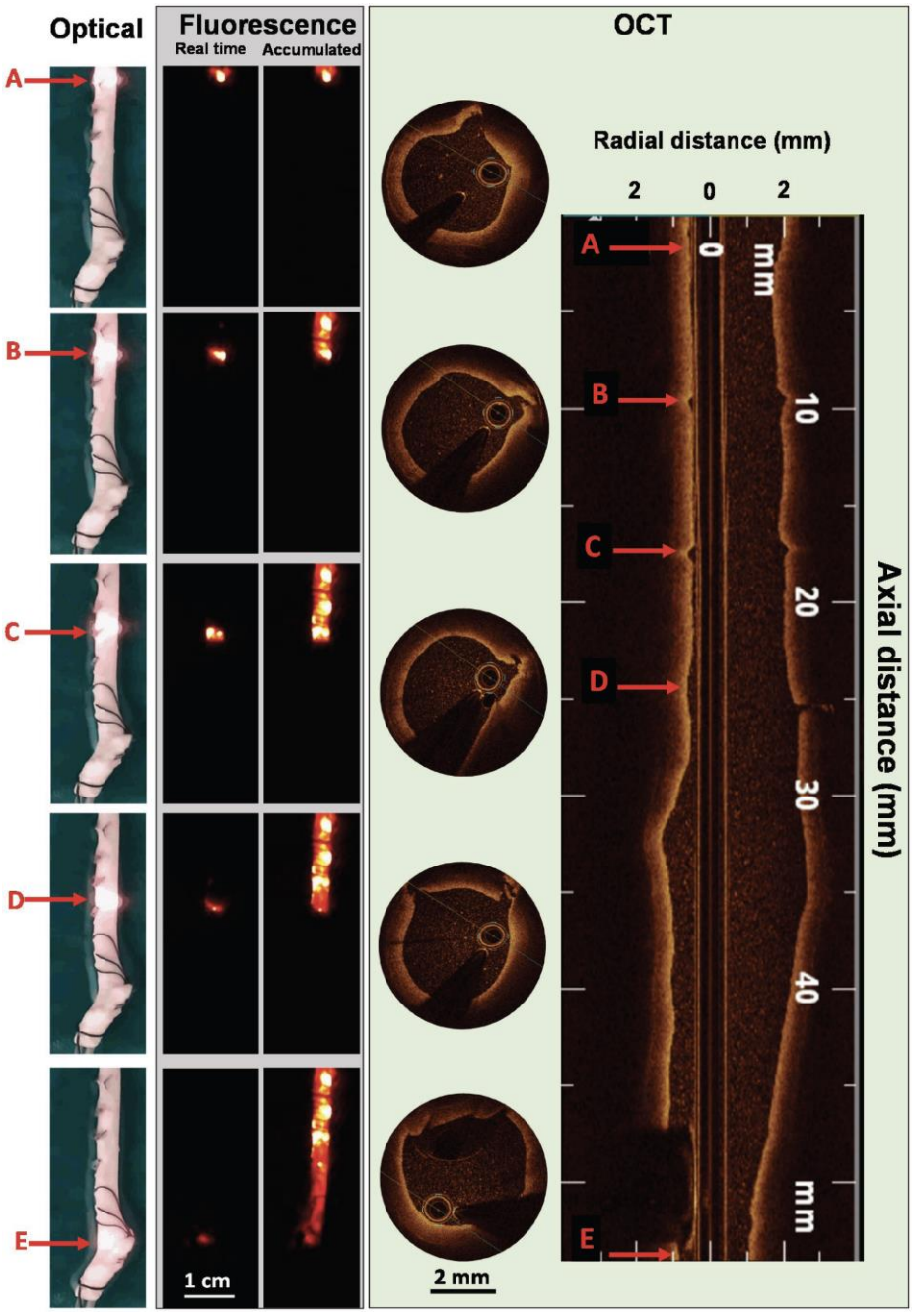


Figura 29. *Imagen óptica de la aorta extirpada de un conejo. La posición del catéter IC-OCT durante la exploración axial se indica con flechas. También se muestran las imágenes de fluorescencia infrarroja instantánea (tiempo real) y acumulativa generada por los IR-QDs dentro de la arteria para las diferentes posiciones del catéter IR-OCT y se denominan A, B, C, D y E. Las imágenes transversales OCT correspondientes también se muestran junto con la transversal de la arteria.*

La excitación con el haz de láser a 1300 nm de longitud de onda permitió obtener imágenes de gran precisión anatómica de las arterias mediante señal infrarroja. Además, se objetivaron zonas de exceso de señal, tanto por OCT, como por fluorescencia infrarroja que corresponden a zonas de acumulación de nanopartículas por depósito en las ramas laterales arteriales ligadas.

2.4.4 Conclusión y discusión de los resultados

Con esta serie de experimentos in vitro y ex vivo, hemos demostrado el potencial de los puntos cuánticos semiconductores, que emiten en la tercera ventana biológica, para obtener imágenes cardiovasculares multimodales. Se ha objetivado que los puntos cuánticos emisores de infrarrojos son capaces de proporcionar un contraste simultáneo para tomografía de coherencia óptica intracoronaria e imágenes de fluorescencia infrarroja con una longitud de onda de 1300 nm. Así mismo se ha visto que cuando un único punto cuántico emisor de infrarrojos es excitado ópticamente por un fotón de longitud de onda de 1300 nm, la radiación retrodispersada es lo suficientemente fuerte como para producir un contraste medible en un sistema OCT clínico. Además, simultáneamente, los fotones absorbidos se reemiten eficazmente a 1600 nm, lo que permite su localización simultánea mediante imágenes de fluorescencia. De este modo hemos demostrado la posibilidad de obtención de imágenes por fluorescencia y tomografía de coherencia óptica tanto en suspensión coloidal como en tejidos.

La posibilidad de obtener imágenes intracoronarias multimodales abre una nueva vía hacia el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico basadas en la imagen multimodal. Hasta donde conocemos, esta es la primera vez que se demuestra dicha capacidad de dispersión de los IR-QDs en la región espectral del infrarrojo y, en particular, bajo las condiciones de excitación de la IC-OCT(127). No obstante, la intensidad de señal de OCT generada por una sola nanopartícula metálica es más de diez órdenes de magnitud que la proporcionada por los IR-QD individuales. De hecho, este resultado era esperado debido a dos razones principales. La primera es la gran diferencia de tamaño: el volumen de un GNS individual es más de cuatro órdenes de magnitud mayor que el volumen de un IR-QD individual. En segundo lugar, en el caso de las nanopartículas metálicas la retrodispersión está asociada a las excitaciones resonantes colectivas de cargas (la resonancia plasmónica se solapa con la radiación láser del IC-OCT). Como consecuencia, la sección transversal de retrodispersión de, por ejemplo, GNSs con suficiente resonancia plasmónica a OCT es tan grande como $0,7 \times 10^{-10}$ cm2 por nanopartícula.

2.5 EN BUSCA DEL CONTRASTE ÓPTICO NEGATIVO MEDIANTE NANOPARTÍCULAS ABSORBENTES Y NO REFLECTANTES ATRÁS EXCITACIÓN EN ESPECTRO DE OCT [(130)]

2.5.1 Motivación y objetivos

En los experimentos previos, hemos identificado diferentes tipos de nanopartículas que emiten señal tras excitación de OCT por retrodispersión como las nanopartículas de oro estudiadas (GNP) [(126)]. Así mismo se han identificado nanopartículas con capacidad de emitir doble señal (retrodispersión por OCT y fluorescencia) [(127)]. Sin embargo, la característica inherente a la OCT, que construye las imágenes de los tejidos mediante la señal de retrodispersión de éstos, hace que la zona de interfase, que en el caso de la imagen intravascular correspondería al endotelio, presente una mayor señal lumínica que el resto de los tejidos. Este aumento en el brillo en la imagen tomográfica puede conllevar el que sea más complicada la obtención de un contraste que permita diferenciar una mayor intensidad de señal, partiendo de una intensidad de por sí ya elevada. En este contexto, surge la necesidad de explorar contrastes negativos, es decir, que presenten capacidad de absorber sin reflejar la luz a la longitud de onda requerida, lo que permitiría distinguir la presencia de marcadores diana mediante una disminución de la intensidad lumínica (contraste oscuro).

En los siguientes grupos de experimentos se buscaron las potenciales NP que teóricamente podrían dar contraste oscuro en la señal de OCT, se caracterizaron sus propiedades lumínicas y se probó su capacidad in vitro para dar señal oscura en OCT.

2.5.2 Material y Métodos

Para esta serie de experimentos se utilizaron NP de sulfato de cobre (CuS NP). Tras un estudio teórico de la capacidad de absorción de diferentes tipos de NP, se llegó a la conclusión de que la resonancia de plasmón superficial de estas NP era ideal, incluso con tamaños inferiores a 10 nm [(131)]. Este hecho se traduciría en la práctica en una absorción total o casi total de la energía lumínica a la que se exponga en la ventana de láser de la OCT (1300 nm) con ausencia de backscattering. Dado que la resonancia superficial surge del movimiento de las vacantes deslocalizadas en la banda de valencia del material, la posición espectral de esta característica puede controlarse por varios medios, como el tamaño de la NP, la morfología y la estequiometría.

Para llevar a cabo el objetivo final, se plantearon los siguientes pasos experimentales:

2.5.2.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de NP con mayor potencial como agente de contraste oscuro por OCT.

En la búsqueda de CuS NPs con una resonancia plasmónica centrada en la longitud de onda de trabajo de los instrumentos OCT (1300 y 1320 nm), se utilizaron dos técnicas:

2.5.2.1.1 Termólisis de complejos de cobre en disolventes de alto punto de ebullición y posterior transferencia a medios acuosos:

A 10 mL de una solución acuosa de 0,2 M de K (xan), se añadieron 5 mL de una solución acuosa de 0,4 M de CuCl2-2H2O. Inmediatamente se formó un precipitado amarillo que se volvió ligeramente más oscuro en el transcurso de 30 minutos. El precipitado se recogió, se lavó tres veces con agua y se secó toda la noche al vacío a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, se almacenó en un desecador y se envolvió en papel de aluminio para evitar la posible descomposición provocada por los rayos UV. La síntesis de estas partículas se llevó a cabo según un método ligeramente modificado y comunicado anteriormente [(132)]. Se añadieron 60 mg de CuSCN a 10 mL de oleilamina (OLAm) en un matraz de tres cuellos de 50 mL y se agitó bajo vacío a 100 °C durante 30 minutos. A continuación, se purgó el entorno de la reacción con N2 y se elevó la temperatura a 240 °C. Una vez alcanzada la temperatura objetivo, se dejó que la reacción continuara durante 1 hora. El producto bruto se transfirió a tubos de centrífuga y se precipitó al añadir un exceso de acetona. Las partículas se recogieron por mediante centrifugación (3.820 rpm durante 10 min). Las partículas se volvieron a recoger y se lavaron tres veces con una mezcla de tolueno y acetona. Finalmente, las partículas se almacenaron en cloroformo.

2.5.2.1.2 Síntesis directa en agua:

Para la síntesis de nanopartículas de sulfuro de cobre en medio acuoso, se inyectó rápidamente 1 mL de una solución acuosa 0,1 M de Na2S-9H2O en 50 mL de una solución acuosa del ligando seleccionado y Cu2+. Tras 5 minutos de agitación a temperatura ambiente, el matraz de fondo redondo de 100 ml se transfirió a un baño de aceite precalentado a 90 °C y la mezcla se mantuvo en agitación a esa temperatura durante un total de 1h. Durante este tiempo, se tomaron muestras las alícuotas, se enfriaron a temperatura ambiente y se registraron sus espectros de absorción. Las alícuotas seleccionadas para posteriores observaciones por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se precipitaron con isopropanol (iPrOH), se recuperaron mediante centrifugación (30.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C). Posteriormente, se lavaron con una mezcla de agua e iPrOH. Las partículas se almacenaron finalmente en agua desionizada (dH2O).

Tabla 5. Resumen de las condiciones experimentales (naturaleza y cantidad de ligandos) utilizadas para la síntesis de nanopartículas de sulfuro de cobre en agua. El ajuste del pH se realizó utilizando una solución de NaOH 0,2 M.

	Ligando	Cantidad de ligando, mg [mmol]	CuCl2 2H2O, mg [mmol]	Ajuste pH
Citrato	Na(cit) $\cdot 2H_2O$	17.6 [0.06]	17.0 [0.1]	9
EDTA	H_4EDTA	29.2 [0.1]	17.0 [0.1]	9
GSH	L-gluthathione	30.7 [0.1]	17.0 [0.1]	9
MHDA	Mercaptohexadecanoic acid	22.6 [0.08]	17.0 [0.1]	8
MPA	Mercaptopropionic acid	21.9 [0.2]	17.0 [0.1]	9
ACAC	Acetylacetone	20.0 [0.2]	17.0 [0.1]	6-7

Caracterización fisicoquímica de las NP sintetizadas

Las nanopartículas se visualizaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono utilizando un microscopio JEM1400 Flas (JEOL) que funcionaba a una tensión de aceleración de 100 kV. El tamaño de las nanopartículas se estimó a partir de las imágenes TEM, contando al menos 200 NPs con el software ImageJ. El tamaño hidrodinámico se obtuvo a 25 °C, utilizando un Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) con un ángulo de detección de 173° y un tiempo de equilibrio de 120 s. Los espectros de extinción óptica se registraron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro UV/VIS/NIR (Perkin Elmer Lambda1050) utilizando un decalaje de 4 nm. Los espectros infrarrojos se obtuvieron en modo de transmisión en un Spectrum Two (Perkin Elmer) en el rango de 450-4000 cm-1 con una resolución de 4 cm-1, preparando pastillas de KBr que contenían un 1 % en peso del material analizado. El análisis elemental de los complejos metálicos se realizó en un analizador elemental CHNS-932 (LECO), utilizando el método Dumas, que se basa en una combustión oxidativa directa de la muestra a 1000 °C. Finalmente, la composición de las NPs de sulfuro de cobre sintetizadas en presencia de acetilacetona se evaluó utilizando un aparato de fluorescencia total de rayos X (TXRF) S2 PICOFOX (Bruker).

Determinación de la eficiencia de la conversión térmica

Teóricamente, la totalidad de la luz absorbida debería convertirse en calor. Por lo tanto, en condiciones experimentales adecuadas, la conversión térmica (η) proporciona una estimación justa de la sección transversal de absorción versus dispersión (σabs vs σscat) de la NP plasmónica en estudio: cuanto más se acerque al 100% el valor de este parámetro, las NP se comportan como absorbentes perfectas. Para su determinación Se

rellenaron dos pocillos de una placa de 24 pocillos con 500 µL de agua desionizada y una dispersión acuosa de CuS NPs, respectivamente. La muestra se irradió con un láser de fibra acoplada de 1280 nm y la temperatura se registró utilizando una cámara térmica infrarroja E40bx (FLIR), controlada a través del software incorporado (Figura 30). Las curvas de calentamiento-enfriamiento se obtuvieron directamente de las imágenes en vivo grabadas con la cámara térmica y se midió la potencia total de la luz de excitación ante la muestra con la ayuda de un medidor de potencia. La adquisición se realizó tres veces para el agua y las CuS NPs.

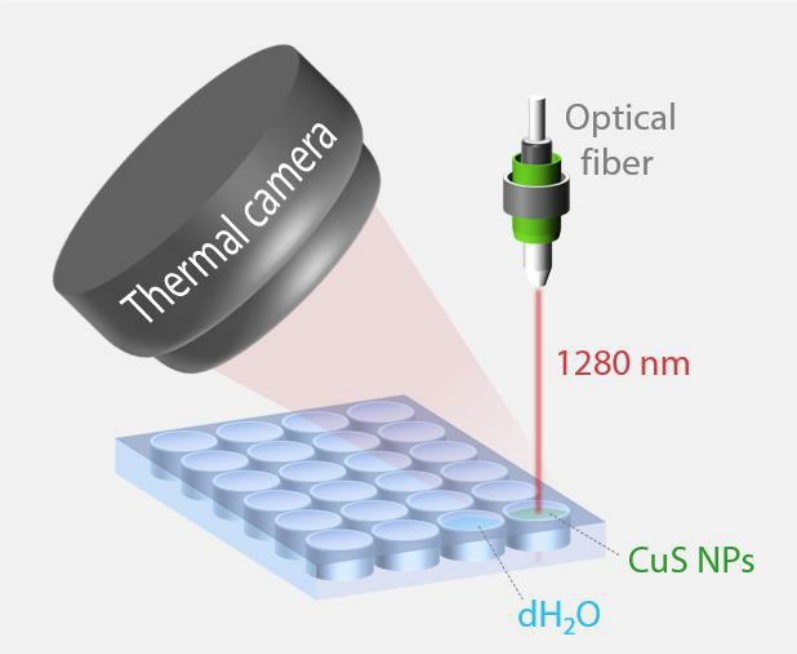


Figura 30. *Cámara térmica infrarroja E40bx (FLIR)*

2.5.2.2 Estudio de la potencial citotoxidad de las NP seleccionadas

La línea de células epiteliales cervicales humanas HeLa se cultivó en un medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Paisley, Scot land, Reino Unido) complementado con suero fetal de ternera (FCS 10%, Gibco) y 0,5% de antibióticos (penicilina G [10 000 U mL-1] y sulfato de estreptomicina sulfato [10 000 mg mL-1] (Gibco)). Las células se cultivaron en un incubador de CO2 Thermo Scientific Midi 40 CO2 Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc.) con una atmósfera de CO2 del 5%, una humedad relativa del 95% y una temperatura constante de 37 °C.

La viabilidad de las células HeLa expuestas a las CuS NP se analizó mediante el análisis de MTT [(133)]. Se realizaron incubaciones con diferentes concentraciones de CuS NP durante 4 y 24h Tras 24 horas de exposición a las NPs de CuS NPs, se añadió a cada pocillo una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 0,5 ng mL-1, y las placas se incubaron a 37 °C durante 2 h. Los

cristales de formazán resultantes se disolvieron mediante la adición de DMSO y se midió la absorbancia a 540 nm. La viabilidad de las células se estimó como un porcentaje relativo a la media obtenida de las células de control (no incubadas con las CuS NPs; 100% de viabilidad).

Análisis estadístico: los datos cuantitativos y el tamaño de la muestra de los resultados de viabilidad celular se expresaron como media ± desviación estándar (DE). viabilidad celular se expresaron como media ± desviación estándar (SD) y números brutos (n), respectivamente.

2.5.2.3 Obtención de imagen de contraste oscuro por OCT

Para objetivar la capacidad de las CuS NPs para proporcionar contraste oscuro en la imagen de OCT, se realizaron inicialmente experimentos destinados a la visualización directa de GNP, CuS NP y control con agua destilada sin NP. Para la obtención de imágenes, se empleó un sistema de OCT de dominio espectral experimental (Telesto-II, Thorlabs), con una longitud de onda de trabajo centrada en 1300 nm. Dicho sistema de OCT se montó sobre una lente de exploración LSM03 con una distancia de trabajo de 25,1 mm, con una velocidad de exploración axial de hasta 92 kHz y una resolución axial en el agua de 4,9 μm y una profundidad de imagen máxima de 2,5 mm.

Con el objetivo de probar la presencia de contrate oscuro en tejidos biológicos de alta retrodispersión lumínica, se diseñó un grupo de experimentos utilizando tejido subcutáneo de cerdo como control de señal de tejido biológico. En una muestra de tejido subcutáneo, inyectamos lateralmente 15 μL de una dispersión de 0,4 mg/ mLde NPs de CuS . La inyección se realizó inmediatamente debajo de la superficie (profundidad < 0,5 mm) mediante una aguja subcutánea. Esta misma operación se realizó de nuevo en la misma muestra de tejido con una dispersión acuosa de 0,05 mg mL-1 de dispersión acuosa de GNS). Para evaluar de forma semicuantitativa el efecto de la presencia de los de los agentes de contraste oscuros, integramos la señal de la OCT experimental (Telesto-II, Thorlabs), con una longitud de onda de trabajo centrada en 1300 nm en una región de interés (ROI) por debajo de la superficie del tejido. Posteriormente, se escaneó el tejido biológico plegado mediante una OCT de uso clínico habitual (Dragonfly OPTIS Imaging Catheter, Abbott) tras inyección de 15 μL de una suspensión de 0.4 mg mL−1 CuS NPs. En la figura 23 se muestra una representación esquemática del montaje llevado a cabo para la realización de los experimentos en tejido biológico.

2.5.3 Resultados

2.5.3.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de NP con mayor potencial como agente de contraste oscuro por OCT

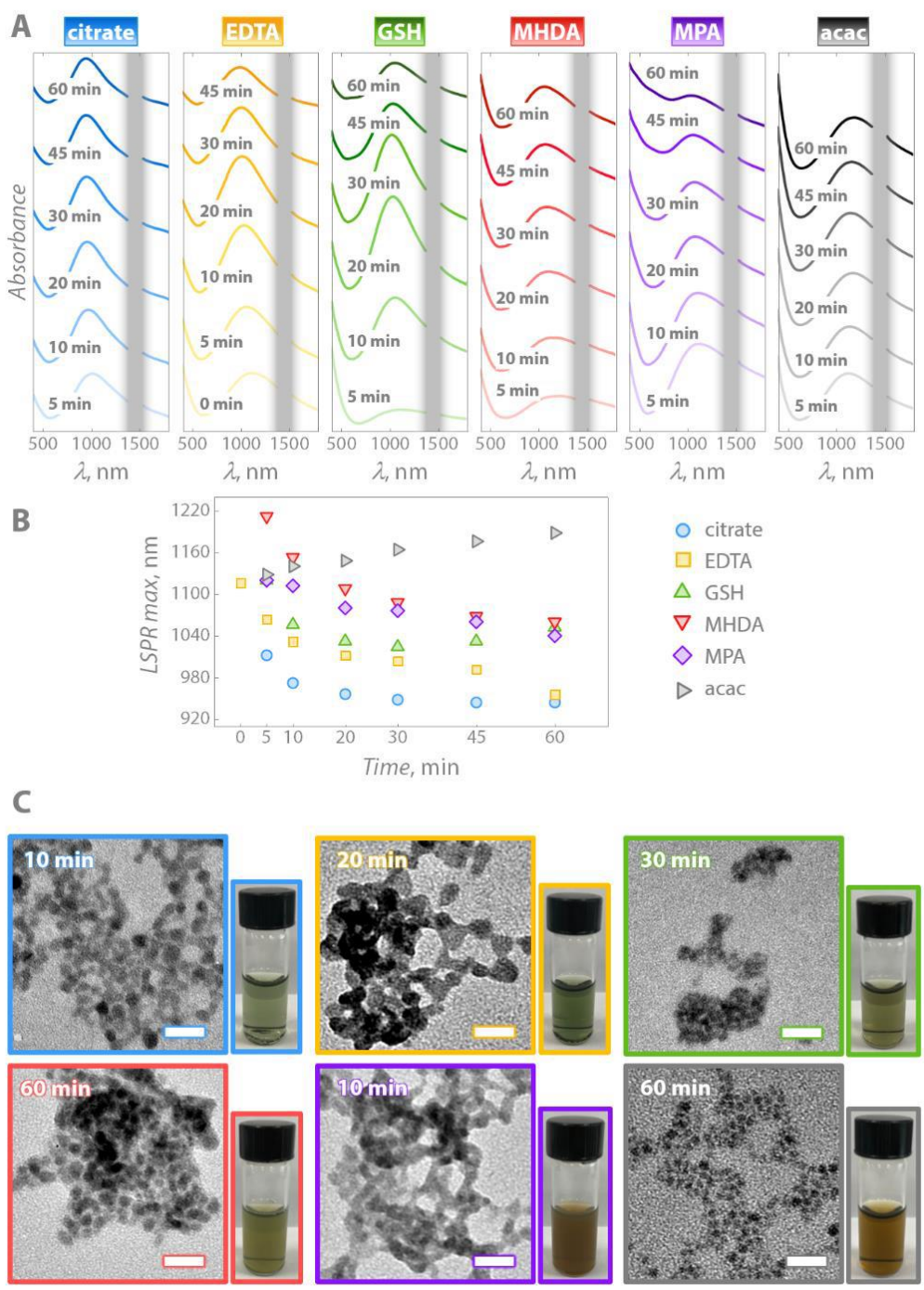


Figura 31. *Características de las CuS NP sintetizadas en agua.*

En la Figura 31, se muestran las principales características de las CuS NP sintetizadas en agua. Se muestran los espectros de absorción de alícuotas tomadas en diferentes momentos (A), junto con la evolución temporal del máximo de la banda de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR) (B). Las imágenes TEM de las alícuotas seleccionadas, junto con las imágenes de las correspondientes dispersiones en agua se muestran también (C).

Sin embargo, los mejores resultados, en términos de posición espectral de la banda LSPR e intensidad, se obtuvieron siguiendo el primer enfoque de síntesis en solventes orgánicos, como puede objetivarse en la Figura 32.

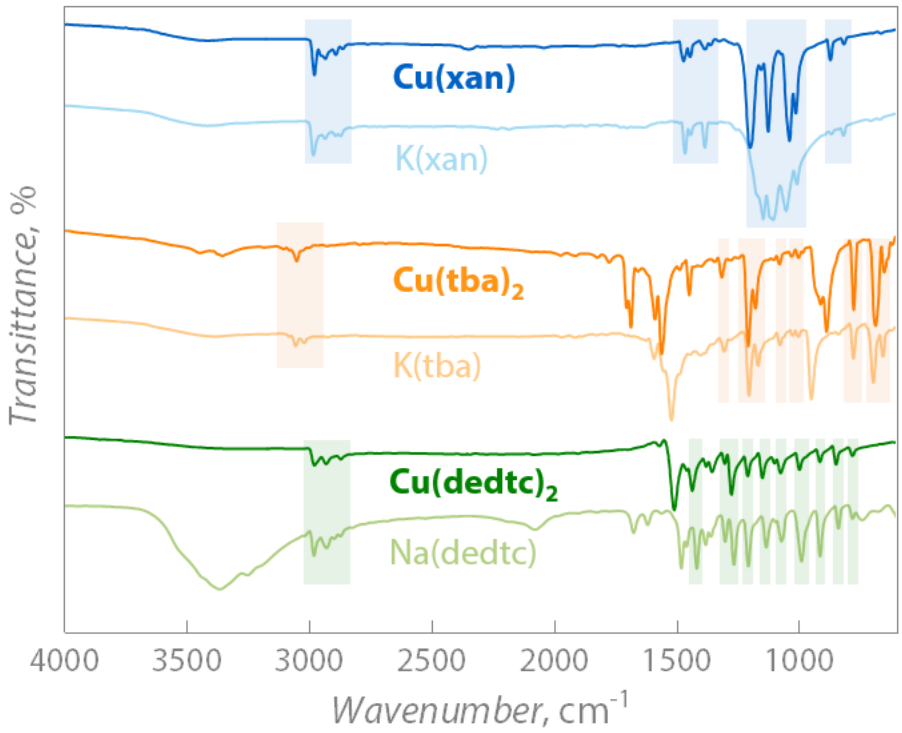


Figura 32. *Espectros de infrarrojo por transformación de Fourier (FTIR) de los complejos de cobre utilizados para la preparación de nanopartículas de sulfuro de cobre, junto con los ligandos correspondientes. Las áreas sombreadas de color indican las señales de la marca presentes en el ligando y en el complejo de cobre.*

El crecimiento de las NPs obtenidas a partir de Cu(tba)2 y Cu(xan) ocurrió de forma similar: inicialmente se observaron pequeñas placas de morfología triangular, que luego se convirtieron homogéneamente en placas hexagonales. Por encima de 200 °C, se formaron partículas de mayor tamaño, lo que provocó un ensanchamiento de la distribución de tamaños. La muestra sintetizada a partir de Cu(dedtc)2 presentaba, en cambio, placas más grandes de tamaños y morfologías diferentes desde las primeras etapas de la reacción. La mayor reactividad de los dos últimos complejos se traduce en

una cinética de descomposición más rápida. Esto conduce a la producción de un mayor número de núcleos y el crecimiento de más partículas pequeñas.

A partir de esta preselección basada en las condiciones de reacción, identificamos las NPs de sulfuro de cobre obtenidas de la termólisis de Cu(tba)2 a 200 °C (Figura 33) como los candidatos más prometedores para nuestro estudio, debido a su distribución de tamaño relativamente baja, su pequeño tamaño y su banda LSPR centrada en el NIR-II.

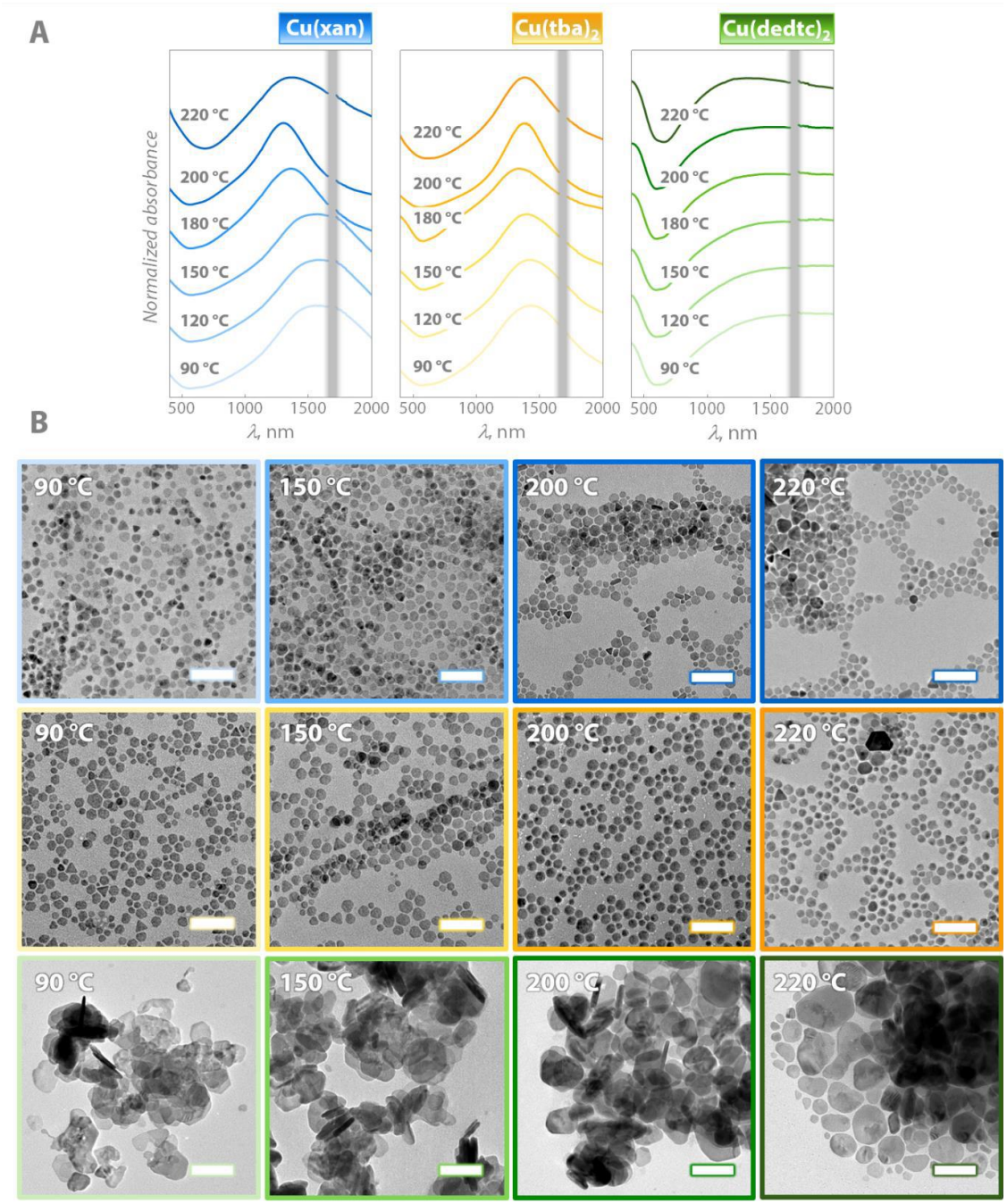


Figura 33. *Espectros de absorción e imágenes TEM de las nanopartículas de sulfuro de cobre sintetizadas mediante la termólisis de Cu(xan), Cu(tba)2 y Cu(dedtc)2.*

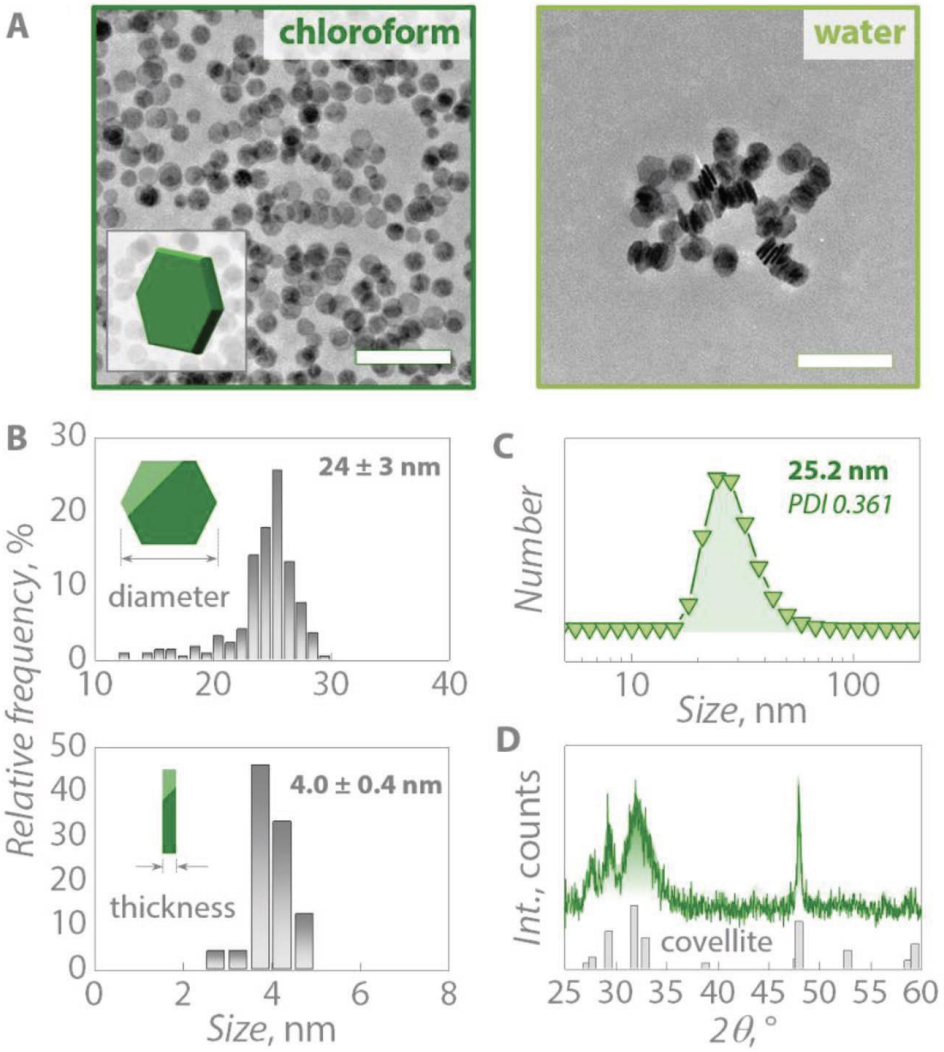


Figura 34. *A) Imágenes TEM de NPs de CuS sintetizadas a 200 °C a partir de Cu(tba)2, recubiertas con OLAm (dispersado en cloroformo) y PEG-SH (dispersado en agua). Las barras de escala son de 100 nm. B) Diámetro geométrico y grosor de las CuS NPs en forma de placa obtenidos a partir de imágenes de TEM. C) Resultados de las mediciones DLS realizadas en una dispersión en tampón fosfato (1× PB) de las NPs de CuS cubiertas con PEGSH- con capa de CuS. D) Patrón de difracción de rayos X (XRD) de las CuS NPs comparado con el patrón de referencia.*

Las NPs obtenidas en esas condiciones eran dispersables en disolventes orgánicos comunes, como tolueno, cloroformo y tetrahidrofurano. Las moléculas de OLAm en la superficie podían ser fácilmente desplazadas por el polietilenglicol tiolado (PEG-SH), lo que hace a las NPs hidrofílicas. Las NPs en forma de disco tenían 24,4 y 4,0 nm de diámetro y grosor, respectivamente. Presentaban un tamaño hidrodinámico de ≈25,2 nm en agua, tal y como se obtuvo a partir de las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) (Figura 34C). Este valor concuerda con el tamaño geométrico determinado a partir de observaciones de microscopía electrónica de transmisión y sugería la presencia de nanopartículas NPs individuales y no agregadas en la dispersión. Es

importante destacar que la estructura cristalina de las NPs de cobre sintetizada era la covelita, cuya estequiometría es CuS (Figura 34D). Esta observación es fundamental en este contexto, ya que entre los diversos materiales de CuxS, el CuS es el que soporta la LSPR más intensa. Esto es debido a la mayor densidad de estados vacíos en la parte superior de la banda de valencia que presenta la covelita en comparación con otras estequiometrías en las que Cu/S > 1 [(134)].

Las CuS NPs sintetizadas poseían una fuerte banda LSPR que alcanzaba un pico en torno a los 1400 nm y que coincidía con la longitud de onda de la OCT. La Figura 35 muestra los espectros de extinción, así como la eficiencia de dispersión térmica de las CuS NP seleccionadas.

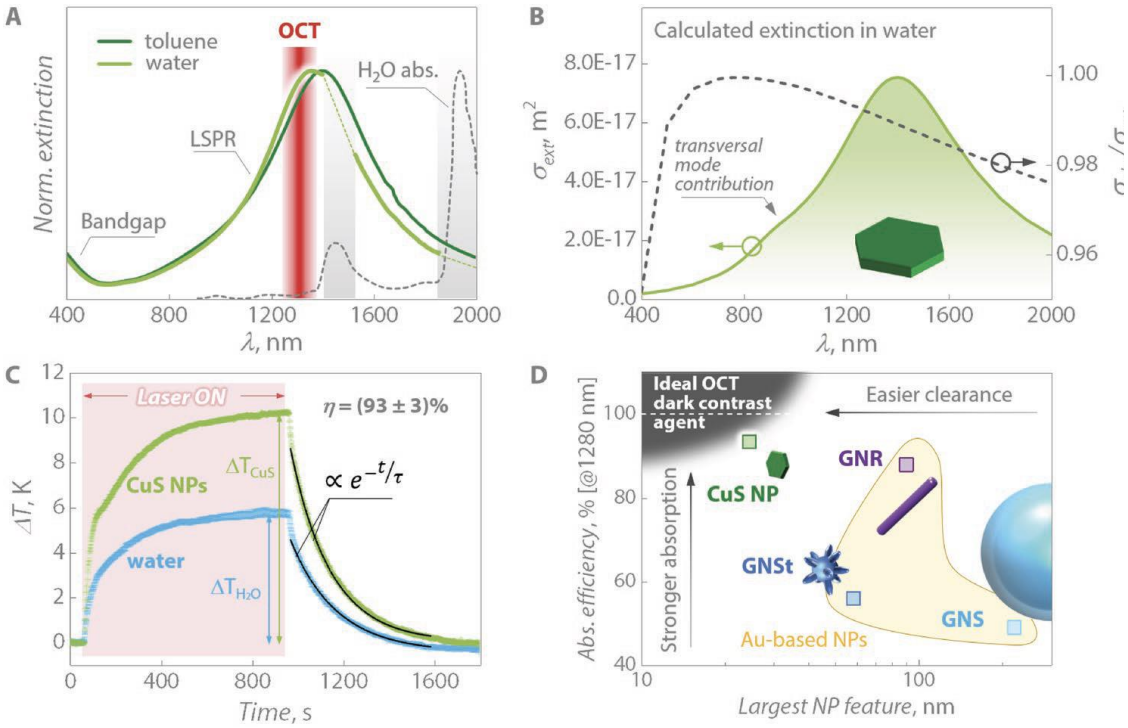


Figura 35. *A) Espectros de extinción de las NPs de CuS en tolueno (verde oscuro) y en agua (verde claro), respectivamente, antes y después de intercambiar moléculas de OLAm por PEG-SH. B) Sección transversal de extinción simulada (σext) de las NPs de CuS en agua, junto con la relación de absorción (σabs) sobre la extinción total (σext) que incluye los componentes de absorción y dispersión (σscat). C) Curvas de calentamiento-enfriamiento obtenidas a partir de la irradiación de agua (azul claro) y de la dispersión acuosa de NPs de CuS (verde claro) con un láser de 1280 nm. Las líneas negras en las partes de enfriamiento de las curvas son ajustes exponenciales simples a los datos. D) Eficiencia de absorción a 1280 nm (calculada experimentalmente) frente a la más grande de las NP plasmónicas investigadas en experimentos previos.*

Estos resultados teóricos ponen de manifiesto un aspecto fundamental: debido al pequeño tamaño de las CuS NPs y la a tasa de amortiguación relativamente grande del CuS, el coeficiente de extinción está dominado por la contribución de la absorción. Las curvas adjuntas muestran que, efectivamente, en torno a los 1300 nm ≈99% de la energía del plasmón excitado será absorbida en lugar de contribuir a la dispersión. Proporcionando un apoyo experimental adicional para este punto, se evaluó la eficiencia de conversión de calor de calor (η) del sistema bajo excitación con un diodo láser de 1280 nm.

En definitiva, los valores obtenidos tanto a partir de las simulaciones teóricas como con los datos experimentales demostraron que en estas CuS NP presentan un espectro de absorción equivalente al de extinción (σext ≅ σabs). Entre las NPs investigadas hasta ahora, estas NPs de CuS son las que presentan unas características potenciales para ser utilizadas como agentes de contraste oscuro en OCT (Figura 35D). Este se debe a que combinan las dos características que buscábamos: un pequeño tamaño y una absorción de luz en el espectro NIR.

2.5.3.2 Estudio de la potencial citotoxidad de las NP seleccionadas

Para los primeros experimentos, se eligieron concentraciones muy altas (de 0,05 a 1,00 mg mL-1). Basados en la bibiografía previa estas concentraciones serían 10 veces superiores a las esperadas tras la inyección de la suspensión de CuS NPs en el cuerpo y su mezcla con los fluidos biológicos [(135)]. Posteriormente se utilizaron concentraciones en un rango que imita mejor las concentraciones esperadas in vivo (de 0,01 a 1,00 μg mL-1) [(135)].

Como se observa en la Figura 36, ambos conjuntos de ensayos no mostraron no mostraron evidencia de citotoxicidad significativa en la línea celular probada con una disminución máxima del 13% en la viabilidad celular a la concentración más alta probada (1,00 mg mL-1). Estos resultados corroboran los datos previos de nula toxicidad celular de las CuS NP en líneas celulares humanas.

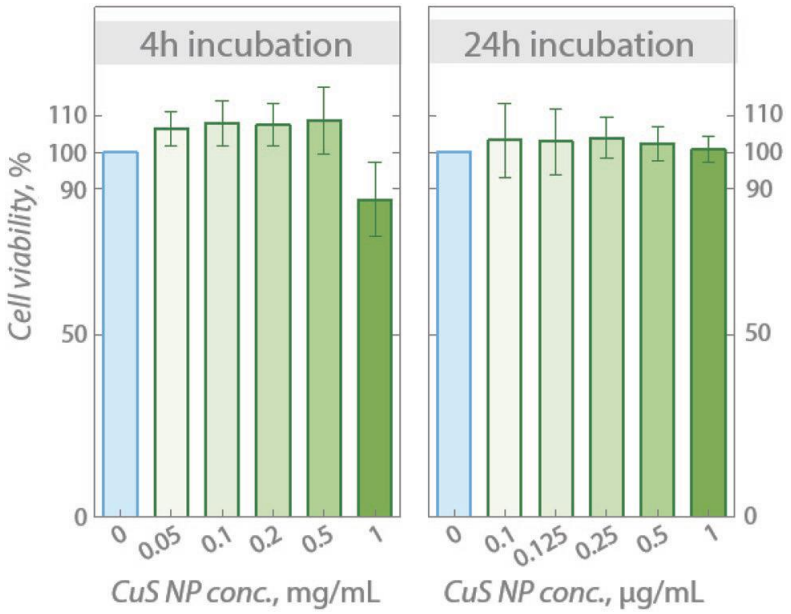


Figura 36. *Porcentaje de viabilidad de las células HeLa incubadas durante 4 y 24 h con dispersiones de NPs de CuS a diferentes concentraciones. Los datos se presentan como media ± DE.*

2.5.3.3 Obtención de imagen de contraste oscuro por OCT

Como se decribió anteriormente, con el objetivo de demostrar la ausencia de señal brillante por la CuS NP en la imagen de OCT, se realizó una visualización directa de GNP, CuS NP y control con agua destilada sin NP. Para la obtención de imágenes, se empleó un sistema de OCT de dominio espectral experimental (Telesto-II, Thorlabs), con una longitud de onda de trabajo centrada en 1300 nm.

Como se aprecia en la Figura 37, el contraste brillante que ofrecen los GNS está en consonancia con el comportamiento que habíamos observado anteriormente con estas mismas de estas especies en la longitud de onda de la OCT. Como era de esperar, la ausencia de backscattering de dispersión de las NPs de CuS dio lugar a la ausencia total de señal lumínica por OCT dentro del tubo, de forma similar a lo observado para el control.

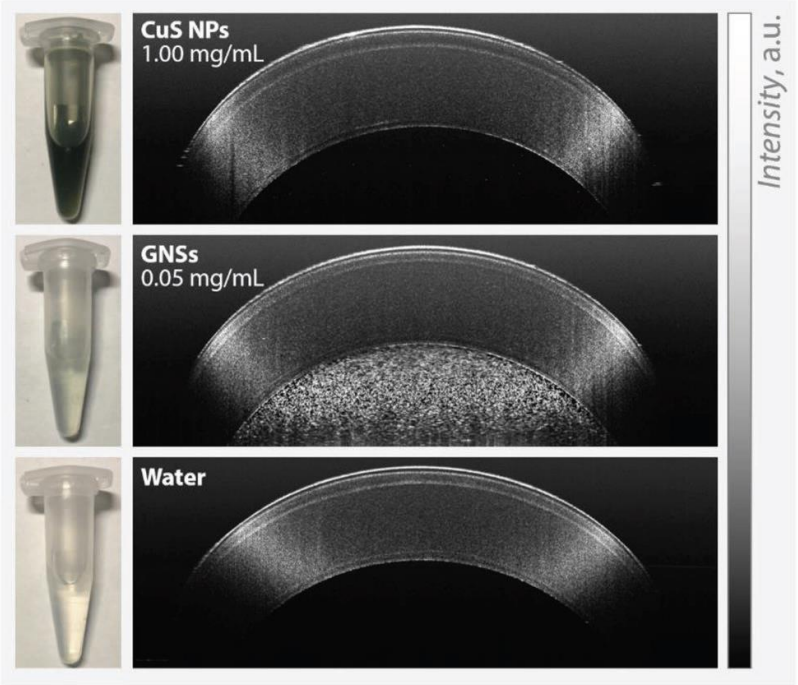


Figura 37. *Imágenes de OCT bidimensional de tubos Eppendorf que contienen (de arriba a abajo): dispersión de CuS NPs (1 mg/ml), dispersión acuosa de GNS (0.05 mg/ml) y agua sin NP.*

Posteriormente se realizaron los trabajos experimentales con tejido biológico según la metodología previamente expuesta como se muestra en la Figura 38.

Mediante la toma de imágenes con la OCT experimental se evidenció claramente cómo en la zona donde se inyectaron las CuS NPs, la señal de la OCT disminuyó considerablemente en comparación con la zona no tratada. Para evaluar de forma semicuantitativa el efecto de la presencia de los agentes de contraste oscuros, integramos la señal de la OCT en una región de interés (ROI) por debajo de la superficie del tejido. Los resultados muestran que la señal disminuyó ≈3,6 veces en la zona donde se inyectaron las NPs de CuS. Estos mismos resultados se replicaron mediante el experimento de OCT clínica como puede objetivarse en la Figura. De nuevo, el ROI con presencia de CuS NPs presentó una intensidad de señal significativamente menor que el control.

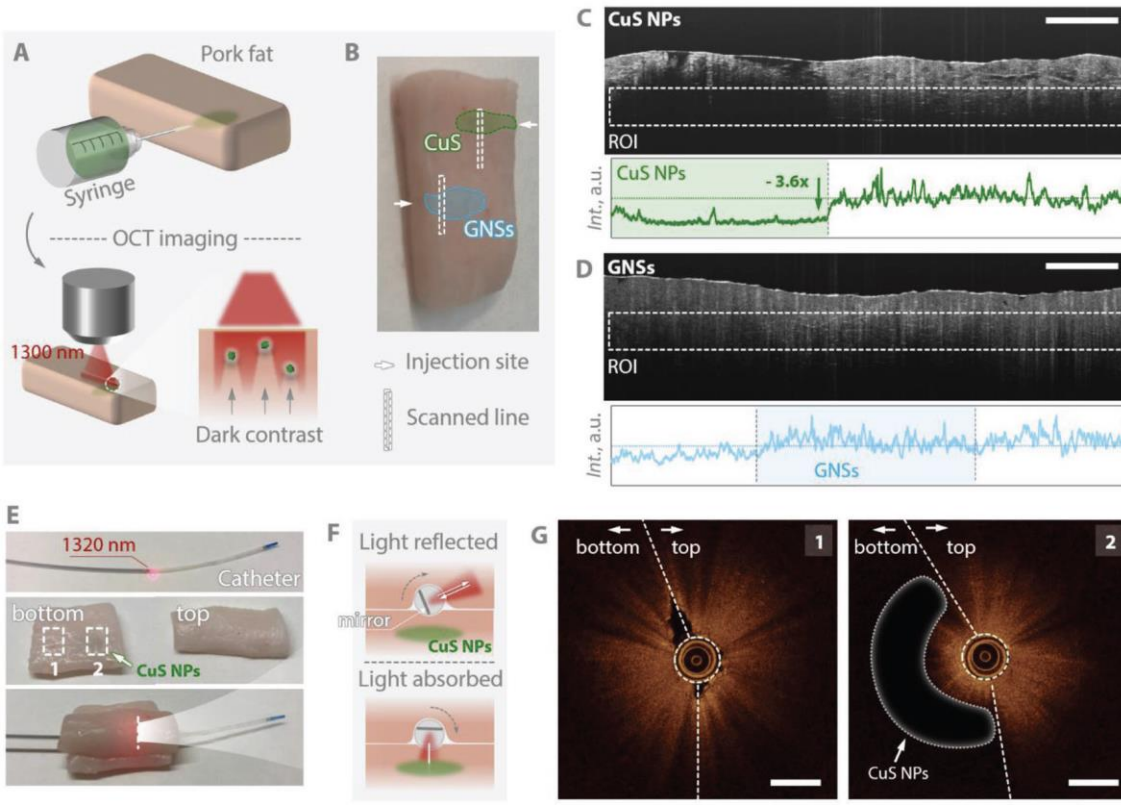


Figura 38. *Resultados de las pruebas OCT realizadas con A-D) un equipo de SD-OCT experimental y, E-G) un equipo de OCT coronario clínico. A) Esquema del montaje empleado para probar la capacidad de contraste oscuro de las CuS NPs en el tejido subcutáneo porcino, junto con una simulación del mecanismo que da lugar al contraste oscuro. B) Imagen del tejido biológico fotografiado tras la inyección de suspensiones de NPs de CuS y GNSs. C, D) Imágenes de OCT obtenidos en correspondencia de las zonas en las que se inyectaron respectivamente los dos tipos de agentes de contraste, junto con la intensidad de la señal OCT derivada de la integración de la señal de la señal en los ROIs indicados en los pullbacks. E) Desglose del montaje empleado para la prueba OCT con catéter coronario de uso clínico. Los dos rectángulos marcados como 1 (tejido sin NP) y 2 (CuS NPs inyectadas) en la imagen central indican, respectivamente, las zonas en las que se registraron las imágenes OCT mostradas en G. F) Croquis de la sección indicada en la imagen inferior de (E), que muestra cómo se genera el contraste oscuro. G) Imágenes OCT obtenidas de las dos zonas resaltadas en (E). Todas las barras de escala (en C, D, G) son de 1 mm.*

2.5.4 Conclusión y discusión de los resultados

Con esta serie de experimentos hemos mostrado por primera vez un agente de contraste oscuro para OCT, en forma de nanopartículas plasmónicas de cobre. Las nanopartículas sintetizadas presentaron características óptimas para utilizarse como potenciales agentes de contraste oscuro de la OCT: pequeño tamaño, sin citotoxicidad

observada y con absorción sin retrodispersión de la luz en las longitudes de onda de los equipos de OCT médica. Es importante destacar que, en la búsqueda de nanopartículas aptas para esta aplicación, hemos desarrollado y caracterizado una biblioteca de nanopartículas de sulfuro de cobre de pequeño tamaño y con bandas de resonancia plasmónica que cubren las tres ventanas de transparencia óptica (Figura 39).

Estos nanocompuestos pueden ser de especial utilidad para permitir distinguir su señal en zonas de alta intensidad lumínica, en los que aumentar la señal parece complicado como en placas fibrosas o en la interfaz endotelial. Yendo un paso más allá, los datos que aquí se presentan tienen un potencial más amplio. En el camino hacia las NPs de CuS adecuadas para actuar como agentes de contraste de contraste oscuro, hemos descubierto todo un arsenal de NPs de sulfuro de cobre plasmónicas con capacidad absorbente en las ventanas NIR (Figura 40). El atractivo de estas NP reside en la posibilidad de cubrir un rango de longitudes de onda increíblemente amplio en el NIR, que abarca las tres ventanas de transparencia, es decir, NIR-I (750- 950 nm), NIR-II (1000-1400 nm) y NIR-III (1500-1870 nm). El tamaño, la morfología y la estructura cristalina son los parámetros que rigen las propiedades plasmónicas de estos sistemas. Una cuidadosa selección de las condiciones de reacción y de los precursores permite controlar estos parámetros, lo que hace posible de las propiedades plasmónicas de las nanopartículas de sulfuro de cobre se adapten a las necesidades de la aplicación deseada.

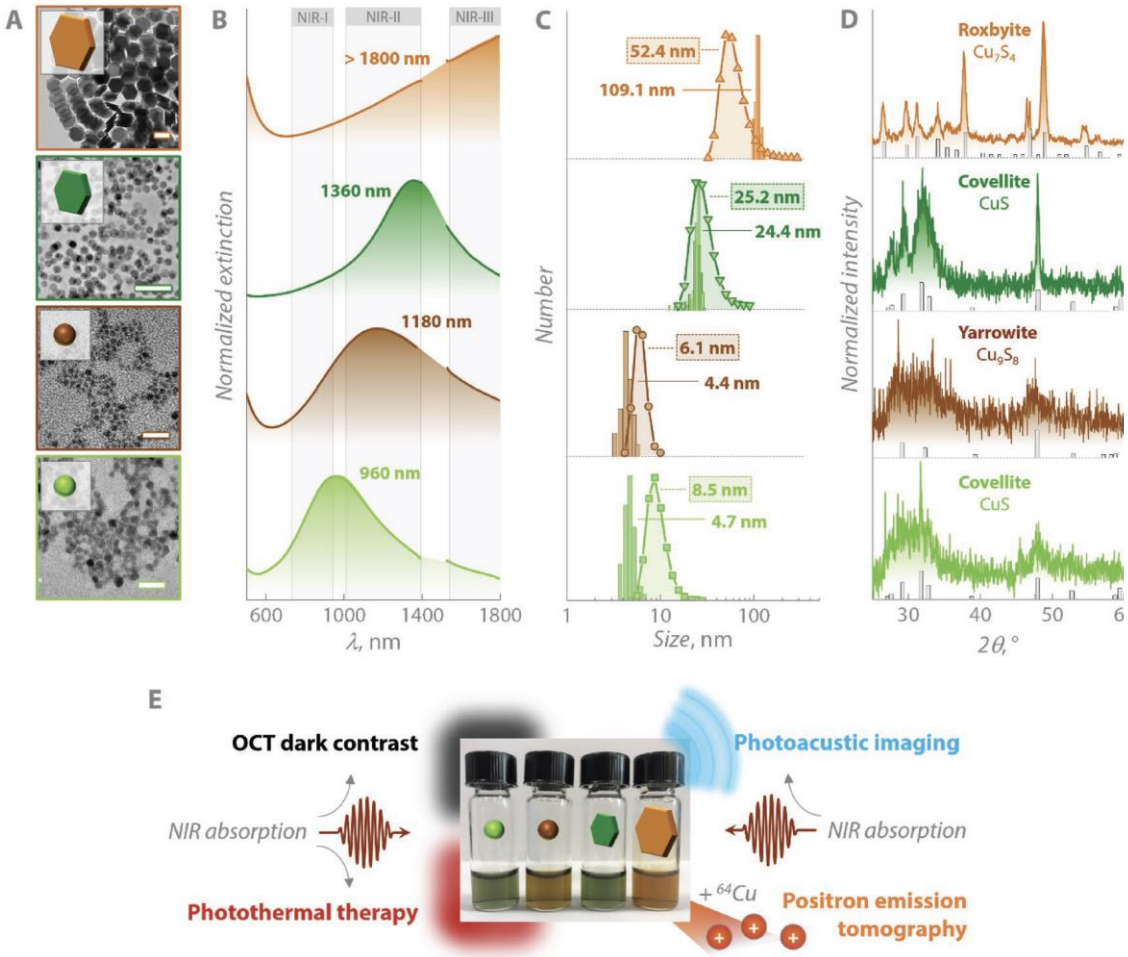


Figura 39. *A) Imágenes TEM, B) espectros de extinción, C) tamaño geométrico e hidrodinámico, y D) patrones de difracción de rayos X de las NPs de sulfuro de cobre sintetizadas en la búsqueda de agentes de contraste oscuro para OCT.*

2.6 CONCLUSIONES

Tras la realización de este grupo de experimentos, hemos demostrado experimentalmente cómo las nanoesferas de oro (GNS) que muestran excitaciones plasmónicas multipolares en el rango espectral de 1000-1500 nm son excelentes agentes de contraste para la imagen OCT intravasculares. Esta capacidad se basa principalmente en los grandes valores de la sección transversal de dispersión (retrodispersión) que proporcionan estas NP en esta longitud de onda específica, que son dos órdenes de magnitud mayores que los proporcionados por las GNR, utilizadas tradicionalmente como potenciadores de la OCT.

El rendimiento superior de los GNS como unidades de dispersión en el infrarrojo se ha confirmado mediante imágenes de campo oscuro en el infrarrojo, tomografía de coherencia óptica y experimentos opto acústicos. En todos los casos, los datos experimentales confirman las conclusiones anteriores derivadas de los experimentos foto térmicos. También revelan el carácter multifuncional de estos GNPs que son capaces de una eficiente dispersión de la luz y generación acústica bajo excitación óptica infrarroja.

El extraordinario contraste proporcionado por las GNS ha permitido detectar nanopartículas individuales tanto en condiciones estáticas como dinámicas. Dadas todas estas características que las hacen potencialmente muy útiles, hemos seleccionado estas NP como candidatos para los siguientes pasos de funcionalización y obtención de imagen molecular.

Por otro lado, se ha explorado y demostrado la capacidad de los puntos cuánticos semiconductores (QDs), que emiten en la tercera ventana biológica, para la obtención de imágenes cardiovasculares multimodales. Se ha objetivado que los QDs emisores de infrarrojos son capaces de proporcionar un contraste simultáneo en la tomografía de coherencia óptica intracoronaria y en las imágenes de fluorescencia infrarroja, todo ello bajo una excitación láser de haz único de 1300nm de longitud de onda proporcionada por un catéter de OCT de uso clínico. Se ha demostrado que, cuando un único punto cuántico emisor de infrarrojos es excitado ópticamente por un fotón de 1300nm de longitud de onda, la radiación retrodispersada es lo suficientemente fuerte como para producir un contraste medible por un sistema clínico de OCT. Al mismo tiempo, los fotones absorbidos se reemiten eficazmente a 1550 nm, lo que hace posible su localización simultánea mediante imágenes de fluorescencia. Se ha demostrado también la obtención de imágenes duales de fluorescencia y tomografía de coherencia óptica tanto en suspensión coloidal como en tejidos. Además, una sencilla demostración de "prueba de concepto" a nivel *ex vivo* demostró el potencial real de los puntos cuánticos emisores de infrarrojos para la obtención de imágenes multimodales de las arterias, señalando la sinergia entre la obtención de imágenes por fluorescencia y la tomografía de coherencia óptica.

Finalmente, se ha demostrado la posibilidad de obtener señal de intensidad de luz negativa o contraste de OCT oscuro mediante la síntesis de NP de sulfato de cobre que han sido observadas mediante OCT tanto en disoluciones aisladas como en tejidos biológicos. Esto abre un nuevo campo de futuro para la obtención de señal potencial en tejidos de alta señal lumínica.

3 CAPÍTULO 3. SÍNTESIS Y DEMOSTRACIÓN DE EFICIENCIA DIAGNÓSTICA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS

3.1 DETECCIÓN CELULAR CON OCT TRAS MARCAJE INESPECÍFICO MEDIANTE NAOPARTÍCULAS INTERNALIZADAS

3.1.1 Motivación y objetivos

En los experimentos previos, hemos demostrado la capacidad de diferentes NP para producir contraste lumínico mediante OCT. En concreto, los GNS, que consisten en un núcleo de sílice dieléctrico de unos 200 nm y una cubierta metálica ultrafina de unos 15 nm, dieron lugar a la mayor intensidad del contraste para OCT gracias a su mayor retrodispersión a la frecuencia de emisión láser de la OCT. Basados en los hallazgos previos diseñamos una serie de experimentos para caracterizar el comportamiento de las GNS sin funcionalizar en líneas celulares de cultivo.

3.1.2 Material y métodos

Los experimentos se realizaron en dos líneas celulares diferentes: células HeLa y Jurkat. Las células HeLa constituyen una línea celular inmortal, ya que pueden dividirse muchas veces en la placa de cultivo celular en condiciones de supervivencia mínima. Por ello, han sido ampliamente utilizadas para la investigación científica. Además, como células cancerosas, son capaces de captar las NP por endocitosis. Por otro lado, las células Jurkat son linfocitos T y pueden encontrarse en el torrente sanguíneo. Estudios recientes han demostrado que desempeñan un papel importante en la protección contra las enfermedades cardiovasculares al responder a las señales inflamatorias [(136)]. Se obtuvieron imágenes de OCT de las dispersiones celulares tras exposición prolongada a GNS y se compararon con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de campo oscuro (DFM), con el fin de correlacionar inequívocamente el aumento de contraste observado en las imágenes de IV-OCT con la incorporación de GNS en las células vivas.

3.1.2.1 Estudios de citotoxicidad celular

Inicialmente se examinó la citotoxicidad utilizando varias concentraciones de GNS (0.05, 0.1, 0.5, 2.5, and 5 μg/mL) incubadas en células HeLa durante 24 h. Se utilizó el ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de los GNS, como se ha descrito en el capítulo anterior.

3.1.2.2 Imágenes OCT estáticas de células HeLa y Jurkat incubadas con GNS

Las células HeLa se incubaron con 2,5 μg/mL de GNS durante 24 horas, mientras que las células Jurkat se incubaron con 1,0 μg/mL de GNS durante 24 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados con objeto de eliminar el exceso de GNS, y posteriormente se dispersaron en PBS. A continuación, se inyectaron 200 μL de las células incubadas/solución PBS en un tubo que contenía el catéter IV-OCT. Para realizar una comparación, también se prepararon las siguientes muestras de control y se inyectaron en el tubo: solución PBS, 2,5 μg/mL de GNS en solución PBS y células HeLa y Jurkat no incubadas en solución PBS. La medición de la intensidad de señal lumínica en las imágenes obtenidas se realizó del modo previamente descrito con el software específico "Image J." Brevemente: cada gráfica se obtuvo analizando la intensidad de 120 imágenes tomadas a lo largo del tubo en diferentes puntos. Para garantizar la precisión, el experimento se repitió al menos 6 veces para cada concentración inyectando cada muestra y su duplicado (otra solución con la misma concentración de GNS) en el tubo, y moviendo el catéter IV-OCT a 3 posiciones diferentes a lo largo del tubo.

3.1.2.3 Confirmación de la internalización de las GNS mediante microscopía de campo oscuro y electrónica

La microscopía de campo oscuro (DFM), que recoge la luz dispersa producida por un espécimen, es una buena técnica para localizar y monitorizar buenos dispersores de luz, como las nanopartículas plasmónicas (137). Afortunadamente, debido a los amplios espectros de dispersión de los GNS de 600 a 1400 nm (como se discute en el capítulo 2), es posible usar una cámara visible para obtener imágenes de los GNS, y se espera que el color sea rojo. Posteriormente se realizó microscopía electrónica TEM de las muestras para confirmar de nuevo la internalización de las GNSs en las células.

3.1.2.4 Análisis de la eficiencia de internalización a diferentes concentraciones

Para ver cómo la eficiencia de internalización se ve afectada por la concentración de los GNS, se analizaron imágenes de OCT de células incubadas durante 24 horas con GNS a varias concentraciones (de 0,05 μg/mL a 5 μg/mL). Se utilizaron como control las mismas células sin exposición a GNS.

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Estudios de citotoxicidad celular

Para todas las concentraciones (0,05, 0,1, 0,5, 2,5 y 5 µg/mL), la viabilidad celular nunca fue inferior al 94% en relación con el control. Por lo tanto, los GNS no mostraron ninguna toxicidad relevante para las células HeLa en estas condiciones experimentales.

3.1.3.2 Imágenes OCT estáticas de células HeLa y Jurkat incubadas con GNS

Una vez comprobada la insignificante toxicidad de los GNS, se incubaron los GNS con células (HeLa y Jurkat) para evaluar su viabilidad como agentes de contraste de OCT. Tras la incubación prolongada y lavado, se realizaron la toma de imágenes de OCT de las diferentes soluciones. La Figura 40 muestra los resultados obtenidos.

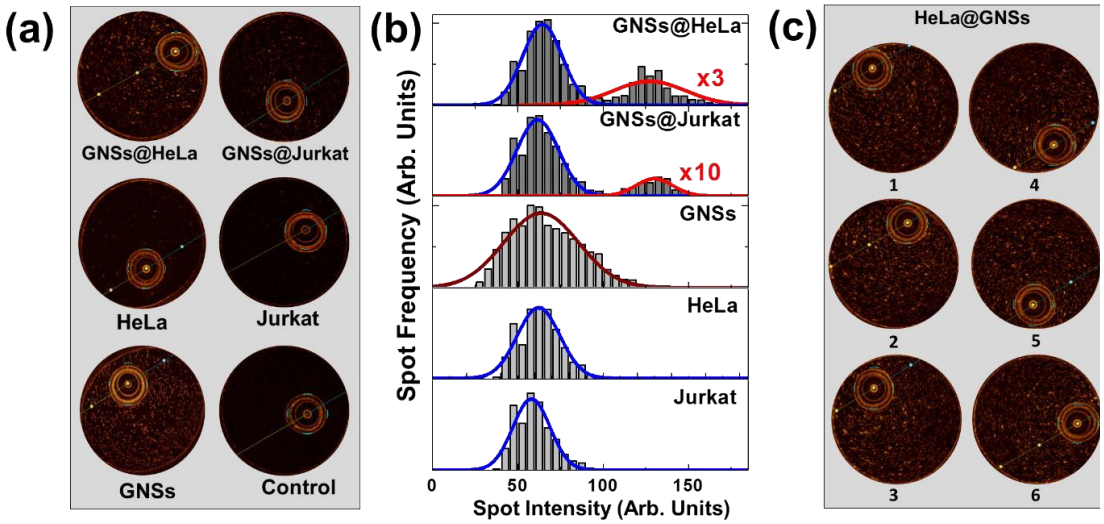


Figura 40. *(a) Imágenes de OCT de controles: GNSs suspendidas en PBS, células HeLa y Jurkat no incubadas en PBS, células HeLa y Jurkat incubadas durante 24 h con una dispersión de GNSs en PBS. (b) Histogramas de intensidad, calculados a partir de las imágenes IV-OCT. (c) Imágenes transversales representativas de OCT de células HeLa incubadas con 5 µg/mL de GNS durante 24 horas, obtenidas inyectando la muestra (1, 2 y 3) y su duplicado (4, 5 y 6) en el tubo en diferentes momentos, y moviendo el catéter de IV-OCT en 3 posiciones a lo largo del tubo.*

Como vimos en el capítulo anterior, incluso a bajas concentraciones, es posible identificar GNSs aisladas en la dilución. Los diferentes puntos brillantes en las imágenes transversales se deben a la luz retrodispersada del láser OCT producida por GNS individuales, las células individuales y las células individuales que contiene GNS. Los experimentos de repetición mostraron la reproducibilidad de las imágenes en las mismas condiciones. En el caso de la solución que contenía sólo GNS, se observó una distribución de apariencia gaussiana unimodal de la intensidad de los puntos, en torno a una intensidad de dominante de aproximadamente 65 Uarb con una DE de 50 Uarb. El análisis de las imágenes de OCT obtenidas de las soluciones de PBS que contienen células HeLa y Jurkat también muestran puntos brillantes de OCT, lo que demuestra la capacidad de la OCT para detectar células individuales. Los gráficos de puntos correspondientes también mostraron distribuciones gaussianas con picos de intensidad en torno a 59 Uarb y un FWHM cercano a 26 Uarb. Por lo tanto, cuando se comparó con el histograma de intensidades de señal de OCT proporcionado por las GNS coloidales, quedó claro que las células en suspensión (ya sea HeLa o Jurkat) producen distribuciones mucho más estrechas, con picos en intensidades de OCT ligeramente diferentes. Finalmente, el análisis de las imágenes de las células tras cultivo prolongado con GNS, mostró claramente la aparición de una serie de puntos de OCT con intensidades más altas que las obtenidas para las GNS individuales y para las células no incubadas. En estos casos, el histograma de intensidad puede describirse eficazmente mediante la superposición de dos distribuciones gaussianas, donde la contribución dominante corresponde a una distribución gaussiana centrada en 62 Uarb con DE de 25 Uarb. Como el pico de distribución se localiza en 65 Uarb para los GNS libres y en 59 Uarb para las células libres, podemos considerar que esta contribución está asociada a los GNS libres, a las células que no incorporaron GNS y a las células incubadas con varios GNS. La segunda distribución gaussiana presenta con un pico a unos 125 Uarb y una DE de 50 y 26 Uarb para las células HeLa y Jurkat, respectivamente. Esta segunda distribución gaussiana está asociada a las células que han internalizado los GNS, o a los GNS que se adhieren a las células durante el procedimiento de incubación. Obsérvese que en estos casos se espera que la señal de retrodispersión sea mayor, ya que representa dos contribuciones diferentes, es decir, las señales de retrodispersión producidas por la interfaz medio-célula y por los GNS intracelulares.

3.1.3.3 Confirmación de la internalización de las GNS mediante microscopía de campo oscuro y electrónica

Como puede apreciarse en la Figura 41, las imágenes de DFM obtenidas mostraron la presencia de GNSs en el tono rojo previsto. Las imágenes de DFM proporcionan pruebas sólidas de la incorporación de GNS tanto en las células HeLa como en las Jurkat Figura 41. De la misma manera, las imágenes de microscopía electrónica confirmaron la presencia de GNS en el interior del citoplasma celular de ambas líneas celulares.

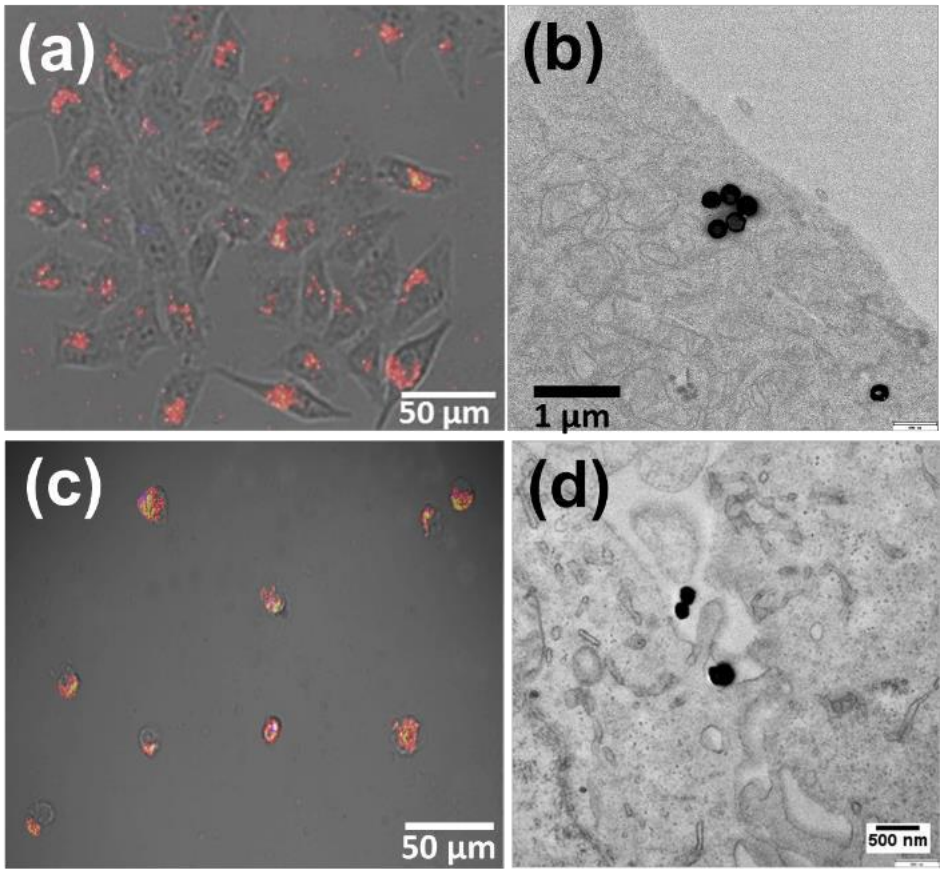


Figura 41. *Imágenes de microscopía de campo oscuro y de campo claro (fusionadas) de células HeLa (a) y Jurkat (c) incubadas en una solución de GNS en PBS a 2,5 y 1 µg/mL, respectivamente. Imagen TEM de una célula HeLa (b) y una célula Jurkat (d) incubadas en una solución de GNSs en PBS a 2,5 y 1 µg/mL, respectivamente. Se corrobora la incorporación intracelular de los GNS en las células.*

3.1.3.4 Análisis de la eficiencia de internalización a diferentes concentraciones

Como muestra la Figura 42, con el aumento de la concentración de GNS, aparecieron más número de puntos en las imágenes transversales y estos eran más brillantes.

Este experimento demuestra que la subpoblación de células HeLa que internaliza los GNS aumenta a medida que aumenta la concentración de GNS en el medio de cultivo. Las imágenes de OCT revelaron que para concentraciones de GNS inferiores a 0,5 µg/mL la eficiencia de internalización depende fuertemente de la concentración de GNS, mientras que, para concentraciones mayores, la eficiencia de internalización tiende a la saturación, por lo que solo depende ligeramente de la concentración de incubación. Curiosamente, el número de células incubadas de alta intensidad de señal (>120 Uarb) alcanza un máximo para la mayor concentración de GNS (2656) que es bastante similar

al mismo número de células HeLa (2735) en el control. Por lo tanto, se puede considerar que la OCT puede utilizarse eficazmente para la obtención de imágenes de células HeLa tras incubación con concentraciones superiores a 0,5 μg/mL de GNS. Curiosamente, en el caso de las células Jurkat, que presentan una capacidad de fagocitosis inferior a la de las células HeLa, las GNS se incorporaron a las células en una cantidad suficiente para aumentar la señal OCT, lo que permitió discriminar entre células individuales y células con GNS.

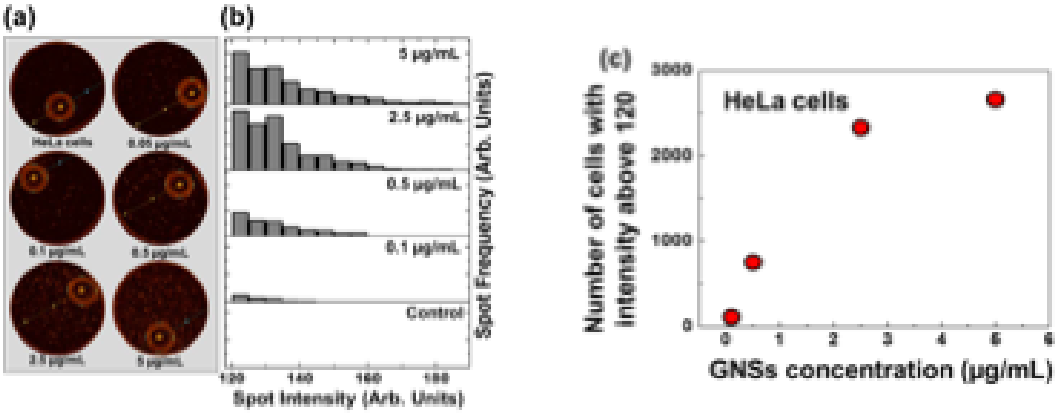


Figura 42. *(a) Imágenes transversales de IV-OCT de células HeLa no incubadas y de células HeLa incubadas durante 24 horas con varias concentraciones de GNS. (b) Histogramas de intensidad de esñal calculados a partir de las imágenes transversales de OCT para las intensidades de los puntos superiores a 120 Uarb. (c) Número de células con intensidad superior a 120 uarb generadas a partir de células HeLa incubadas con diversas concentraciones de GNS durante un tiempo fijo de 24 h.*

El análisis integrado de intensidad OCT mostró también una tendencia similar con el aumento de las concentraciones de GNSs observadas para las células HeLa incubadas.

Estos hallazgos fueron confirmados mediante DFM como se muestra en la Figura 43.

Las imágenes de DFM también revelaron que la eficiencia de los GNS en las células vivas aumenta monotónicamente a medida que aumenta la concentración de los GNS en el medio de cultivo. También se observa una tendencia a la saturación para concentraciones superiores a 0,5 μg/mL, en muy buena concordancia con los datos extraídos de las imágenes IOCT.

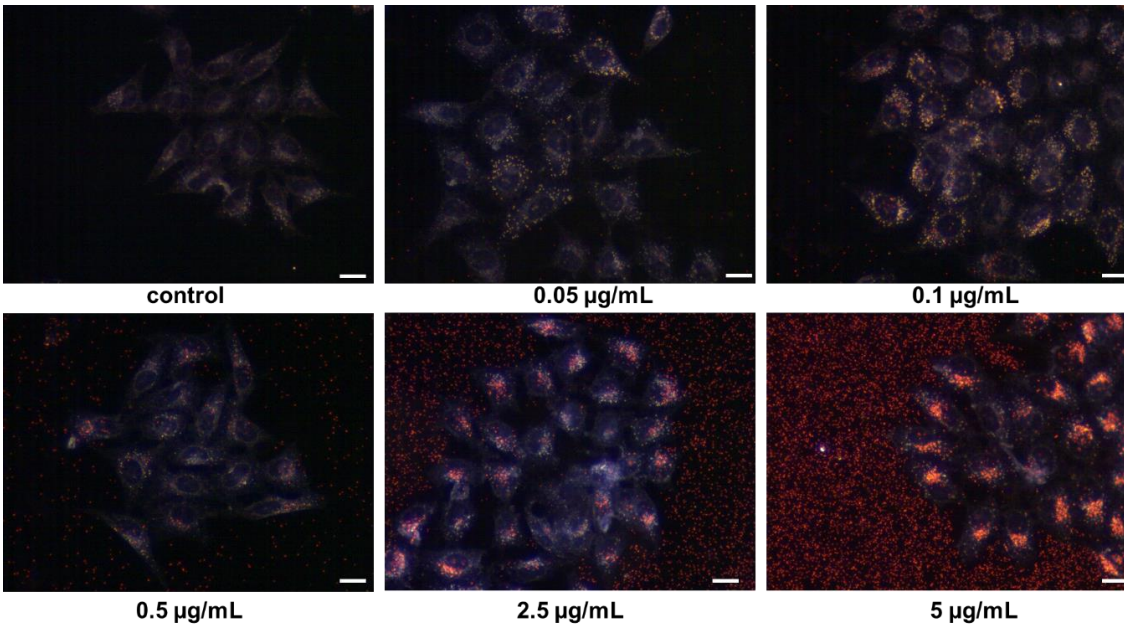


Figura 43. *Imágenes de microscopía de campo oscuro de células HeLa incubadas con varias concentraciones de GNS. El tiempo de incubación fue de 24 h en todos los casos. La barra de escala es de 20 µm.*

3.1.4 Conclusiones y discusión

Este grupo de experimentos ha demostrado cómo la OCT clínica permite la detección de células individuales suspendidas en fluidos biológicos. Se ha demostrado que la fagocitosis de GNS es segura y no causa citotoxicidad en las concentraciones estudiadas en dos estirpes celulares distintas (HeLA y Jurkat). Los resultados experimentales indicaron que el contraste de retrodispersión de las células individuales puede mejorarse sustancialmente mediante la incorporación intracelular de GNS específicamente diseñados con altas secciones transversales de dispersión en la longitud de onda de funcionamiento de la OCT (1320 nm). Por otro lado, el análisis detallado de los histogramas de intensidad de las imágenes de OCT permitió detectar las células vivas en las que se produjo la internalización de los GNS, y permitió estimar la eficacia de la internalización y su relación con la concentración de GNS en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron una excelente concordancia con los hallazgos derivados de los experimentos con imagen de microscopía de campo oscuro y electrónica. Dado que los GNS son fáciles de funcionalizar con biomoléculas para dirigirse a sitios celulares específicos, los resultados de este estudio proporcionan una nueva vía para la obtención de imágenes moleculares fiables mediante OCT y, por tanto, constituyen el primer paso hacia el desarrollo de nuevos procedimientos de diagnóstico a nivel clínico.

3.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ESTÁTICO MEDIANTE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS [138]

3.2.1 Antecedentes y motivación

Tras los datos obtenidos en los anteriores grupos de experimentos, hemos llegado a la conclusión de que las GNSs por su tamaño y propiedades de retrodispersión son capaces de ofrecer señal por OCT y visualizarse tanto en soluciones como tras su fagocitosis por células aisladas. El siguiente paso en nuestro proyecto es comprobar si es posible funcionalizar estas NP, es decir, incorporar una molécula capaz de adherirse selectivamente a la diana molecular que queremos localizar. Además, deberemos comprobar si la adición de los ligandos a las NP no altera sus propiedades ópticas. Finalmente, mediante un modelo in vitro de células de cordón umbilical y un modelo ex vivo en corazón infartado de ratón intentamos demostrar que existe adhesión específica de la NP funcionalizadas a su ligando específico y que la presencia de estas NP, específicamente adheridas a la diana molecular seleccionadas aportan señal extra en la imagen OCT.

Tras el estudio exhaustivo de los diferentes potenciales dianas moleculares, descritas en el Capítulo 1, y basados en las características de nuestro modelo experimental, decidimos utilizar dos dianas moleculares que se han mostrado repetidamente en la literatura sobre expresadas tras el daño isquémico cardiaco:

- Molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1): Esta proteína se expresa en la superficie de varios tipos celulares. Su principal función es facilitar la adhesión y migración de los leucocitos a las zonas de tejido con inflamación. Se ha demostrado una sobrerregulación con aumento del RNAm como de la proteína en superficie en respuesta a la isquemia transitoria, tanto en el endotelio arterial y venoso coronario como en los cardiomiocitos [139][140]. Esta regulación está mediada por un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6, el TNF-α o la IL-1β [141]. Su sobreexpresión se ha asociado en modelos animales a un aumento del tamaño del infarto [142].
- Fosfatidilserina (PS): Se trata de un fosfolípido de la membrana celular, habitualmente orientado hacia el lado interno (citosólico) en las células viables y que cuando se externaliza es un marcador de apoptosis. La apoptosis tiene lugar durante la reperfusión y se asocia con la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana, que es uno de los principales mecanismos que permiten a los macrófagos reconocer las células que sufren apoptosis [143]. La remodelación de la membrana celular en las células apoptóticas se asocia con una reducción de la amino-translocasa de fosfolípidos lo que provoca la translocación de fosfolípidos como la PS y la fosfatidiletanolamina en la cubierta exterior de la membrana

celular [144]. Esta translocación hace posible el reconocimiento de PS por los macrófagos para eliminar rápidamente las células apoptóticas.

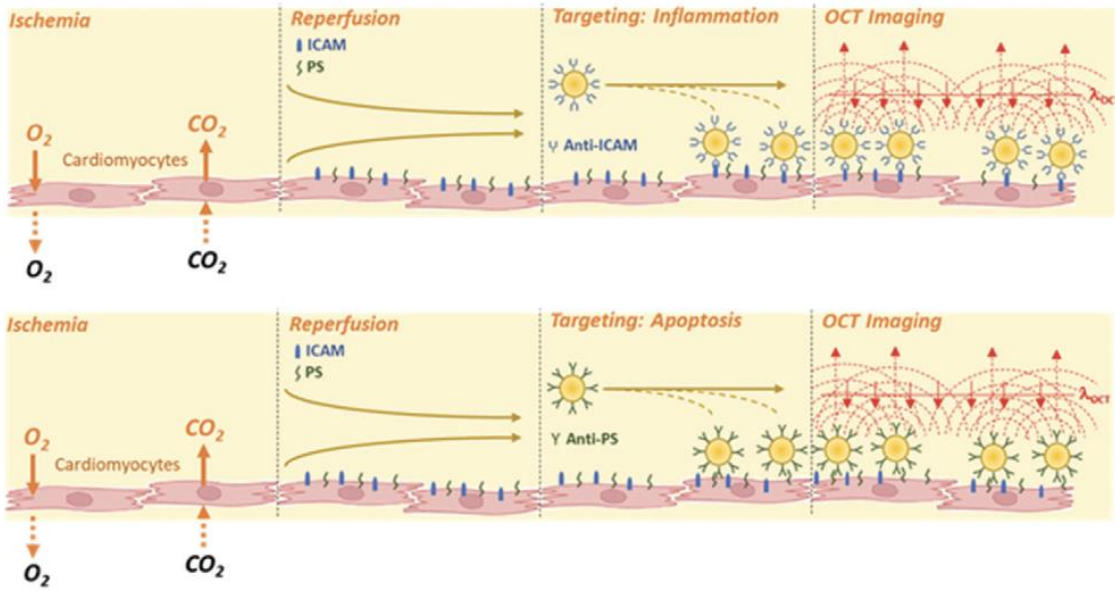


Figura 44. *Representación esquemática del objetivo de este grupo de experimentos.*

3.2.2 Material y métodos

Para este grupo de trabajos experimentales, utilizamos GNSs caracterizados previamente. Consisten en un núcleo de sílice de 200 nm de diámetro rodeado por una cubierta de oro de 20 nm de espesor. Estos GNSs muestran una amplia banda de extinción plasmónica que abarca desde visible hasta el infrarrojo, lo que conduce a un alto coeficiente de extinción en la longitud de onda de funcionamiento de los sistemas OCT vasculares (1320 nm).

3.2.2.1 Funcionalización de GNS con péptido anti-ICAM1

Inicialmente, la solución de GNSs recubiertas con ácido lipoico (10 mL, 0,5 mg) en PBS fue centrifugada (4000 rpm, 30 min) y lavada dos veces con DMSO (1,5 mL). Posteriormente se añadió a la mezcla NHS (5,66 mg; 49,18 µmol) y EDC (5,98 mg; 38,55 µmol). Se alternó una sonicación y agitación cuidadosa durante 30 minutos. A continuación, la dispersión se centrifugó (4000 rpm, 20 min), se lavó dos veces con DMSO (1,5 mL), y luego se eliminó el disolvente sobrenadante y los GNS activados se

dispersaron en tampón de borato (1,5 mL, pH 8) y se sonicaron. Se añadió el péptido cLABL (cyclo (1,12) PenITDGEATDSGC 0,33 mg, 0,28 μmol) y, tras sonicar durante 30 minutos, la mezcla se agitó durante toda la noche antes de enfriarla con unas gotas de glicina 1 M y agitarla durante otros 30 minutos. Finalmente, la mezcla se centrifugó (4000 rpm; 30 min), se lavó dos veces con PBS (2 y 1,5 mL) y se volvió a dispersar cuidadosamente en PBS (10 mL).

3.2.2.2 Funcionalización de GNS con péptido anti-PS

Para la biofuncionalización anti-PS, se emplearon dispersiones de GNS en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración inicial de 0,05 mg mL-1 (8,5 × 108 partículas mL-1), PEG carboxil tiolado (CT-PEG 12) de Thermo Scientific con un PM de 634,77 y una concentración de stock de 0,105 m. El PEG fue disuelto con 1,5 mL de agua de grado MilliQ. Posteriormente, se preparó el tampón de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) con un 2% p/v de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y un 3% p/v de N-hidroxisuccinimida (NHS) en PBS y anti-PS de Merck Millipore (1 mg mL-1). En primer lugar, se procedió a la PEGilación de las nanoesferas de oro de acuerdo con los siguientes pasos:1) 1,5 mL de CTPEG diluido en agua (con una concentración final de 0,01 m) se añadió en una proporción 1:1 a un vial de vidrio que contenía 5 mL de una dispersión de GNS/PBS (0,05 mg mL-1) bajo sonicación. Esta mezcla se sonicó durante 5 minutos, y luego se agitó magnéticamente durante 1 hora a temperatura ambiente con una velocidad de unos 760 rpm) Los GNSs PEGilados fueron transferidos a un tubo Eppendorf y centrifugado a 5600 rpm durante 10 minutos. Luego se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con agua y se volvió a dispersar bajo sonicación. El ciclo de lavado se realizó tres veces para eliminar el exceso de PEG.3) El pellet final se redispersó con 5 mL de solución salina equilibrada de Hank. Luego se extrajo una alícuota de 1 mL para su caracterización por FTIR y DLS. Tras la PEGilación, se procedió a la conjugación del anticuerpo anti-PS (aPS) con las nanoshells: 1) En un vial de vidrio, bajo una campana de estéril, se mezclaron 4 mL del GNS-PEG con 400 μL de tampón EDAC. Se añadieron lentamente 40 μL de solución anti-PS a esta mezcla (proporción 1:0,1:0,01).2) La dispersión se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 2 h a una velocidad de 760 rpm.3) A las 2 h, la reacción se amortiguó con 80 μL de hidroxilamina de 1 m durante 10 min.4) La solución se transfirió a tubos eppendorf de 1 mL y se centrifugó durante 10 minutos a 5600 rpm. El sobrenadante fue descartado, el pellet fue lavado con PBS, y se volvió a dispersar bajo sonicación. El ciclo de lavado se repitió tres veces. El pellet final se volvió a dispersar en un total de 5 mL de PBS y se almacenó a 4 °C. Al ampliar la producción de GNS-anti-PS, se utilizaron las mismas proporciones de reactivos mencionadas anteriormente.

3.2.2.3 Comprobación de persistencia de propiedades ópticas de las GNS funcionalizadas

Se realizó con la misma técnica que la expuesta previamente en el Capítulo 2, una valoración de la espectrometría de infrarrojo de los GNS, antes de la funcionalización (es decir, sólo con ácido lipoico en su superficie), y después de la funcionalización anti-ICAM- 1 y la funcionalización anti-PS. La Figura 45 muestra los resultados obtenidos.

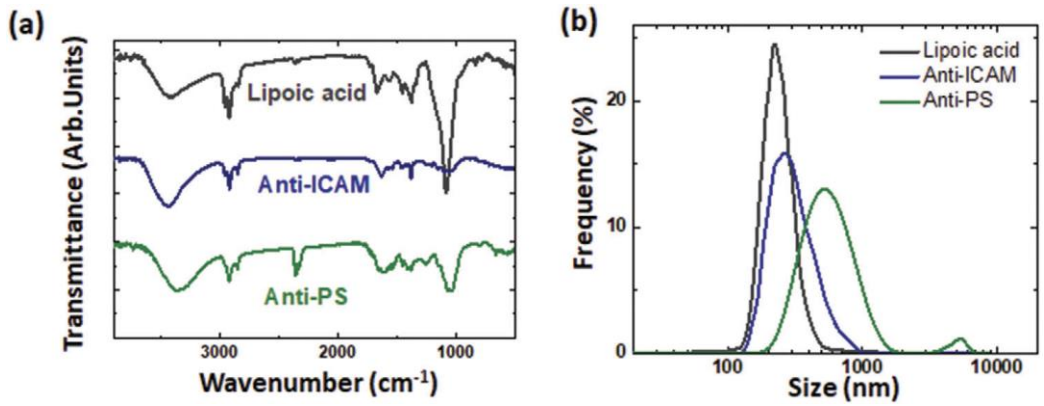


Figura 45. *(a) Espectros FTIR correspondientes a los tres tipos de nanoshells de oro utilizados a lo largo de este trabajo revelando su diferente decoración superficial. b) Espectros DLS obtenidos para las GNS antes (recubiertas de ácido lipoico) y después de la funcionalización anti-PS y anti-ICAM-1.*

La funcionalización anti-ICAM-1 y anti-PS aumentó el radio hidrodinámico hasta unos 300 y unos 600 nm, respectivamente. A pesar de este incremento sustancial en el tamaño hidrodinámico, los GNS bio-funcionalizados mantuvieron su carácter coloidal estable, sin evidencia de aglomeración durante semanas.

3.2.2.4 Comprobación de la selectividad de adhesión de nanopartículas funcionalizadas

Para verificar la especificidad molecular de los GNS anti-PS, se llevaron a cabo experimentos in vitro con células endoteliales (células endoteliales humanas de la vena umbilical). Se compararon las imágenes de microscopía de campo oscuro de células sanas y apoptóticas (tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) después de ser incubadas con el producto funcionalizado (anti-PS) y con GNS funcionalizados (anti-PS) y no funcionalizados.

3.2.2.5 Inducción de isquemia-reperfusión en corazón de rata mediante modelo de Langendorff

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (unos 300 g de peso), que fueron alimentadas ad libitum con un pienso estándar con un ciclo de luz de 12 horas y en condiciones controladas de humedad (50-60%) y temperatura (22-24 °C).

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Autónoma de Madrid (número de aprobación CEI-83-1537).

Los corazones se extrajeron de ratas anestesiadas y se realizó eutanasia con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg kg-1) tras una inyección intravenosa de heparina (1000 UI). Se canularon los corazones a través de la aorta y se sometieron a perfusión retrógrada (11-15 mL min-1, 70 mmHg) con tampón Krebs-Henseleit (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono y pH de 7,3). La perfusión coronaria y las presiones del ventrículo izquierdo se midieron a través de un transductor conectado lateralmente a la cánula de perfusión y a través de un balón de látex insertado en el ventrículo izquierdo, respectivamente. Tras 30 minutos de estabilidad hemodinámica, se indujo una isquemia parcial mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior. La arteria se mantuvo ocluida durante 15, 30, 45 o 60 minutos. Posteriormente, se soltó la ligadura y el corazón se sometió a 30 minutos de reperfusión. Por último, el sistema de perfusión se modificó a un circuito cerrado, en el que una dispersión que contenía 1 mL de una dispersión coloidal de GNS en PBS (0,035 mg mL-1) se mantuvo circulando con un volumen residual de 9 mL durante otros 45 minutos. También se estudió un corazón de control, sin periodo de isquemia a efectos de comparación. En este caso, la perfusión se realizó con una solución de vehículo (es decir, sin GNS).

Tras 60 minutos de isquemia y 45 de reperfusión en el sistema Langendorff, los corazones se congelaron durante 1 hora a -20 °C. A continuación, se cortaron transversalmente en cortes de 1 mm y se incubaron con cloruro de trifenil tetrazolio (T-8877, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1% en PBS durante 25 minutos a 37 °C. A continuación, los cortes se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA) durante una noche a 4 °C. Las imágenes se adquirieron con un microscopio estereoscópico (SMZ645, Nikon, Tokio, Japón)

3.2.2.6 Comprobación de la sobreexpresión de ICAM-1 en corazón isquémico mediante Western Blot

Se utilizaron 100 mg de de tejido cardíaco hogeneizado. Tras la centrifugación (12 000 rpm, 4 °C, 20 min), se recogió el sobrenadante y se determinó el contenido total de proteínas mediante el ensayo de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para cada determinación de proteínas, se cargaron 100 μg de proteína total en cada pocillo y se sometieron a electroforesis utilizando geles de acrilamida (8-12%) y de dodecil-sulfato

de sodio (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). Después, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). La eficacia de la transferencia se determinó mediante la tinción de rojo Ponceau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). A continuación, las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con que contenía un 5% p/v de leche desnatada desecada y se incubaron con el anticuerpo primario contra ICAM-1 (Abcam #ab-33894; 1:1000). Las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:2000; Pierce, Rockford, IL, USA). La actividad de la peroxidasa se visualizó por quimioluminiscencia y se cuantificó por densitometría utilizando BioRadMolecular Imager ChemiDoc XRS System (Hércules, CA, USA). Por último, para normalizar cada muestra en función de la variabilidad de la carga del gel, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario contra la proteína constitutiva GAPDH (1:1000; Ambion Life Technologies, Waltham, MA, USA). Para cada muestra, se calcularon los niveles de expresión proteica relativa en relación con los niveles de expresión proteica en los corazones no isquémicos.

3.2.2.7 Comprobación del aumento de señal mediante OCT con las GNP funcionalizadas

Se utilizó para la obtención de imágenes un catéter de uso clínico habitual (DragonFly Optis, Abbott), que se introdujo en la cavidad ventricular rellena de suero salino de los corazones a estudio según el montaje de la Figura 46.

De cara a poder analizar y comparar las intensidades de OCT en las diferentes muestras, se definieron los siguientes parámetros:

- Intensidad de OCT promediada en función de la profundidad: estos perfiles corresponden a una media de diez perfiles de profundidad de intensidad radial individuales.
- Señal integrada de OCT: Para cuantificar la intensidad total de la OCT en el miocardio sano y miocardio infartado, definimos la señal OCT integrada como $IOCT = \int IOCT\,(z)\,dz$, donde IOCT(z) es la intensidad de la OCT en la profundidad z (z va de 0 hasta 2 mm).
- Contraste de OCT normalizado (ΔInorm OCT): Definido como la intensidad de la señal mediana de OCT en tejido infartado frente a la misma del tejido sano, corregida por la intensidad del tejido sano.

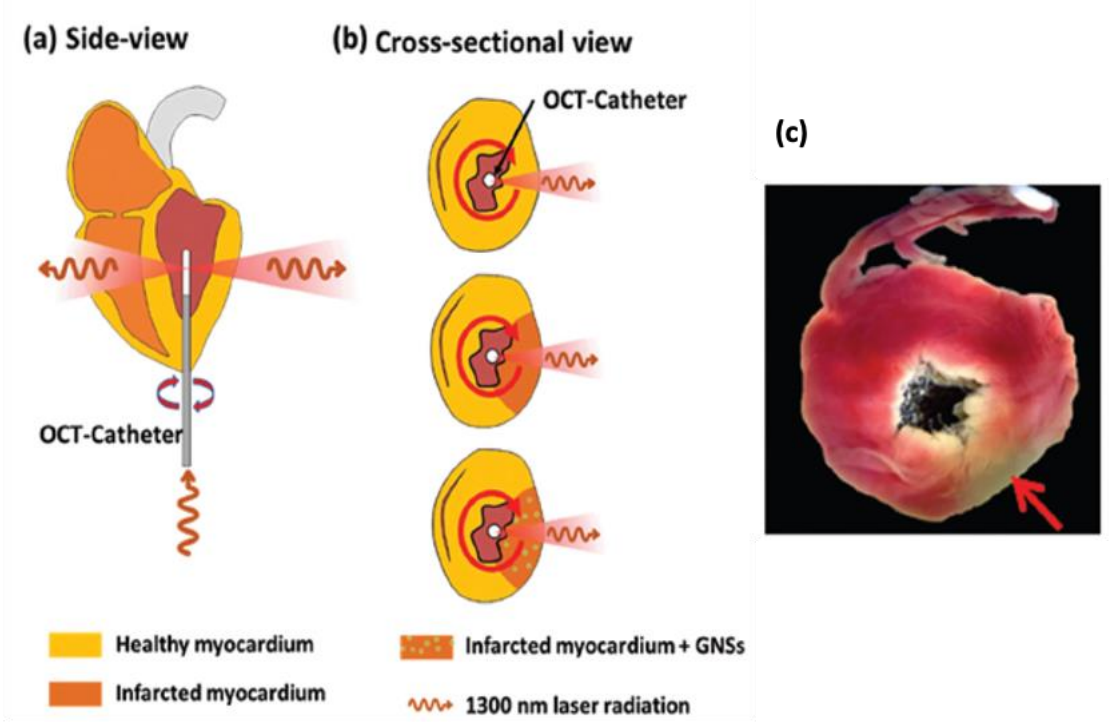


Figura 46. *(a y b) Montaje para la obtención de imágenes con un catéter de uso clínico habitual (DragonFly Optis, Abbott), introducido en la cavidad ventricular rellena de suero salino. (c) Muestra macroscópica del corazón tras la lesión isquémica.*

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Comprobación de la selectividad de adhesión de nanopartículas funcionalizadas

En los experimentos *in vitro* con células endoteliales humanas, se compararon las imágenes de microscopía de campo oscuro de células sanas y apoptóticas (después de ser incubadas con el producto funcionalizado (anti-PS) y con GNS funcionalizados (anti-PS) y no funcionalizados. Como puede verse en la Figura 47, se produjo una clara adhesión selectiva de las GNS funcionalizadas a la PS de las células sometidas a apoptosis. La mayor cantidad de GNS (manchas rojas) adheridas a las células endoteliales se encontró en el cultivo en el que se indujo apoptosis incubado con anti-PS funcionalizados con GNSs.

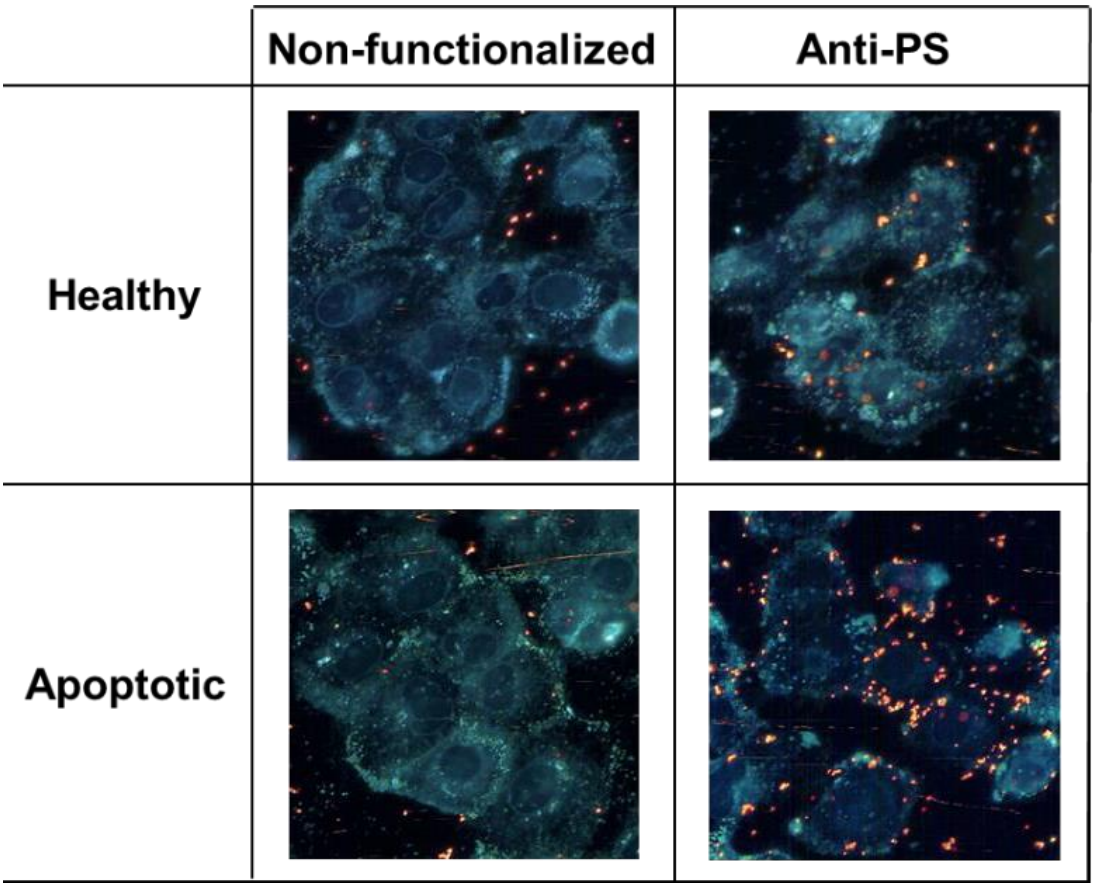


Figura 47. *Imágenes de microscopía de campo oscuro de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) sanas y apoptóticas tras 1h 30min de incubación con GNS no funcionalizadas (recubiertas de PEG) y con GNS funcionalizadas anti-PS. Los puntos rojos corresponden a los GNSs adheridos a las células.*

3.2.3.2 Comprobación de la sobreexpresión de ICAM-1 en corazón isquémico mediante Western Blot

Con el fin de confirmar la sobreexpresión de ICAM-1 en el tejido miocárdico tras un evento isquémico, medimos mediante análisis de Western Blot el contenido de proteína ICAM-1 en los corazones de control y en los corazones sometidos a isquemia-reperfusión local (IR) durante 15, 30, 45 o 60 min. Se objetivó una ligera, pero significativa, sobreexpresión de ICAM-1 en los corazones isquémicos en comparación con los controles (Figura 48).

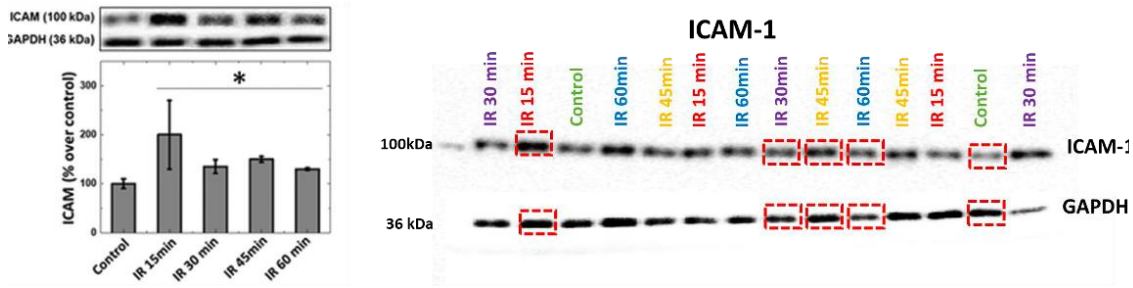


Figura 48. *Contenido proteico de ICAM-1 en el tejido miocárdico de corazones sometidos a duraciones crecientes de isquemia coronaria (15, 30, 45 y 60 minutos). Los valores están representados por la media ± SEM (n = 5 corazones por grupo).*

3.2.3.3 Comprobación del aumento de señal mediante OCT con las GNP funcionalizadas

De manera subjetiva, se aprecia una señal similar en tejido sano e infartado en los pacientes sin GNS. También subjetivamente se produce un aumento de intensidad de señal, con mayor intensidad en la zona lesionada en el grupo con anti-ICAM1-GNS (Figura 49).

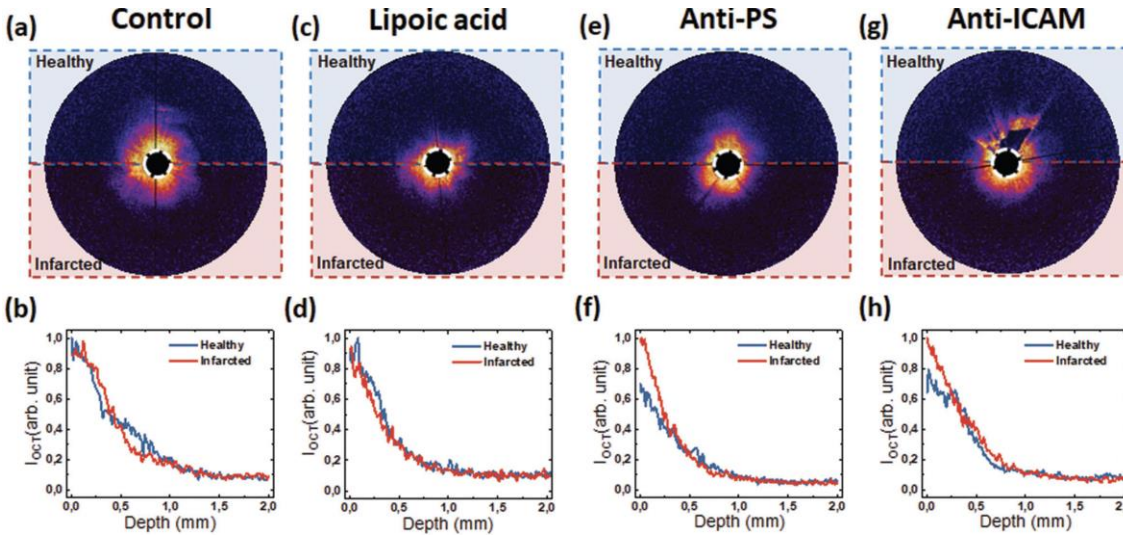


Figura 49. *Imágenes comparativas de OCT en sección transversal de tejidos sanos e infartados después de la reperfusión con; (a) control; (c) GNS recubiertas de ácido lipoico (no funcionalizadas); (e) GNS funcionalizadas anti-PS; y (g) GNS funcionalizadas anti-ICAM-1 (péptido). (b, d, f, h) Los perfiles de profundidad de la señal OCT promediada calculados a partir del análisis de la señal OCT en diez escaneos radiales.*

En el corazón de control (es decir, sin GNS postinfarto perfusión), hemos estimado que las señales OCT integradas en los tejidos sanos e infartados son IOCT (sano) = 0,80 ± 0,07 e IOCT (Inf) = 0,76 ± 0,04, respectivamente (p>0,5). Para el corazón de control, encontramos valores de ΔInorm OCT ≈ -4,9% (figura 50b). Por lo tanto, el análisis cuidadoso de los perfiles de profundidad revela que la intensidad de la OCT es ligeramente mayor en los tejidos sanos. En ausencia de cualquier agente de contraste exógeno la señal de la OCT proporcionada por un tejido determinado depende de sus propiedades de dispersión y de extinción. Por lo tanto, los datos experimentales sugieren que el coeficiente de retrodispersión del miocardio disminuye debido al evento isquémico.

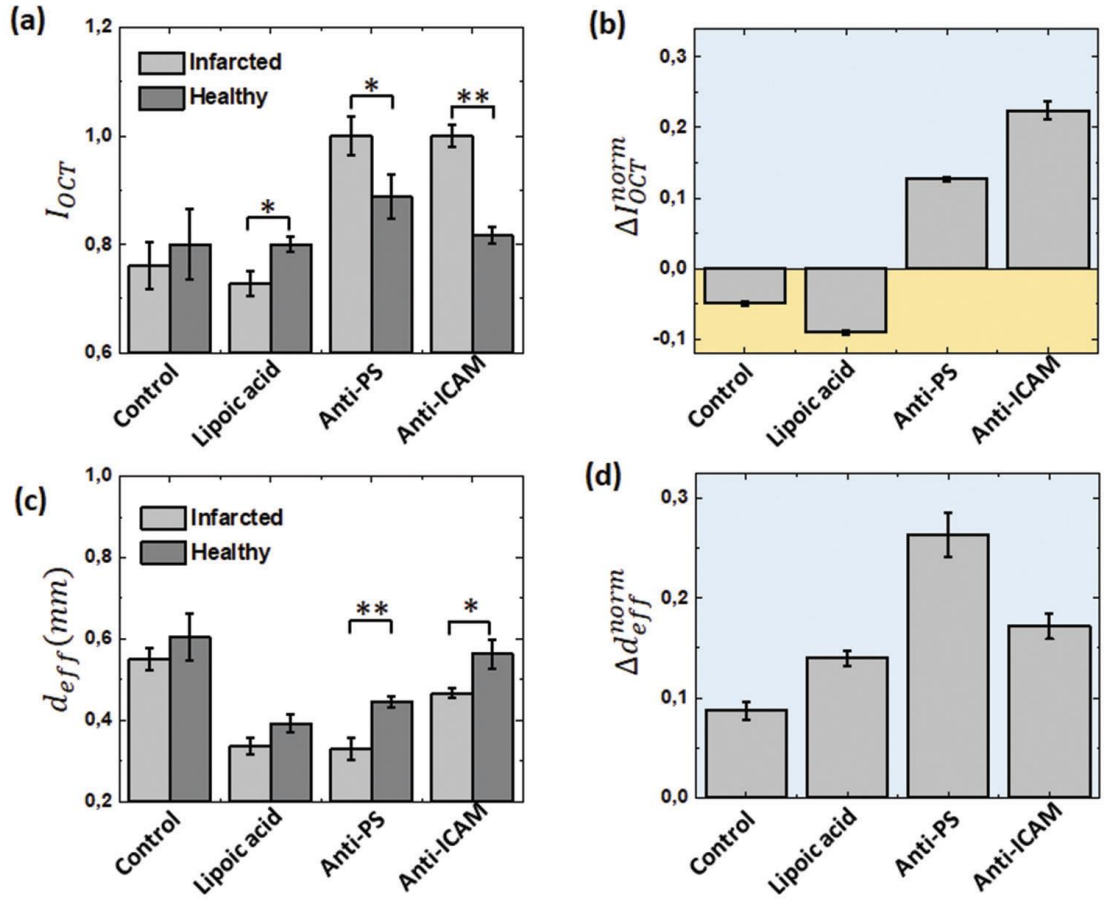


Figura 50. *(a) Señal OCT integrada correspondiente a tejidos miocárdicos sanos e infartados obtenidos en corazones sometidos a un infarto agudo de miocardio (infartado) y perfundidos con un vehículo (control) y con una solución que contenía GNS no funcionalizadas (Lipoic acid), o nanoesferas de oro recubiertas de anti-PS o anti-ICAM-1 durante la reperfusión. b) Contraste OCT normalizado entre los tejidos infartados y los sanos, obtenido de corazones sometidos a un infarto agudo de miocardio. c) Longitud de penetración efectiva calculada de la señal OCT. d) Representación de los datos de (c) tras la normalización. Se indican las diferencias estadísticas significativas determinadas por la prueba t de muestras pareadas (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01).*

Como segundo control, se ha probado la acumulación de GNS no funcionalizados. Para ello, se ha tomado una imagen de un corazón sometido a una perfusión de dispersión de GNSs recubiertas de ácido lipoico. El ácido lipoico no proporciona una funcionalización específica además de mejorar la estabilidad coloidal acuosa de los GNS. Un análisis más detallado de estos perfiles verifica la ligera de los tejidos sanos en el corazón de control (solución vehicular), como se observa en la Figura 50a. Al igual que en el control previo sin NP, se observa una mayor intensidad de señal, en este caso estadísticamente significativa, en el miocardio sano (Figura 50a). En particular, IOCT (inf) = 0,73 ± 0,02 y IOCT (sano) = 0,80 ± 0,01, lo que conduce a un contraste OCT normalizado de ΔInorm OCT ≈ -9%.

En caso de los corazones perfundidos con anti-PS GNSs, el tejido infartado muestra una señal de OCT mayor que que el sano, lo que indica una mayor señal de retrodispersión de la luz IR. Atribuimos la mayor señal de la OCT a la presencia de los GNS funcionalizados con anti-PS y a su de dispersión a la longitud de onda de la OCT. En este caso la señal de la OCT tiene en cuenta la señal de retrodispersión generada generada por los tejidos más la generada por los GNS adheridos a los cardiomiocitos dañados. Dicha adhesión revela el daño celular (apoptosis) causado por el evento isquémico. El análisis mediante software de imagen de los perfiles conduce a IOCT (inf) = 1 ± 0,03 e IOCT (control) = 0,89 ± 0,04, (p=0,03). El contraste OCT normalizado es ΔInorm OCT ≈ +13%. A diferencia de los controles, se objetiva significativamente mayor contraste en la zona lesionada que en el tejido sano.

Finalmente, el análisis de los tejidos perfundidos con anti-ICAM1-GNSs mostró resultados similares a la funcionalización anti-PS y significativamente diferentes a los del grupo control. La perfusión con GNS funcionalizados proporciona una clara mejora de la señal OCT generada en los sitios de los tejidos miocárdicos infartados con respecto con respecto a los sanos. De hecho, el análisis de los datos experimentales conduce a IOCT (inf) = 1,00 ± 0,02 y IOCT (control) = 0,82 ± 0,01, (p<0,001). El contraste de OCT normalizado fue de ΔInorm OCT ≈ +22% (p=0,04).

En resumen, parece que, en el miocardio infartado, tanto la funcionalización anti-ICAM-1 como la anti-PS producen un aumento en la señal de la OCT.

3.2.4 Conclusiones y discusión

Mediante este trabajo experimental, se ha explorado la capacidad de las nanoesferas de oro biofuncionalizadas para obtener imagen molecular usando como tejido de muestra el miocardio de rata infartado y usando como control tejido sano del mismo corazón. Se han seguido dos estrategias diferentes: la inflamación y la apoptosis, que tienen lugar simultáneamente en los cardiomiocitos después de un evento isquémico. Para este fin, las GNS han sido funcionalizadas adecuadamente para dotarlas de afinidad específica a los cardiomiocitos que sobreexpresan las proteínas de membrana ICAM-1 o PS. Los principales hallazgos que hemos obtenido son:

- Los resultados *ex vivo* en demuestran la capacidad de ambas funcionalizaciones para permitir la adhesión selectiva de GNSs en los tejidos miocárdicos dañados.

- Esta adhesión y acumulación selectiva provoca un aumento de la intensidad de la luz retrodispersada y, por lo tanto, hace que el tejido diana sea visible por un equipo clínico convencional de OCT intravascular.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la diferencia en la señal a simple vista es difícil de detectar. Esto puede deberse a una alta intensidad de señal basal, que hace más complicado detectar pequeños aumentos en esta. Para solucionar este problema hemos desarrollado dos enfoques diferentes basados en la detección de señal lumínica con software dedicado: o bien mediante el análisis de la señal total de la OCT o mediante la determinación de la longitud de penetración de la radiación OCT en los tejidos. Este análisis mediante software de imagen dedicado nos ha permitido detectar las diferencias de señal de OCT debida a los GNS funcionalizadas. Por otro lado, cabe destacar que este experimento se ha diseñado como "prueba de concepto" ya que el objetivo final es obtener imagen intracoronaria y no miocárdica como se ha realizado y que será el objetivo del siguiente grupo de experimentos. No obstante, hemos conseguido demostrar por primera vez la eficacia de la funcionalización que permite la adhesión selectiva de las NP marcadas contra la diana molecular que queremos estudiar y, además, hemos comprobado que es posible obtener señal lumínica gracias a estas NP.

4 CAPÍTULO 4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR *IN VITRO* MEDIANTE OCT Y USO DE NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS EN ENDOTELIO ARTERIAL HUMANO BAJO CONDICIONES DE FLUJO

4.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

El paso final planteado para esta serie de experimentos en busca del diagnóstico molecular de la enfermedad coronaria mediante la combinación de la OCT, técnica diagnóstica de mayor resolución espacial de uso clínico habitual, y la adhesión específica de NP funcionalizadas que den señal lumínica en OCT, es la comprobación del aumento de señal lumínica tras expresión y adhesión a moléculas diana. Además, la característica inherente del diagnóstico intracoronario, a diferencia de lo que ocurre en otros órganos con flujo capilar lento, es la presencia de un flujo sanguíneo arterial muy elevado, que compromete el tiempo de exposición de las NP funcionalizadas y hace aún más compleja la posibilidad de adhesión. Por lo tanto, diseñamos un grupo de experimentos enfocados a demostrar la capacidad de las NP funcionalizadas a presentar adhesión específica en condiciones lo más similares posibles al flujo sanguíneo arterial coronario.

Tras analizar los diferentes potenciales tejidos o células dianas para enfocar el diagnóstico molecular de la enfermedad coronaria en sus diferentes estados evolutivos, finalmente nos enfocamos en el endotelio arterial coronario. La razón fundamental es la posibilidad de realizar una inyección directa intracoronaria en el lecho arterial específico a estudiar de las NP funcionalizadas. La elección de células o moléculas subintimales requeriría la administración previa inespecífica e intravenosa (horas/días) de las NP para su ulterior distribución por el organismo. Además, esta última opción requeriría concentraciones de NP más elevadas para que alcanzaran la concentración umbral para ser detectadas. Por lo tanto, centramos nuestro objetivo en la posibilidad de detectar moléculas específicas mediante OCT en el endotelio arterial humano. Esto conlleva dos problemas frente a otros tejidos: por un lado, el ya citado flujo arterial coronario con gran limitación en el tiempo de exposición de las NP funcionalizadas a su ligando; por otro lado, la interfaz entre la luz arterial luminotransparente y la aparición de la primera capa tisular, da lugar a una mayor retrodispersión de la radiación láser y, por lo tanto, la capa endotelial es muy brillante en las imágenes reconstruidas de OCT. Esta elevada señal hace más complejo la posibilidad de aumentar el brillo con las NP adheridas.

Como observamos en los trabajos del capítulo 2, las GNS parecen las NP ideales por sus características físicas. Estas consisten en un núcleo de SiO2 (de unos 200 nm) rodeado de una fina capa de oro (de unos 15nm), produciendo la mayor sección transversal de dispersión (unos 5x10-10cm2) a la longitud de onda de la OCT y, por tanto, el mayor contraste en los dispositivos de intervención cardiovascular [(126)].

Las moléculas de adhesión celular son especialmente relevantes, ya que facilitan el reclutamiento de leucocitos en la pared del vaso. La molécula de adhesión intercelular está presente sobre todo en pequeñas concentraciones como proteína transmembrana en los leucocitos y las células endoteliales. Forma parte de la respuesta inmunitaria (inflamación), y su activación y aumento de expresión permite a los leucocitos unirse a las células endoteliales a través del antígeno-1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1) [(145)]. Por lo tanto, la proteína LFA-1 puede ser de utilidad para ligar selectivamente las

nanopartículas a las células que sobreexpresan altos niveles de ICAM-1 en la superficie. El empleo de péptidos o anticuerpos para la fijación tiene algunas limitaciones, como la dificultad para la obtención de materiales puros (mediante clonación, sobreexpresión o síntesis) y mantener la estabilidad estructural y funcional. Por ello, uno de los principales esfuerzos de la industria farmacéutica es el desarrollo de pequeños inhibidores peptídicos para un determinado receptor diana. Se ha demostrado previamente que el péptido cíclico (1, 12) PenITDGEATDSGC (abreviado cLABL), una secuencia peptídica de unión obtenida del dominio I de la subunidad α de LFA-1, y posee una alta avidez por los receptores ICAM-1 sobre-expresados en la superficie celular [(146)(147)]. Este péptido parece ideal por sus características químicas para su unión a los GNS dirigidas contra ICAM1.

Hemos desarrollado un protocolo prospectivo sistemático para investigar la eficiencia de adhesión específica in vitro de las anti-ICAM1-GNSs a las células endoteliales en condiciones tanto estáticas como dinámicas. Para ello, primero utilizamos la microscopía de campo oscuro (DFM) para determinar la eficiencia de adhesión de los GNSs funcionalizadas a las células endoteliales tras activación inflamatoria mediante TNF-α en condiciones estáticas y dinámicas. Los resultados obtenidos mediante DFM se corroboran después mediante OCT (Figura 51).

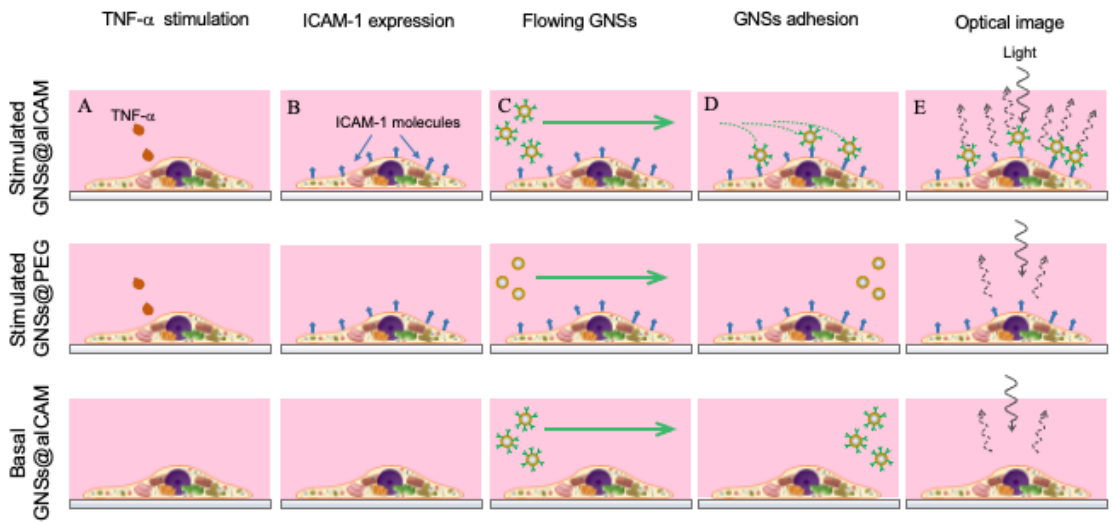


Figura 51. *Representación gráfica de los objetivos propuestos en este trabajo. Fila superior: Tras la estimulación con TNF, se produce una sobreexpresión de ICAM1, molécula a la que se adhieren las anti-ICAM1-GNP y generan señal por OCT. La segunda fila representa el control con células endoteliales estimuladas con TNF a las que se aplican GNS sin funcionalizar. En la fila inferior se representa el control con células endoteliales sin estimulación de TNF en las que la unión de las anti-ICAM1-GNS debería ser menos, al expresar menor número de receptores y, por lo tanto, deberían tener una señal de OCT de menor intensidad.*

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Funcionalización de GNS mediante unión al péptido anti ICAM-1

Las nanoesferas de oro (núcleo de sílice de 198 nm/carcasa de oro de 16 nm) recubiertas de ácido lipoico) se funcionalizaron con el péptido cíclico (1,12) PenITDGEATDSGC (cLABL) Para obtener la funcionalización, 0,5 mg de GNSs comerciales recubiertas de ácido lipoide (nanoComposix, San Diego, CA, USA) se centrifugaron en PBS y se dispersaron en dimetilsulfóxido (DMSO). La solución se incubó con 6,8 µL de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida (EDC) y 11,31 mg de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) mientras se agitaba durante 30 min a temperatura ambiente. Las nanopartículas activadas con NHS fueron centrifugadas y suspendidas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La suspensión resultante se incubó con 0,33 mg del péptido cLABL durante 24 h mientras se agitaba a temperatura ambiente para su conjugación. La reacción se detuvo utilizando 45 µL de una solución de glicina 2M. A continuación, las nanopartículas anti-ICAM-GNS obtenidas se centrifugaron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS hasta un volumen final de 10 mL.

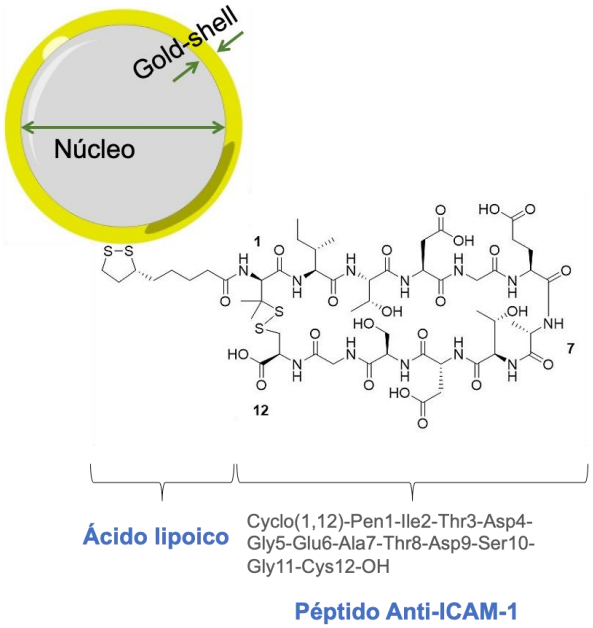


Figura 52. *Representación de la nanopartícula funcionalizada. La GNS contituida por un núcleo de sílice con recubrimiento de oro se une químicamente al péptido anti-ICAM-1 mediante un puente de ácido lipoico.*

4.2.2 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las GNS funcionalizadas

4.2.2.1 Determinación del espectro de extinción

Los espectros de extinción de las diferentes soluciones coloidales de GNS se midieron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 1050, que cubre un rango espectral de 175 a 3300 nm.

4.2.2.2 Características en espectrometría infrarroja

Para demostrar el éxito de la funcionalización de los GNS con el péptido cLABL, se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier (FITR). Los espectros FITR se midieron utilizando el modo de transmisión en un instrumento IRSpirit-T (SHIMADZU), realizando 128 barridos en el rango 400-4000 cm-1 con una resolución de 4 cm-1. Las muestras se prepararon formando pastillas de KBr que contenían un 1 % en peso del material analizado.

4.2.2.3 Caracterización mediante microscopía electrónica y retrodispersión dinámica de la luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de los GNS se determinó mediante TEM y DLS. El diámetro hidrodinámico de los GNS se determinó mediante DLS. Para ello se utilizó un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) y se midió la distribución de tamaños a 20°C con un tiempo de equilibrio de 60s y un ángulo de detección de 173° (backscattering).LS. Para ello se utilizó un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) y se midió la distribución de tamaños a 20°C con un tiempo de equilibrio de 60s y un ángulo de detección de 173° (backscattering).

4.2.3 Cultivo celular y activación inflamatoria con TNF-α

Se utilizaron células epiteliales mamarias humanas (HMEC). Las células HMEC-1 (200.000 células/pocillo) se cultivaron en placas de seis pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA). Después de 48 h, las células fueron estimuladas con 40 ng/mL de TNF-α (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) durante 18 h. A continuación, las células se lavaron con PBS y se desprendieron con una solución de tripsina-EDTA al 0,05%, que después se neutralizó añadiendo el medio completo MCDB131.

4.2.4 Citometría de flujo para comprobación de hiperexpresión ICAM1 tras activación de HMEC TNF-α.

Para demostrar la respuesta de sobreexpresión ICAM1 tras estimulación TNF-α se procedió a analizar las células estimuladas con citometría de flujo: las células se lavaron en PBS helado, se centrifugaron (1.200 rpm, 5 min a 4°C) y se resuspendieron en PBS que contenía anti ICAM-1/CD54 monoclonal de ratón (Tonbo Biosciences). Tras la incubación durante 1 h a 4°C, las células se lavaron con PBS al 1% para eliminar el anticuerpo no unido. El pellet de células se recuperó por centrifugación (1.200 rpm, 5 min a 4°C) y se resuspendió en PBS frío que contenía Ig de cabra anti-ratón conjugada con FITC (1/40) (Dako, Dinamarca). Tras el lavado, las células se resuspendieron en PBS antes de ser analizadas por citometría de flujo. Se utilizó un citómetro de flujo FACScan (modelo FACS- Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) junto con el programa de análisis CellQuest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Tras la incubación durante 1 h a 4°C, las células se lavaron con PBS al 1% frío para eliminar el anticuerpo no unido. El pellet de células se recuperó por centrifugación (1.200 rpm, 5 min, a 4°C) y se resuspendió en PBS frío que contenía Ig de cabra anti-ratón conjugada con FITC (1/40) (Dako, Dinamarca). La citometría de flujo se llevó a cabo utilizando las muestras adecuadas teñidas individualmente para el ajuste de la compensación. La expresión exitosa de las moléculas de adhesión (ICAM-1) en las células después de la activación del TNF se determinó de acuerdo con una guía de dispersión de luz lateral combinada con un canal de fluorescencia FL-1 para la inmunotinción (FL-1 se utiliza para recoger la emisión alrededor de 530±30 nm).

4.2.5 Experimentos de adhesión de anti-ICAM1- GNS

Se llevaron a cabo incubaciones de los GNS (funcionalizados y no funcionalizados) con las células HMEC a para estimar la eficacia de la adhesión de los GNS a las células. Estas incubaciones se realizaron en condiciones estáticas y dinámicas de las dispersiones de GNSs.

4.2.5.1 Adhesión en estático

Las células HMEC se incubaron con los GNS (funcionalizadas y no funcionalizadas, como control) en dispersiones de PBS (funcionalizadas y no funcionalizadas, como control) durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación, se investigó la adhesión satisfactoria de los GNS a las células HMEC mediante microscopía de campo oscuro (DFM) y se observó la señal en OCT. Para la obtención de imágenes de DFM, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse Ti2-U. El condensador DFM tiene una apertura numérica de 0,80-0,95, y se utilizó un objetivo de microscopio 40x (Nikon) con una apertura numérica de 0,65. La muestra

se iluminó con una fuente LED blanca de banda ancha y se tomaron imágenes con una cámara CMOS visible (UEye, Thorlabs). shear stress Adhesión en condiciones de flujo

Con el objetivo de simular las condiciones de flujo arterial coronario, se llevaron a cabo experimentos de adhesión de los anti-ICAM1-GNS a las células HMEC bajo diferentes condiciones de flujo que conllevan diferentes tensiones de cizallamiento. Para ello, se montaron placas de cultivo celular en una cámara de flujo de placas paralelas (Warner Instruments, RC-30WA) conectada a una bomba de jeringa (New Era NE-300 Just Infusion™) que puede proporcionar caudales de flujo continuo hasta un valor máximo de unas 4 dinas/cm2. Para ello, en primer lugar, se activaron las células con TNF-α para sobre expresar ICAM-1 de igual modo que el procedimiento descrito en los experimentos en estático. A continuación, se hicieron fluir las diferentes dispersiones de GNS (funcionalizadas y no funcionalizadas), con una concentración fija de oro de 0,005 mg/mL, sobre las células activadas durante 5 minutos en diferentes condiciones de flujo. A continuación, se lavaron las células con PBS durante 1 minuto más para retirar los posible GNS depositadas por gravedad y no adheridas. Se obtuvieron imágenes por DFM cada minuto durante el tiempo de flujo, para comparar las correspondientes señales de dispersión de luz y evaluar la eficiencia de adhesión de las células GNSs. Las magnitudes del shear stress para cada flujo se calcularon mediante la ecuación $\tau_w = \frac{6\mu Q}{bh^2}$, donde τw es el shear stress de la pared, μ la viscosidad del fluido (hemos tomado la del agua a 37°C; 0,0076 P), Q es el flujo, b es la anchura de la cámara de flujo experimental y h el espesor de esta. Como se deduce de la ecuación, a igualdad de viscosidad y en un canal de la misma anchura y profundidad, el shear stress (fuerza o tensión de cizallamiento) es directamente proporcional al flujo. Entiéndase por tanto, que el shear stress creciente refleja flujos crecientes, ya que las otras condiciones experimentales no se modificaron

4.2.5.2 Análisis de la señal por DFM y OCT

Los GNSs tienen una intensa resonancia plasmónica a 700 nm, por lo cual, en las imágenes crudas de DFM, las nanopartículas aparecen como puntos rojizos. Por lo tanto, se aplicó un filtro de color a las imágenes brutas (utilizando un código MATLAB personalizado) para discriminar la contribución de las GNS de toda la señal de dispersión. A continuación, se determinó la intensidad debida a las nanopartículas adheridas a las células de las imágenes filtradas en color utilizando el software ImageJ.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las GNS funcionalizadas

Como explicamos en el apartado anterior, para diferenciar la fijación pasiva de la selectiva a las células HMEC, se utilizaron dos tipos de recubrimientos superficiales para los GNS:

- GNSs recubiertos con polietilenglicol (etiquetados como GNSs@PEG), para la focalización pasiva (o control), ya que este recubrimiento de superficie no proporciona interacciones específicas péptido-receptor ICAM1, y además asegura la estabilidad en medio acuoso.
- GNSs recubiertos con el péptido cLABL, para la adhesión activa a las moléculas ICAM-1 que se regulan tras la activación del TNF-α (etiquetados como GNSs@aICAM).

Mediante el estudio con microscopía electrónica y espectrofotometría, se comprobó que la funcionalización con el péptido produce un aumento de unos 100 nm en el tamaño dinámico de las nanopartículas (Figura 53)

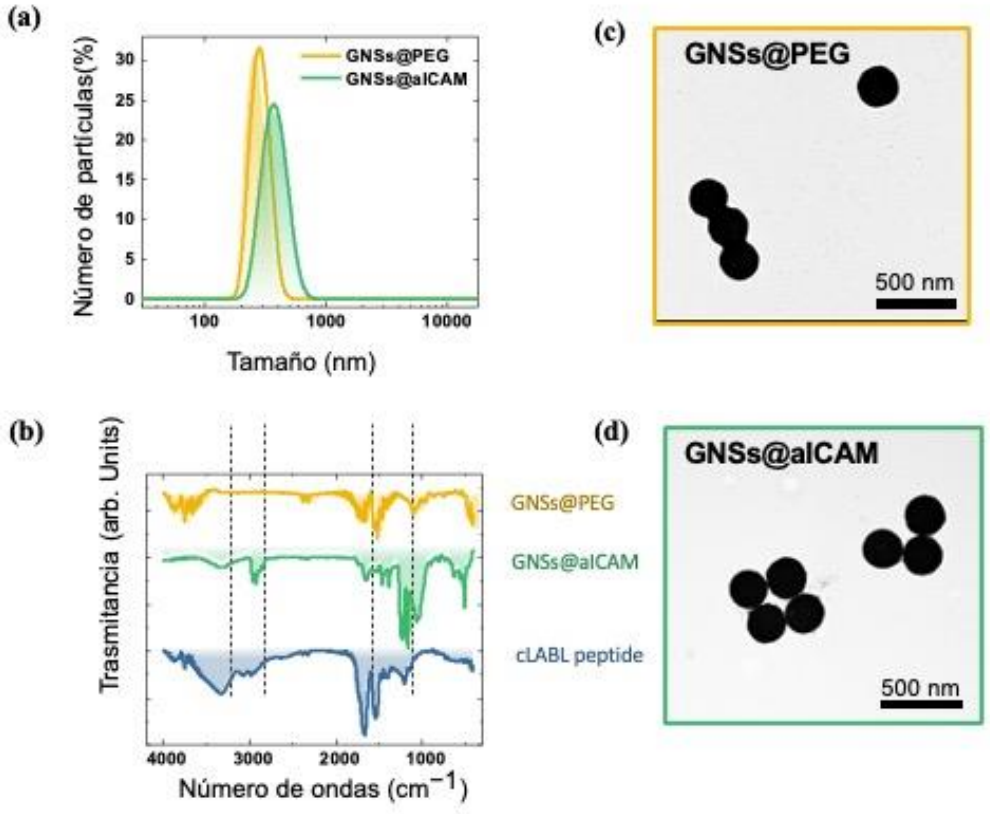


Figura 53. *Resultados del estudio con microscopía electrónica y espectrofotometría.*

El espectro de fotoespectrometría demuestra el éxito de la funcionalización de nuestras nanoesferas de oro con el péptido cLABL. Igualmente, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los GNS, junto con la distribución del tamaño de las GNP, demuestran la ausencia de agregados tras la funcionalización (Figura 53)

Por otro lado, el espectro de extinción normalizado mostró que la adición del péptido para la funcionalización dota a la GNS de un 60% más de espectro de extinción a la longitud de onda en que opera la OCT (1320nm) Figura 54(a). Muy probablemente, esta mejora se debe sobre todo a una esperada mayor dispersión Rayleigh debido al aumento de tamaño dinámico tras la adición del péptido a la superficie. Este potencial aumento de señal lumínica de backscattering tras la funcionalización, fue comprobado mediante la obtención de imágenes de OCT de GNSs@PEG y GNSs@ICAM1 en diluciones equivalentes. Los resultados confirmaron que la intensidad de la retrodispersión de la OCT aumenta en un 66% ($p \leq 0{,}001$) para el GNSs@aICAM en comparación con el GNSs@PEG, en buena concordancia con el aumento observado en la sección transversal de extinción Figura 54(b). Estos resultados confirman que la funcionalización conduce a una mejora adicional de la intensidad de la luz retrodispersada a 1320 nm.

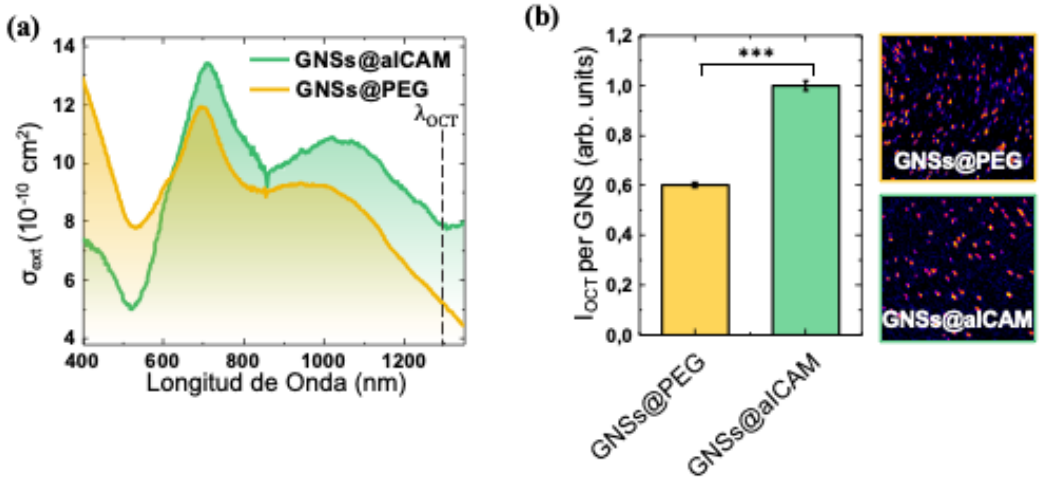


Figura 54. *(a) Espectro de extinción de los GNS funcionalizados y recubiertos de PEG. La línea de puntos indica la longitud de onda de trabajo del sistema OCT cardiovascular. (b) Imágenes comparativas de la sección transversal de la OCT (arriba) y de las señales de la OCT y de las nanopartículas (abajo) dadas por ambos GNS. La diferencia estadística se determina mediante la prueba t de dos muestras (***$p \leq 0{,}001$).*

4.3.2 Citometría de flujo para la demostración de la hiperexpresión de ICAM1 tras activación de HMEC con TNF-α

La Figura 55 muestra los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en cultivos celulares basales y activados por TNF. Comparando la intensidad total de fluorescencia recogida en las HMEC, se observó que la intensidad de fluorescencia aumenta en aproximadamente un orden de magnitud para las células activadas con TNF-α, lo que indica una sobreexpresión de ICAM1. Por lo tanto, concluimos que la activación del TNF-α conduce efectivamente a un aumento sustancial de la expresión de ICAM-1 en las células HMEC. Hay que tener en cuenta que, aunque el número de moléculas expresadas por las células activadas es mucho mayor que en las células basales, estas últimas también expresan esta proteína, ya que la intensidad correspondiente no es despreciable.

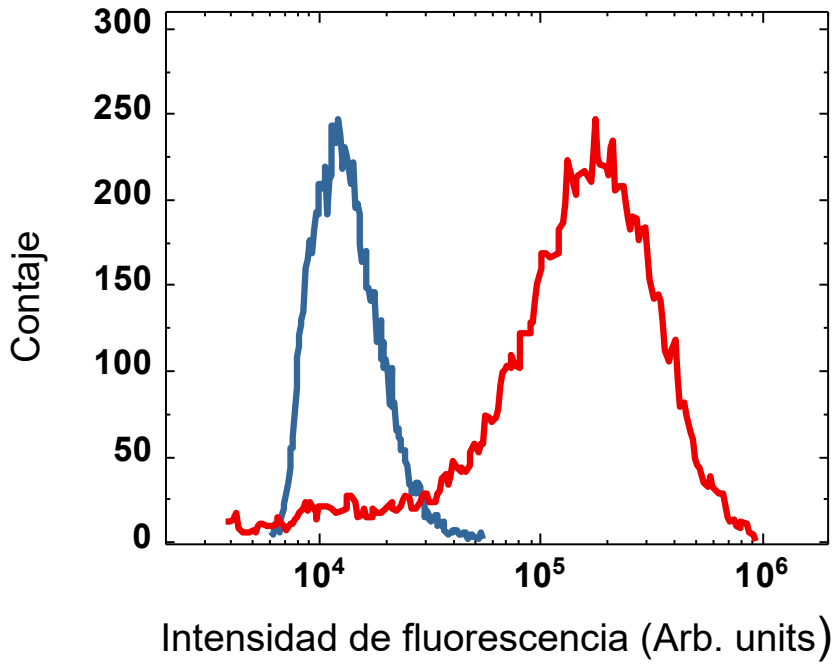


Figura 55. *Datos de citometría de flujo de la expresión de ICAM-1 antes (basal, espectro azul) y después (activado, espectro rojo) de la activación del TNF-α de las células HMEC.*

4.3.3 Demostración de la adhesión específica de las GNSs@aICAM la superficie de las HMEC mediante microscopía de campo oscuro en condiciones estáticas

Una vez demostrado que las células HMEC activadas sobreexpresan un número sustancial de moléculas ICAM-1 en comparación con las células HMEC basales (sin estimulación por TNF-α), incubamos ambos tipos de células con dispersiones de GNSs (funcionalizadas y no funcionalizadas) en PBS durante 1 hora a 37°C con la misma concentración de GNSs (0,005 mg/mL), para poder investigar la afinidad de adhesión GNSs-célula en condiciones estáticas. En primer lugar, se utilizó la microscopía de campo oscuro (DFM) como técnica de lectura para comparar la afinidad de adhesión GNSs-célula entre los GNSs funcionalizados y no funcionalizados, es decir, para discriminar entre la unión activa de la pasiva. La Figura 56 muestra cuatro imágenes representativas de DFM de las células endoteliales en los estados basal y estimulado por TNF-α tras la incubación con dos soluciones coloidales de GNSs (GNSs@PEG y GNSs@aICAM). Los GNSs aparecen en las imágenes DFM como puntos rojos debido a su resonancia plasmónica que alcanza un pico a 700 nm. En el caso de las células incubadas con GNSs@PEG (nanopartículas no funcionalizadas), el número de puntos rojos encontrados en las imágenes es similar para los estados basal y activado. Se observó que la incubación de células endoteliales HMEC con GNSs@aICAM (nanopartículas funcionalizadas) produjo a un aumento estadísticamente significativo del número de GNSs adheridas a la superficie de las tanto para las células basales como para las activadas en la Figura 56.

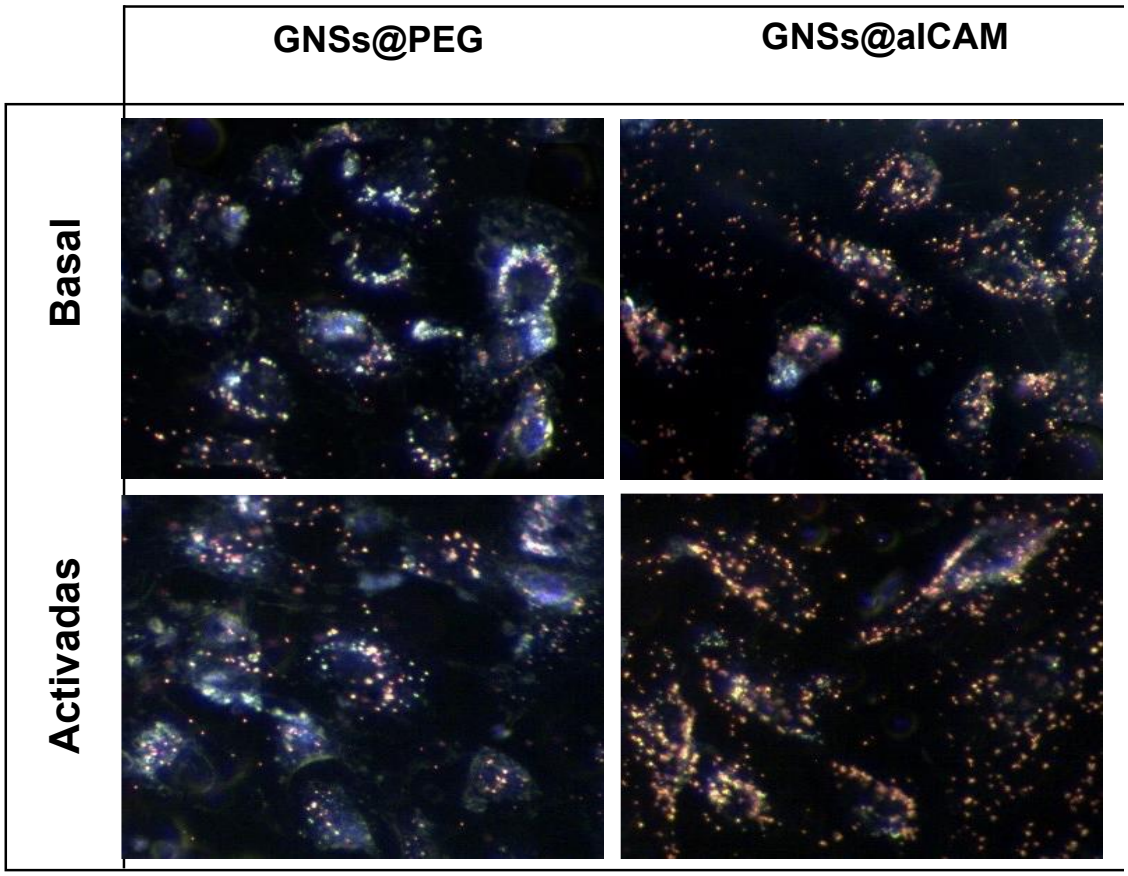


Figura 56. *Imágenes deDFM de las células HMEC basales (- TNF-α) y activadas (+ TNF-α) incubadas con GNSs@PEG o GNSs@aICAM.*

La afinidad de unión entre células y GNSs puede cuantificarse siguiendo el procedimiento de procesamiento de imágenes descrito en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, las imágenes se filtran de manera que sólo se registra la intensidad debida a los píxeles rojizos (es decir, la intensidad debida a los GNS). Los resultados obtenidos tras promediar varias células se muestran en la Figura 57. En el caso de las células incubadas con GNS no funcionalizados, la intensidad media es baja (alrededor de 0,2) y similar para las células basales y activadas, lo que revela una cierta adhesión pasiva inespecífica. La incubación con los GNS funcionalizados produce un aumento de la intensidad de 0,2 a aproximadamente 0,75 U Arb de intensidad, para las células en estado basal, mientras que se observa un aumento adicional de hasta 1,00 U Arb de intensidad para las células en estado activado ($p<0,005$). Se estimó que la eficacia de adhesión específica en condiciones estáticas es cercana al 23%, lo que demuestra que se está produciendo una unión activa y selectiva a las moléculas ICAM-1.

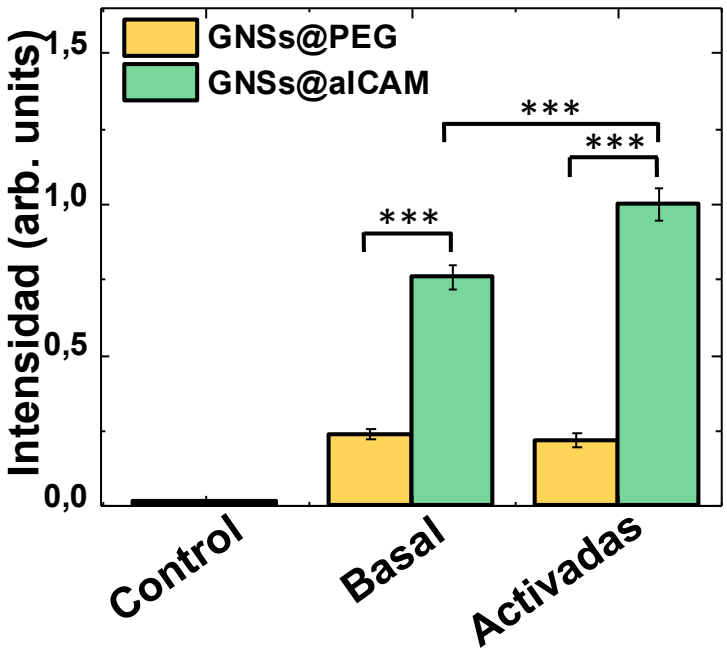


Figura 57. *Intensidad total media por célula para las células basales y activadas. Las células que no han sido incubadas con GNS se muestran como control. La diferencia estadística se determina mediante la prueba t de dos muestras (***p ≤ 0,001).*

4.3.4 Demostración de la adhesión específica de las GNSs@aICAM la superficie de las HMEC mediante microscopía de campo oscuro en condiciones dinámicas

Con el objeto de simular las condiciones reales de flujo arterial coronario, se llevaron a cabo los experimentos en cámara de flujo con una monocapa de HMEC. Las soluciones de GNSs con una concentración de 0,005 mg/mL se hicieron fluir sobre monocapas celulares HMEC, tanto en estado basal como activado a diferentes flujos y subsiguientes tensiones de cizallamiento diferentes (τ (dyn/cm2) (Tabla 6).

Para comparar, se realizaron experimentos con nanopartículas funcionalizadas (GNSs@aICAM) y no funcionalizadas (GNSs@PEG). Se tomaron imágenes de DFM cada minuto durante 5 minutos de circulación más un minuto de limpieza con PBS. A continuación, se determinó la eficacia de adhesión específica.

Tabla 6. Relación entre flujo, tensión de cizallamiento (τ) y velocidad en el modelo de cámara de flujo utilizado							
Flujo (mL/min)	0.5	1	2	5	10	15	20
τ (dyn/cm^2)	0.3	0.7	1.4	3.4	6.8	10.2	13.6
Velocidad (cm/s)	0.2	0.4	0.7	1.9	3.7	5.6	7.4

Para comparar, se realizaron experimentos con nanopartículas funcionalizadas (GNSs@aICAM) y no funcionalizadas (GNSs@PEG). Se tomaron imágenes de DFM cada minuto durante 5 minutos de circulación más un minuto de limpieza con PBS. A continuación, se determinó la eficacia de adhesión específica.

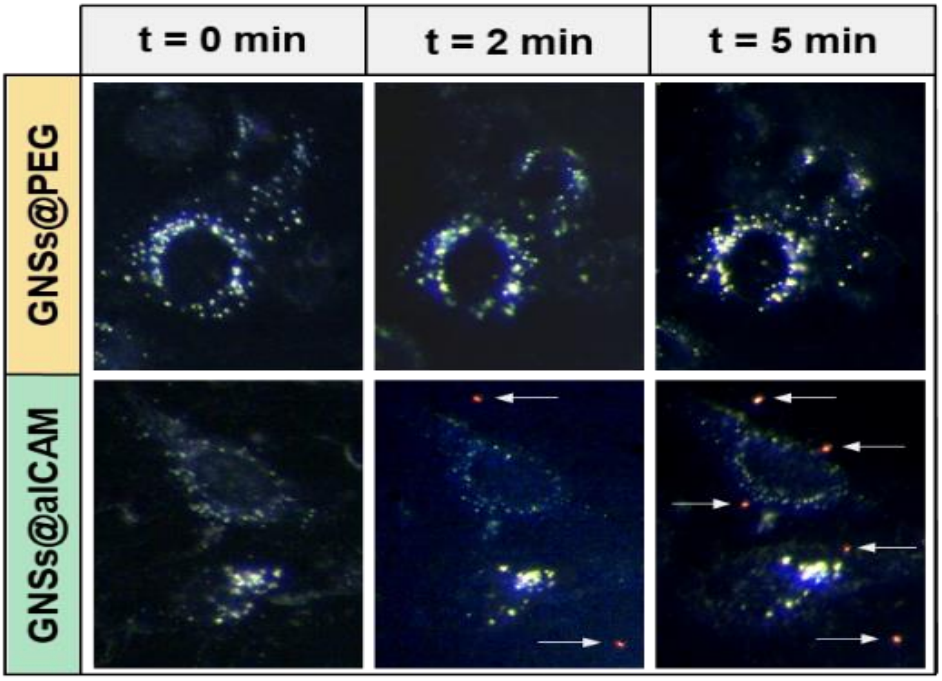


Figura 58. *Imágenes DFM de células HMEC activadas para diferentes tiempos de circulación de soluciones GNSs@ PEG y GNSs@aICAM sobre células activadas con una tensión de cizallamiento de 1,7 dinas/ cm2. Las flechas señalan los puntos rojos correspondientes a las GNP. El número de manchas rojas (es decir, las que sólo se deben a los GNS) adheridas a las células aumenta en el caso de los GNS funcionalizados y es mayor a mayor tiempo de recirculación.*

Como puede apreciarse en la Figura 58, las condiciones de flujo favorecieron la ausencia de unión inespecífica por las GNSs@PEG usadas como control, mientras que hubo unión específica de las GNS funcionalizadas anti ICAM1. Además, a medida que aumenta el tiempo de exposición, se produce un aumento en el número de GNSs@aICAM unidas como puede apreciarse en la Figura 59.

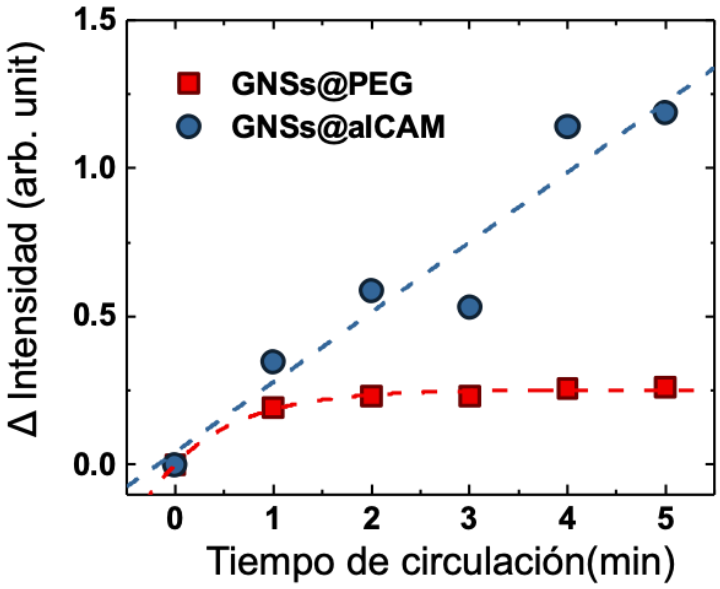


Figura 59. *Eficacia de la adhesión de los GNS en función del tiempo de circulación.*

Se calculó la intensidad media filtrada por colores de todas las células para los diferentes tiempos de circulación y se corrigió por la intensidad en el tiempo 0. Los resultados se muestran en la Figura 59, donde se representa el incremento de la intensidad DFM en función del tiempo de circulación. En el caso de las nanopartículas no funcionalizadas (GNSs@PEG), la señal DFM no aumenta durante todo el proceso de circulación, lo que revela que no hay una adhesión de las nanopartículas control. Por el contrario, para las nanopartículas funcionalizadas (GNSs@aICAM) la señal muestra una tendencia lineal creciente. Este resultado indica que el número de GNSs unidas a las células aumenta claramente con el tiempo de circulación.

Finalmente se realizó un estudio de la eficiencia de adhesión en función del flujo y tensión de cizallamiento. Se observó un incremento significativo de la intensidad de señal cuando se utilizaron GNSs@aICAM con respecto a las no funcionalizadas a diferentes tensiones de cizallamiento. En consecuencia, este resultado confirma que la focalización activa (es decir, la adhesión específica de las nanopartículas funcionalizadas a las moléculas ICAM-1) es detectable incluso en condiciones de flujo. Por otro lado, se objetivó que tras la activación del TNF-α, el número de nanopartículas funcionalizadas (GNSs@aICAM) adheridas a las células aumenta significativamente con respecto al estado no activado (basal). De hecho, los datos que aparecen en la figura 60 permiten determinar cómo evoluciona la eficacia de adhesión específica al aumentar la tensión de cizallamiento.

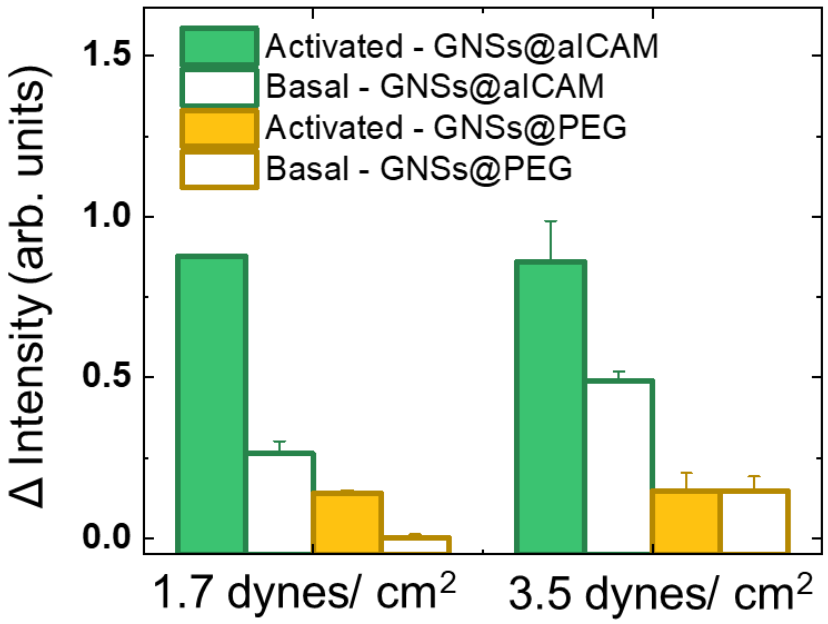


Figura 60. *Aumento de la intensidad del DFM debido a los GNS para dos tensiones de cizallamiento (después de 5 minutos de flujo más 1 minuto de limpieza con PBS)*

Las eficiencias obtenidas fueron del 64% para 1,7 dinas/ cm2 y del 37% para 3,5 dinas/ cm2, lo que significa que un aumento del doble de la tensión de cizallamiento conduce a una reducción drástica de la eficiencia de adhesión específica de las GNS a las células HMEC activadas. En comparación con los valores de eficacia del experimento estático, se puede ver claramente que la eficacia para las condiciones estáticas es muy baja (20%) en comparación con las que se acaban de describir (condiciones dinámicas). Una posible razón de ello es que, incluso en el estado basal, las células sobreexpresan un número no despreciable de moléculas ICAM-1. Por lo tanto, después de 1 hora de incubación, es muy probable que las nanopartículas funcionalizadas (GNSs@aICAM) hayan tenido tiempo suficiente para unirse a la mayoría de las moléculas ICAM-1 sobreexpresadas, dando lugar a grandes intensidades de imagen DFM y OCT. Esto no es tan importante en los experimentos dinámicos porque, dado que el número de nanopartículas que llegan a las células por unidad de tiempo es menor, la probabilidad de que se produzca una unión célula-GNSs es también menor y muy dependiente de las moléculas disponibles en la superficie de la célula.

4.3.5 Demostración de que la adhesión específica de las GNSs@aICAM en la superficie de las HMEC produce un aumento en la señal de OCT

Finalmente, valoramos la viabilidad de la OCT para detectar estos cambios en la tras la adhesión específica de GNSs. Para ello, se colocó la punta del catéter de la OCT bajo las placas de cultivo de células endoteliales para obtener las señales de retrodispersión de la OCT de estas monocapas celulares. Tras la adquisición de imágenes, se realizó análisis estadístico de la intensidad de señal corregida por la intensidad basal de la monocapa celular sin GNS. La Figura 61 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.

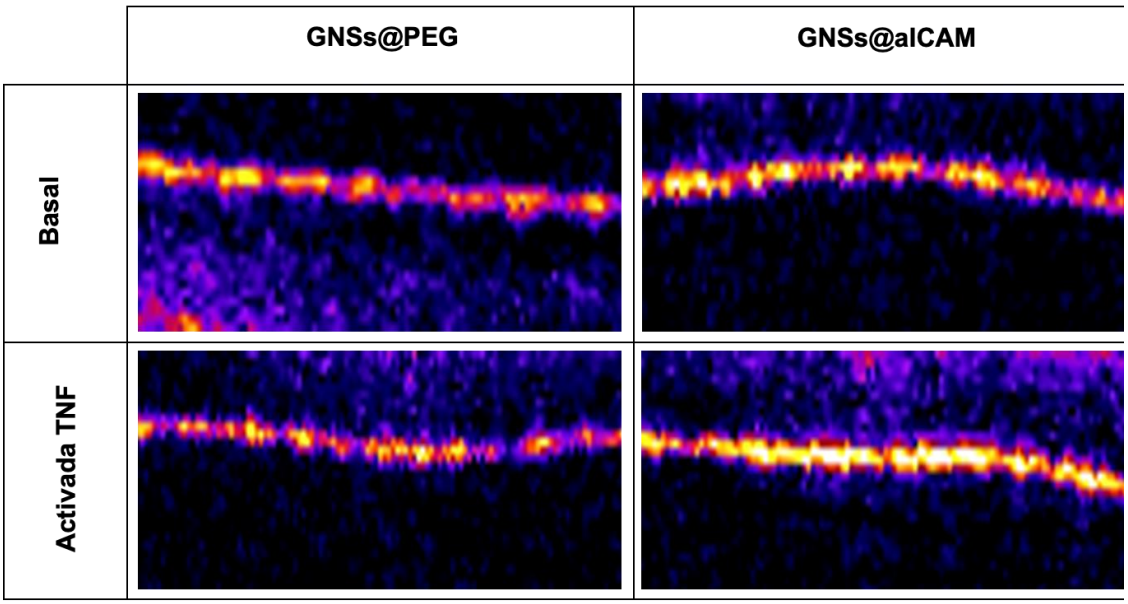


Figura 61. *Imágenes OCT de células HMEC basales (- TNF-α) y activadas (+ TNF-α) incubadas con GNSs@PEG o GNSs@aICAM.*

La intensidad de la señal de la OCT obtenida utilizando GNSs@PEG es similar para los estados basal y activado. De hecho, este resultado se esperaba debido a la unión no específica de estas nanopartículas a las células. Sin embargo, en el caso de la adhesión activa (es decir, utilizando GNSs@aICAM) se detecta un aumento medible de la señal CV-OCT tanto para el estado basal como para el activado, (0,72 vs 0,74 UA; p:0,9). Por el contrario, la intensidad de señal fue significativamente superior cuando se utilizaron GNSs@aICAM tanto en condiciones basales como tras activación ($p<0,005$) (Figura 62). Además, se produjo un claro y estadísticamente significativo aumento de señal al utilizar GNSs@aICAM en células endoteliales activadas frente al control (0,74 vs 1,0 UA; $p<0,005$). La eficiencia de adhesión específica de este proceso mostró un valor de alrededor del 27 %, que está en buena concordancia con la eficiencia obtenida con DFM.

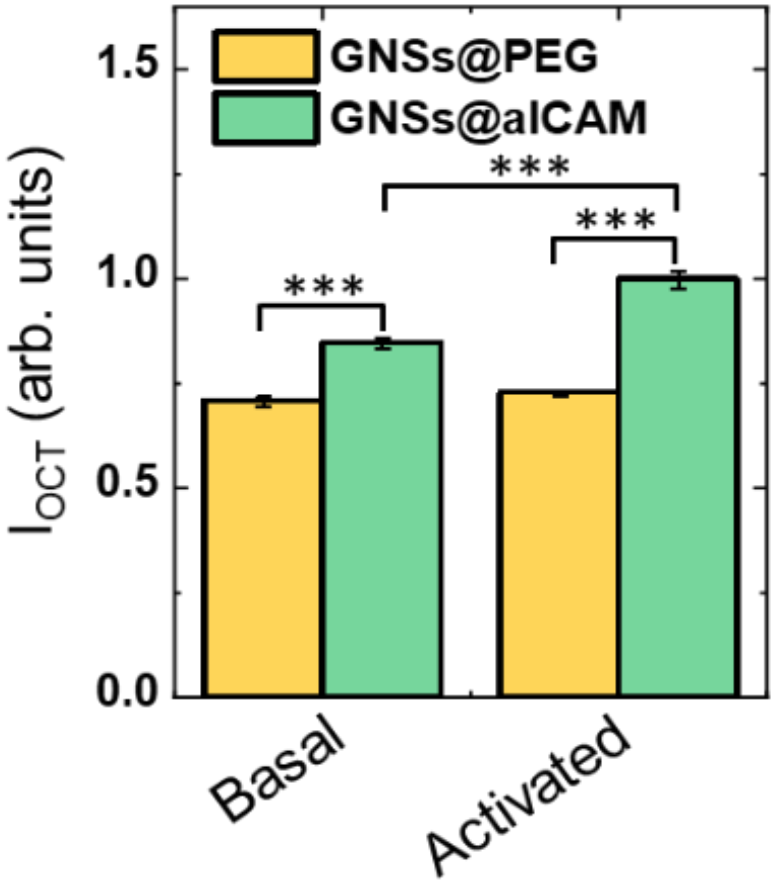


Figura 62. *Intensidad de señal al utilizar GNSs@aICAM y GNSs@PEG, en condiciones basales y tras activación.*

4.4 CONCLUSIONES

Con este grupo de experimentos hemos evaluado sistemáticamente la utilidad potencial de las nanoesferas de oro funcionalizadas para actuar como agentes de contraste para el diagnóstico molecular de la aterosclerosis coronaria mediante OCT. Tras una adecuada funcionalización con el péptido cLAB, los GNS han demostrado que se unen específicamente a las moléculas ICAM-1 sobreexpresadas por las células HMEC activadas por el TNF-α. Esta especificidad se ha demostrado en la microscopía de campo oscuro. A continuación, se comprobó la capacidad de los GNS funcionalizados para adherirse a las células inflamadas en condiciones dinámicas, demostrándose también la adhesión específica de las GNS funcionalizadas. Además, se ha demostrado que esta unión permite detectar la presencia de endotelio arterial activado mediante el subsiguiente aumento en la intensidad de señal de OCT. Nuestros resultados sugieren que es posible detectar la presencia de moléculas ICAM-1 en la superficie celular endotelial coronaria mediante la adhesión de los GNS funcionalizados para diferentes flujos, siendo la eficiencia de adhesión

específica dependiente del valor de la tensión de cizallamiento. Este trabajo constituye una primera demostración de la capacidad de los GNS como agentes de contraste molecular para realizar una biopsia óptica molecular de la aterosclerosis coronaria mediante OCT.

5 CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

5.1 CONCLUSIONES

1) Las nanoesferas basadas en un núcleo de sílice con recubrimiento de oro de 120nm de diámetro son las nanopartículas ofrecen las mejores características como potenciales agentes de contraste para la tomografía de coherencia óptica intravascular coronaria debido a una mayor retrodispersión a la longitud de onda del láser de la tomografía de coherencia óptica.
2) El excelente contraste de la tomografía de coherencia óptica proporcionado por las nanoesferas de oro permite detectar nanopartículas individuales tanto en condiciones estáticas como dinámicas.
3) Se ha demostrado que los puntos cuánticos emisores de infrarrojos son capaces de proporcionar un contraste simultáneo para tomografía de coherencia óptica intracoronaria e imágenes de fluorescencia infrarroja al excitarse con el láser de la tomografía de coherencia óptica por lo que se presentan como potenciales marcadores para la obtención de imagen bimodal.
4) Se ha demostrado la posibilidad de obtener señal de intensidad de luz negativa o contraste oscuro mediante la síntesis de nanopartículas de sulfato de cobre que han sido observadas mediante tomografía de coherencia óptica tanto en disoluciones aisladas como en tejidos biológicos.
5) Las nanoesferas de oro pueden actuar como agentes de contraste para imagen celular tras su fagocitosis inespecífica.
6) Los resultados *ex vivo* han demostrado la capacidad de realizar funcionalizaciones de nanocompuestos con la finalidad de permitir la adhesión selectiva de nanoesferas de oro en el tejido miocárdico. Esta adhesión y acumulación selectiva provoca un aumento de la intensidad de la luz retrodispersada y, por lo tanto, hace que el tejido diana sea visible por un equipo clínico convencional de tomografía de coherencia óptica intravascular.
7) Tras una adecuada funcionalización con el péptido cLAB, las nanoesferas de oro han demostrado que se unen específicamente a las moléculas ICAM-1 sobreexpresadas por las células HMEC activadas por el TNF-α. Se ha demostrado que esta unión permite detectar la presencia de endotelio arterial activado mediante el subsiguiente aumento en la intensidad de señal de tomografía de coherencia óptica

5.2 LIMITACIONES

En primer lugar, sólo han sido exploradas un limitado número de nanopartículas, basadas en las propiedades teóricas de retrodispersión, en su facilidad para la funcionalización y en que estuvieran disponibles o fueran fácilmente sintetizadas. No obstante, existe un inmenso campo de nanopartículas, tanto en geometría como en composición química, que no han sido exploradas en los trabajos realizados. Cabe la posibilidad de que existan, por tanto, nanopartículas de mayor capacidad de emisión de señal para la OCT. Por otro lado, se ha explorado la citotoxicidad directa de las nanopartículas en líneas celulares. Aunque existen datos de seguridad ya publicados, será necesario confirmar su seguridad en relación con efectos a medio y largo plazo antes de poder probar su uso en humanos. En el modelo de cámara de flujo únicamente se han explorado caudales de hasta 5 ml/min, claramente inferiores a los de una arteria coronaria. La velocidad de tránsito de las nanopartículas es un factor limitante para su adhesión específica que podría ser compensado con un aumento de la concentración. Una de las mayores limitaciones de la producción de señal extra, es la gran luminosidad en OCT de la interfase luz-endotelio, que puede hacer complicada la distinción de cambio en la señal lumínica tras el depósito de nanopartículas. Aunque se ha probado su potencial en modelos in vitro, todavía queda por probar su capacidad de aumento de señal en una arteria real, donde, probablemente, sea necesario un software que aumente la capacidad de discriminación del ojo humano. Por último, aunque se ha utilizado el ICAM como diana específica por su facilidad de marcaje y por tener un modelo ya contrastado, habrá que diseñar dianas más específicas que probablemente se encuentren en menor densidad de receptores.

5.3 PERSPECTIVAS DE FUTURO

En las últimas cinco décadas se ha conseguido una drástica reducción de la morbimortalidad cardiovascular. Los grandes registros y ensayos clínicos desarrollados han permitido conocer los factores de riesgo asociados a la enfermedad coronaria y desarrollar tratamientos que se han demostrado su eficacia y que, posteriormente se han incorporado al tratamiento de los pacientes con enfermedad coronaria. De este modo, el camino hacia la erradicación de las enfermedades cardiovasculares se ha logrado mediante la adopción de modificaciones en el estilo de vida, incluyendo intervenciones en la dieta, el tabaco y el ejercicio, así como terapias basadas en la evidencia que tienen como objetivo modificar un fenotipo cardiovascular de riesgo reconocible y comúnmente compartido. A pesar del éxito de esta "medicina basada en la evidencia", estamos aún lejos de haber acabado con la epidemia de la enfermedad cardiovascular, que continúa siendo responsable actualmente de la mayoría de las muertes, empeoramiento de la calidad de vida y del consumo de recursos de salud en el mundo occidental [(148)]. En los últimos años se está produciendo un lento, pero incesante, cambio de paradigma en medicina hacie la

llamada “medicina de precisión” o “medicina individualizada”. Cada vez es más evidente que, si bien son indispensables como fuentes de conocimiento y evaluación de terapias, los tradicionales ensayos clínicos, así como el traslado de sus resultados a la población a través de las Guías de Práctica Clínica, muestran una serie de limitaciones debidas a la generalización de sus premisas. La “medicina basada en la evidencia” ignora, en cierta medida, la heterogeneidad de la fisiopatología y el fenotipo de la enfermedad, su presentación clínica y la respuesta al tratamiento. Esta estrategia de "talla única" supone que todos los pacientes con signos y síntomas comunes comparten el mismo fenotipo y responderán de forma similar a las terapias médicas. Sin embargo, la medicina siempre ha sido personalizada y lo seguirá siendo a pesar de las recomendaciones, los ensayos clínicos controlados y las rutinas basadas en la evidencia y los protocolos que, a menudo, sugieren un tratamiento uniforme.

El término "medicina de precisión" representa un nuevo enfoque que tiene en cuenta las diferencias individuales tanto en la genética como en los factores ambientales que son determinantes para definir el fenotipo de la enfermedad de cada individuo. El objetivo de la medicina de precisión es identificar las medidas preventivas o terapéuticas óptimas para un individuo basándose en un perfil personal único y no en el de la población media. Esta estrategia ha tenido un éxito notable en el campo de la hematología y la oncología, donde los tumores de los pacientes se analizan molecularmente para crear terapias a medida, por ejemplo, la terapia con células T receptoras de antígenos quimérico. No obstante, existen ciertas dificultades para poder llevar a cabo esta aproximación clínica tan atractiva potencialmente. La individualización requiere datos de genética y biología molecular, así como de eficacia de los tratamientos en poblaciones mucho menores por lo que parece imposible asumir estos conocimientos con la metodología de investigación actual. Es en este punto donde la recogida y el análisis de una gran cantidad de datos mediante “big data” y el desarrollo de algoritmos diagnósticos y terapéuticos mediante algoritmos de “inteligencia artificial” tienen un papel en el futuro.

En el caso particular de la enfermedad aterotrombótica coronaria, hemos asistido en los últimos años a los primeros indicios de una potencial aplicación de la medicina personalizada en el futuro. Cada vez somos más conscientes de la extrema complejidad de la enfermedad coronaria y su variabilidad evolutiva, lo que hace cada vez más difícil creer en un único tratamiento que sea de utilidad para todos los casos. Un ejemplo es el tratamiento de la restenosis intrastent tras la revascularización percutánea. Hasta la aparición de las técnicas diagnósticas intracoronarias, no se era consciente de los diferentes fenotipos anatamopatológicos que existen en la actualidad, que incluso pueden coexistir en una misma lesión restenótica [(149)(150)]. Todo hace pensar que un tratamiento individualizado con selección de la terapéutica adecuada en función de variables como el fenotipo anatómico del tejido neointimal y que incluya factores genéticos, demográficos, etc., será el tratamiento más eficaz en el futuro. Sin embargo, la complejidad de este análisis hace que hasta la fecha no se haya podido evaluar el tratamiento dirigido por simplemente fenotipo histológico en esta patología en concreto. Las novedades en los nuevos biomarcadores, los hallazgos en genética, las técnicas de imagen cada vez más precisas o el tratamiento informático de grandes poblaciones hace que cada vez sea más

complicado integrar todos estos datos en la toma de decisiones, pero si se consigue superar este reto, sin duda alguna, se producirá un beneficio en la población para la prevención y tratamiento de la enfermedad cardiovascular. La mayor parte de los biomarcadores cardiovasculares son péptidos o proteínas, que actualmente se utilizan como marcadores de diversos procesos de enfermedades cardiovasculares. Mediante un análisis personal exhaustivo de un biomarcador validado, se pueden construir diseños de ensayos clínicos basados en si ese biomarcador anormal predice la respuesta del paciente al tratamiento. Hasta cierto punto, estos ensayos guiados por biomarcadores se están realizando con biomarcadores para la insuficiencia cardíaca y las miocardiopatías, como el NT-proBNP y la troponina cardíaca. Sin embargo, nuestra aplicación de dichos biomarcadores para la selección de pacientes y la evaluación predictiva de la respuesta al tratamiento está limitada por nuestra falta de datos individualizados de los pacientes.

Dentro de la investigación clínica en la aparición y progresión de la enfermedad coronaria existe un déficit en el conocimiento de los mecanismos y marcadores celulares y moleculares responsables, a diferencia de lo que ocurre en otros campos como la oncología o la hematología. Este déficit deriva de la dificultad de estudiar estos marcadores in vivo ante la imposibilidad de realizar biopsias generalizadas coronarias. Por lo tanto, parece necesaria la implementación de nuevas técnicas que permitan la caracterización de los factores que producen la aparición o progresión de la enfermedad coronaria y, sobre todo, su inestabilización y aterotrombosis, que son los responsables de su principal morbimortalidad. Aunque en los últimos años han aparecido grandes avances en el diagnóstico y las posibilidades terapéuticas de las placas fenotípicamente de riesgo, todavía existe un baja sensibilidad y especificidad al basarse únicamente en parámetros anatómicos por imagen intravascular [(151)]. Una de las mejores opciones para mejorar el conocimiento de la proteómica y metabolómica de la enfermedad ateroscleróticа coronaria es el uso combinado de la imagen intravascular con la presencia de marcadores moleculares in situ. Su principal ventaja es la gran resolución espacial, pero tiene el inconveniente de no poder ser aplicada a la población sin indicación de estudio invasivo y a la dificultad inherente de obtención de imágenes seriadas en el tiempo. Posiblemente, en un futuro cercano asistamos al desarrollo de diferentes tecnologías que permitan diferenciar fenotipos coronarios y, en consecuencia, guiar el tratamiento personalizado.

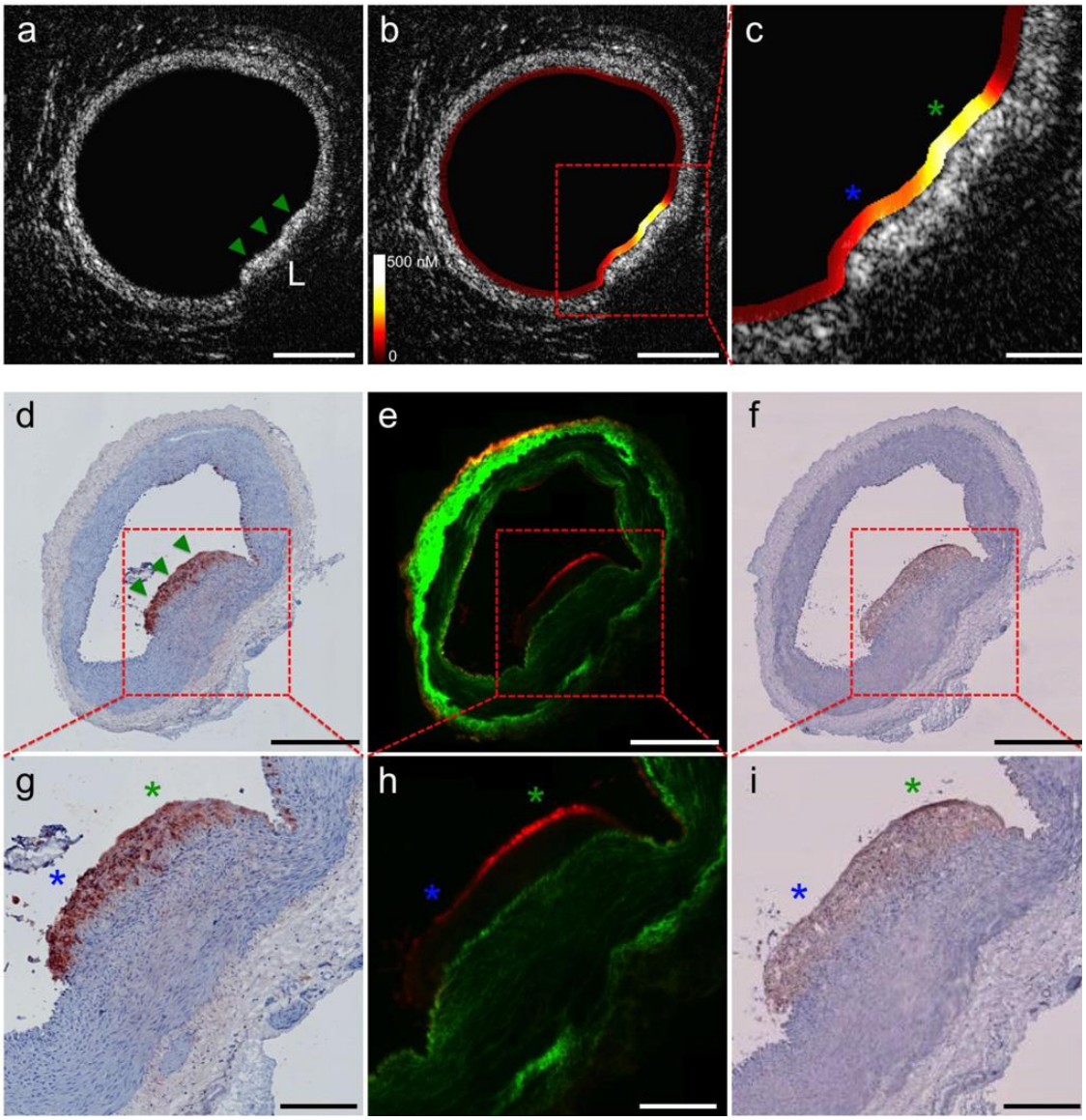


Figura 63. *Imágenes OFDI-NIRF de doble modalidad de la microestructura de la aterosclerosis y de la actividad enzimática inflamatoria en un conejo. Este catéter de doble modalidad para la obtención simultánea de imágenes microestructurales y moleculares in vivo mediante una combinación de imágenes en el dominio de la frecuencia óptica (OFDI) y de fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRF). Al proporcionar información molecular simultánea en el contexto de la microestructura del tejido circundante, este novedoso catéter podría ofrecer nuevas oportunidades para investigar la aterosclerosis coronaria, así como para identificar placas arteriales coronarias de alto riesgo biológico y estructural in vivo* [(128)].

Los trabajos experimentales presentados en esta tesis constituyen la etapa inicial de un proyecto traslacional a largo plazo que tiene como objetivo el desarrollo de nanopartículas funcionalizadas para la obtención de imagen molecular *in vivo*. Tras un trabajo de unos cuatro años con un grupo interdisciplinar compuesto por cardiólogos,

biólogos, químicos y físicos hemos conseguido los objetivos propuestos que son identificar las nanopartículas que pueden ser potenciales marcadores moleculares para la tecnología de la tomografía de coherencia óptica. Así mismo, se ha desarrollado la tecnología que permite funcionalizar estas nanopartículas con ligandos contra dianas moleculares o celulares específicas. También se ha desarrollado una serie de modelos experimentales para la comprobación del éxito de la funcionalización y adhesión específica. Actualmente se está trabajando en el diagnóstico molecular ex vivo e in vivo en medianos y grandes animales de experimentación (Figura 64)

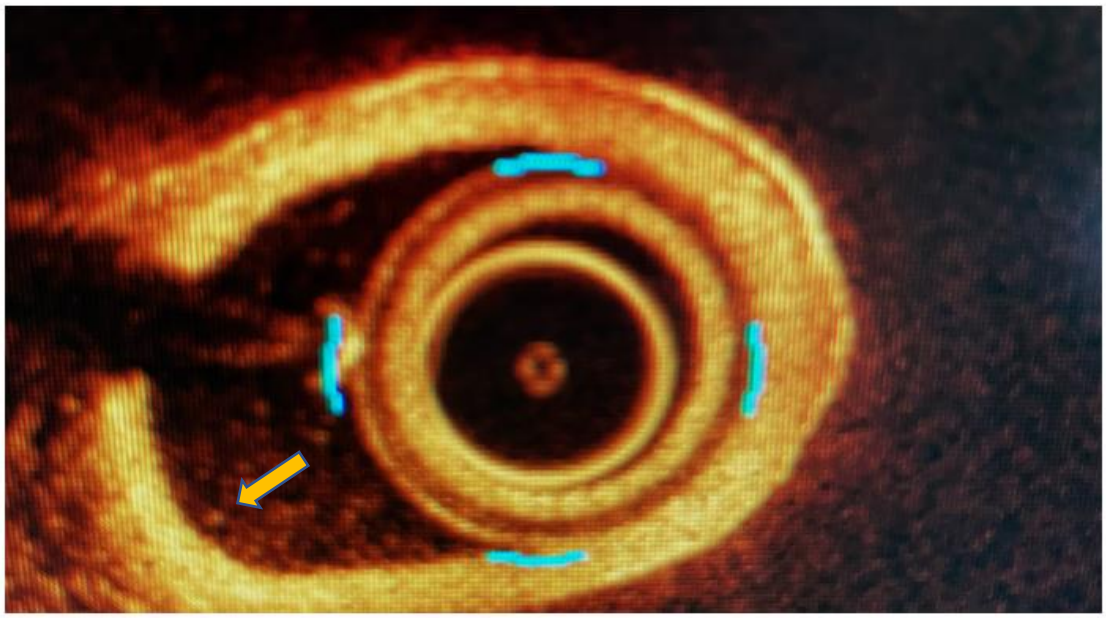


Figura 64. *Imagen de OCT de aorta de conejo ex vivo tras activación endotelial inflamatoria con presencia de nanopartículas funcionalizadas endoteliales (flecha)*

6 REFERENCIAS

1. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2016 Jan 26;133(4):447–54.
2. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. Eur Heart J. 2016 Nov 7;37(42):3232–45.
3. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. Lancet Lond Engl. 1999 Jan 9;353(9147):89–92.
4. Roe MT, Messenger JC, Weintraub WS, Cannon CP, Fonarow GC, Dai D, et al. Treatments, trends, and outcomes of acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. J Am Coll Cardiol. 2010 Jul 20;56(4):254–63.
5. Reddy KS, Satija A. The Framingham Heart Study: impact on the prevention and control of cardiovascular diseases in India. Prog Cardiovasc Dis. 2010 Aug;53(1):21–7.
6. Brieger D, Fox K a. A, Fitzgerald G, Eagle KA, Budaj A, Avezum A, et al. Predicting freedom from clinical events in non-ST-elevation acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events. Heart Br Card Soc. 2009 Jun;95(11):888–94.
7. Tobbia P, Brodie BR, Witzenbichler B, Metzger C, Guagliumi G, Yu J, et al. Adverse event rates following primary PCI for STEMI at US and non-US hospitals: three-year analysis from the HORIZONS-AMI trial. EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol. 2013 Feb 22;8(10):1134–42.
8. Jabbari R, Engstrøm T, Glinge C, Risgaard B, Jabbari J, Winkel BG, et al. Incidence and Risk Factors of Ventricular Fibrillation Before Primary Angioplasty in Patients With First ST-Elevation Myocardial Infarction: A Nationwide Study in Denmark. J Am Heart Assoc. 4(1):e001399.
9. Prabhulkar S, Matthews J, Rawal S, Awdeh RM. Molecular Histopathology Using Gold Nanorods and Optical Coherence Tomography. Investig Opthalmology Vis Sci. 2013 Feb 12;54(2):1192.
10. Herrick JB. Landmark article (JAMA 1912). Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. By James B. Herrick. JAMA. 1983 Oct 7;250(13):1757–65.
11. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. Am Heart J. 1986 Feb;111(2):383–90.
12. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden

coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 May;20(5):1262–75.

13. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation. 1994 May;89(5):2462–78.
14. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. J Intern Med. 2000 Mar;247(3):349–58.
15. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. Nat Med. 2002 Nov;8(11):1211–7.
16. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nat Immunol. 2010 Feb;11(2):155–61.
17. Tabas I. Free cholesterol-induced cytotoxicity a possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. Trends Cardiovasc Med. 1997 Oct;7(7):256–63.
18. Schrijvers DM, De Meyer GRY, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jun;25(6):1256–61.
19. Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens APJJ, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. J Am Coll Cardiol. 2009 Apr 28;53(17):1517–27.
20. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek JE, Virmani R. Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease. JAMA. 1999 Mar 10;281(10):921–6.
21. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. N Engl J Med. 1997 May 1;336(18):1276–82.
22. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. Circulation. 1996 Apr 1;93(7):1354–63.
23. Kolpakov V, Polishchuk R, Bannykh S, Rekhter M, Solovjev P, Romanov Y, et al. Atherosclerosis-prone branch regions in human aorta: microarchitecture and cell composition of intima. Atherosclerosis. 1996 May;122(2):173–89.
24. Higuma T, Soeda T, Abe N, Yamada M, Yokoyama H, Shibutani S, et al. A Combined Optical Coherence Tomography and Intravascular Ultrasound Study on Plaque Rupture, Plaque Erosion, and Calcified Nodule in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Incidence, Morphologic Characteristics, and

Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention. JACC Cardiovasc Interv. 2015 Aug 17;8(9):1166–76.

25. Hong YJ, Jeong MH, Choi YH, Ma EH, Ko JS, Lee MG, et al. Differences in intravascular ultrasound findings in culprit lesions in infarct-related arteries between ST segment elevation myocardial infarction and non-ST segment elevation myocardial infarction. J Cardiol. 2010 Jul;56(1):15–22.
26. Ino Y, Kubo T, Tanaka A, Kuroi A, Tsujioka H, Ikejima H, et al. Difference of culprit lesion morphologies between ST-segment elevation myocardial infarction and non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: an optical coherence tomography study. JACC Cardiovasc Interv. 2011 Jan;4(1):76–82.
27. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. Nutr Rev. 1989 Jan;47(1):23–5.
28. Janoudi A, Shamoun FE, Kalavakunta JK, Abela GS. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque. Eur Heart J. 2016 Jul 1;37(25):1959–67.
29. In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography - PubMed [Internet]. [cited 2021 Aug 11]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23810884/
30. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. Heart Br Card Soc. 1999 Sep;82(3):265–8.
31. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. Circulation. 2001 Feb 20;103(7):934–40.
32. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. Circulation. 1996 Oct 15;94(8):2013–20.
33. Vergallo R, Porto I, D'Amario D, Annibali G, Galli M, Benenati S, et al. Coronary Atherosclerotic Phenotype and Plaque Healing in Patients With Recurrent Acute Coronary Syndromes Compared With Patients With Long-term Clinical Stability: An In Vivo Optical Coherence Tomography Study. JAMA Cardiol. 2019 Apr 1;4(4):321–9.
34. Muller JE, Tofler GH, Stone PH. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. Circulation. 1989 Apr;79(4):733–43.
35. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. Circulation. 2003 Oct 7;108(14):1664–72.
36. Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. Lab Investig J Tech Methods Pathol.

1991 Jan;64(1):5–15.

37. Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariéty J, Hansson GK. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. J Clin Invest. 1998 Sep 1;102(5):910–8.

38. Flego D, Liuzzo G, Weyand CM, Crea F. Adaptive Immunity Dysregulation in Acute Coronary Syndromes: From Cellular and Molecular Basis to Clinical Implications. J Am Coll Cardiol. 2016 Nov 8;68(19):2107–17.

39. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol. 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C13-18.

40. Potkin BN, Bartorelli AL, Gessert JM, Neville RF, Almagor Y, Roberts WC, et al. Coronary artery imaging with intravascular high-frequency ultrasound. Circulation. 1990 May;81(5):1575–85.

41. Xu Y, Mintz GS, Tam A, McPherson JA, Iñiguez A, Fajadet J, et al. Prevalence, distribution, predictors, and outcomes of patients with calcified nodules in native coronary arteries: a 3-vessel intravascular ultrasound analysis from Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree (PROSPECT). Circulation. 2012 Jul 31;126(5):537–45.

42. Stone PH, Saito S, Takahashi S, Makita Y, Nakamura S, Kawasaki T, et al. Prediction of progression of coronary artery disease and clinical outcomes using vascular profiling of endothelial shear stress and arterial plaque characteristics: the PREDICTION Study. Circulation. 2012 Jul 10;126(2):172–81.

43. Waksman R, Di Mario C, Torguson R, Ali ZA, Singh V, Skinner WH, et al. Identification of patients and plaques vulnerable to future coronary events with near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound imaging: a prospective, cohort study. Lancet Lond Engl. 2019 Nov 2;394(10209):1629–37.

44. Relationship between coronary plaque morphology of the left anterior descending artery and 12 months clinical outcome: the CLIMA study - PubMed [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31504405/

45. Erlinge D, Maehara A, Ben-Yehuda O, Bøtker HE, Maeng M, Kjøller-Hansen L, et al. Identification of vulnerable plaques and patients by intracoronary near-infrared spectroscopy and ultrasound (PROSPECT II): a prospective natural history study. Lancet Lond Engl. 2021 Mar 13;397(10278):985–95.

46. Kedhi E, Berta B, Roleder T, Hermanides RS, Fabris E, IJsselmuiden AJJ, et al. Thin-cap fibroatheroma predicts clinical events in diabetic patients with normal fractional flow reserve: the COMBINE OCT-FFR trial. Eur Heart J. 2021 Jul 29;ehab433.

47. Grandhi GR, Mirbolouk M, Dardari ZA, Al-Mallah MH, Rumberger JA, Shaw LJ, et al. Interplay of Coronary Artery Calcium and Risk Factors for Predicting CVD/CHD Mortality: The CAC Consortium. JACC Cardiovasc Imaging. 2020 May;13(5):1175–86.

48. Williams MC, Kwiecinski J, Doris M, McElhinney P, D'Souza MS, Cadet S, et al. Low-Attenuation Noncalcified Plaque on Coronary Computed Tomography Angiography Predicts Myocardial Infarction: Results From the Multicenter SCOT-HEART Trial (Scottish Computed Tomography of the HEART). Circulation. 2020 May 5;141(18):1452–62.

49. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002 Dec 19;420(6917):868–74.

50. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. Circ Res. 2016 Jan 8;118(1):145–56.

51. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. J Clin Invest. 1997 Mar 1;99(5):1037–43.

52. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science. 1991 Feb 15;251(4995):788–91.

53. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2009;27:669–92.

54. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. 2006 Jul;6(7):508–19.

55. Ye Y-X, Calcagno C, Binderup T, Courties G, Keliher EJ, Wojtkiewicz GR, et al. Imaging Macrophage and Hematopoietic Progenitor Proliferation in Atherosclerosis. Circ Res. 2015 Oct 23;117(10):835–45.

56. Schett G, Xu Q, Amberger A, Van der Zee R, Recheis H, Willeit J, et al. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. J Clin Invest. 1995 Dec;96(6):2569–77.

57. Shah PK. Inflammation and plaque vulnerability. Cardiovasc Drugs Ther. 2009 Feb;23(1):31–40.

58. Newby AC. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol. 2015 Jul;44–46:157–66.

59. Shen H, Yao P, Lee E, Greenhalgh D, Soulika AM. Interferon-gamma inhibits healing post scald burn injury. Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc. 2012 Aug;20(4):580–91.

60. Oikonomou E, Leopoulou M, Theofilis P, Antonopoulos AS, Siasos G, Latsios G, et al. A link between inflammation and thrombosis in atherosclerotic cardiovascular diseases: Clinical and therapeutic implications. Atherosclerosis. 2020 Sep;309:16–26.

61. Prati F, Cera M, Ramazzotti V, Imola F, Giudice R, Albertucci M. Safety and feasibility of a new non-occlusive technique for facilitated intracoronary optical coherence

tomography (OCT) acquisition in various clinical and anatomical scenarios. EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol. 2007 Nov;3(3):365–70.

62. Xu C, Schmitt JM, Carlier SG, Virmani R. Characterization of atherosclerosis plaques by measuring both backscattering and attenuation coefficients in optical coherence tomography. J Biomed Opt. 2008 Jun;13(3):034003.

63. Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, Aretz HT, Jang I-K, Schlendorf KH, et al. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. Circulation. 2002 Sep 24;106(13):1640–5.

64. Mori H, Torii S, Kutyna M, Sakamoto A, Finn AV, Virmani R. Coronary Artery Calcification and its Progression: What Does it Really Mean? JACC Cardiovasc Imaging. 2018 Jan;11(1):127–42.

65. Mintz GS. Intravascular imaging of coronary calcification and its clinical implications. JACC Cardiovasc Imaging. 2015 Apr;8(4):461–71.

66. Fujii K, Hao H, Shibuya M, Imanaka T, Fukunaga M, Miki K, et al. Accuracy of OCT, grayscale IVUS, and their combination for the diagnosis of coronary TCFA: an ex vivo validation study. JACC Cardiovasc Imaging. 2015 Apr;8(4):451–60.

67. Adriaenssens T, Allard-Ratick MP, Thondapu V, Sugiyama T, Raffel OC, Barlis P, et al. Optical Coherence Tomography of Coronary Plaque Progression and Destabilization: JACC Focus Seminar Part 3/3. J Am Coll Cardiol. 2021 Sep 21;78(12):1275–87.

68. Individual and combined effects of shear stress magnitude and spatial gradient on endothelial cell gene expression | American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00244.2007?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org

69. Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesisa - GIMBRONE - 2000 - Annals of the New York Academy of Sciences - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06318.x?sid=nlm%3Apubmed

70. Endothelial Shear Stress and Coronary Plaque Characteristics in Humans | Circulation: Cardiovascular Imaging [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCIMAGING.114.001932?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed

71. Thondapu V, Mamon C, Poon EKW, Kurihara O, Kim HO, Russo M, et al. High spatial endothelial shear stress gradient independently predicts site of acute coronary plaque rupture and erosion. Cardiovasc Res. 2021 Jul 7;117(8):1974–85.

72. Franck G, Mawson T, Sausen G, Salinas M, Masson GS, Cole A, et al. Flow

Perturbation Mediates Neutrophil Recruitment and Potentiates Endothelial Injury via TLR2 in Mice: Implications for Superficial Erosion. Circ Res. 2017 Jun 23;121(1):31–42.

73. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion | European Heart Journal | Oxford Academic [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://academic.oup.com/eurheartj/article/36/22/1394/2293278

74. Niccoli G, Montone RA, Di Vito L, Gramegna M, Refaat H, Scalone G, et al. Plaque rupture and intact fibrous cap assessed by optical coherence tomography portend different outcomes in patients with acute coronary syndrome. Eur Heart J. 2015 Jun 7;36(22):1377–84.

75. Pancoronary plaque vulnerability in patients with acute coronary syndrome and ruptured culprit plaque: a 3-vessel optical coherence tomography study - PubMed [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24332143/

76. Pancoronary Plaque Characteristics in STEMI Caused by Culprit Plaque Erosion Versus Rupture: 3-Vessel OCT Study - PubMed [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33129735/

77. Not All Plaque Erosions Are Equal - ClinicalKey [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1936878X19308605?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1936878X19308605%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F

78. Prevalence, Predictors, and Clinical Presentation of a Calcified Nodule as Assessed by Optical Coherence Tomography - ClinicalKey [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1936878X17305600?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1936878X17305600%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F

79. Calcified Plaques in Patients With Acute Coronary Syndromes - ClinicalKey [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1936879818324828?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1936879818324828%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F

80. Li J, Montarello NJ, Hoogendoorn A, Verjans JW, Bursill CA, Peter K, et al. Multimodality Intravascular Imaging of High-Risk Coronary Plaque. JACC Cardiovasc Imaging. 2021 May 12;S1936-878X(21)00343-0.

81. MacRitchie N, Grassia G, Noonan J, Garside P, Graham D, Maffia P. Molecular imaging of atherosclerosis: spotlight on Raman spectroscopy and surface-enhanced

Raman scattering. Heart Br Card Soc. 2018 Mar;104(6):460–7.

82. Otsuka K, Villiger M, Karanasos A, van Zandvoort LJC, Doradla P, Ren J, et al. Intravascular Polarimetry in Patients With Coronary Artery Disease. JACC Cardiovasc Imaging. 2020 Mar;13(3):790–801.

83. Osborn EA, Jaffer FA. The advancing clinical impact of molecular imaging in CVD. JACC Cardiovasc Imaging. 2013 Dec;6(12):1327–41.

84. Sheth TN, Pinilla-Echeverri N, Mehta SR, Courtney BK. First-in-Human Images of Coronary Atherosclerosis and Coronary Stents Using a Novel Hybrid Intravascular Ultrasound and Optical Coherence Tomographic Catheter. JACC Cardiovasc Interv. 2018 Dec 10;11(23):2427–30.

85. Bec J, Phipps JE, Gorpas D, Ma D, Fatakdawala H, Margulies KB, et al. In vivo label-free structural and biochemical imaging of coronary arteries using an integrated ultrasound and multispectral fluorescence lifetime catheter system. Sci Rep. 2017 Aug 21;7(1):8960.

86. Yin B, Piao Z, Nishimiya K, Hyun C, Gardecki JA, Mauskapf A, et al. 3D cellular-resolution imaging in arteries using few-mode interferometry. Light Sci Appl. 2019;8:104.

87. Muller J, Madder R. OCT-NIRS Imaging for Detection of Coronary Plaque Structure and Vulnerability. Front Cardiovasc Med. 2020;7:90.

88. Ughi GJ, Wang H, Gerbaud E, Gardecki JA, Fard AM, Hamidi E, et al. Clinical Characterization of Coronary Atherosclerosis With Dual-Modality OCT and Near-Infrared Autofluorescence Imaging. JACC Cardiovasc Imaging. 2016 Nov;9(11):1304–14.

89. Lee MW, Song JW, Kang WJ, Nam HS, Kim TS, Kim S, et al. Comprehensive intravascular imaging of atherosclerotic plaque in vivo using optical coherence tomography and fluorescence lifetime imaging. Sci Rep. 2018 Sep 28;8(1):14561.

90. Moreno PR, Lodder RA, Purushothaman KR, Charash WE, O'Connor WN, Muller JE. Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy. Circulation. 2002 Feb 26;105(8):923–7.

91. Madder RD, Puri R, Muller JE, Harnek J, Götberg M, VanOosterhout S, et al. Confirmation of the Intracoronary Near-Infrared Spectroscopy Threshold of Lipid-Rich Plaques That Underlie ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016 May;36(5):1010–5.

92. Hartman EMJ, Hoogendoorn A, Akyildiz AC, Schuurman A-S, van der Steen AFW, Boersma E, et al. Colocalization of Intracoronary Lipid-Rich Plaques and Calcifications: An Integrated NIRS-IVUS Analysis. JACC Cardiovasc Imaging. 2020 Jul;13(7):1627–8.

93. Danek BA, Karatasakis A, Karacsonyi J, Alame A, Resendes E, Kalsaria P, et al. Long-

term follow-up after near-infrared spectroscopy coronary imaging: Insights from the lipid cORe plaque association with CLinical events (ORACLE-NIRS) registry. Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv. 2017 May;18(3):177–81.

94. Htun NM, Chen YC, Lim B, Schiller T, Maghzal GJ, Huang AL, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. Nat Commun. 2017 Jul 13;8(1):75.

95. Ughi GJ, Verjans J, Fard AM, Wang H, Osborn E, Hara T, et al. Dual modality intravascular optical coherence tomography (OCT) and near-infrared fluorescence (NIRF) imaging: a fully automated algorithm for the distance-calibration of NIRF signal intensity for quantitative molecular imaging. Int J Cardiovasc Imaging. 2015 Feb;31(2):259–68.

96. van Dam GM, Themelis G, Crane LMA, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-α targeting: first in-human results. Nat Med. 2011 Sep 18;17(10):1315–9.

97. Kaufmann BA, Carr CL, Belcik JT, Xie A, Yue Q, Chadderdon S, et al. Molecular imaging of the initial inflammatory response in atherosclerosis: implications for early detection of disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Jan;30(1):54–9.

98. Phinikaridou A, Andia ME, Protti A, Indermuehle A, Shah A, Smith A, et al. Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. Circulation. 2012 Aug 7;126(6):707–19.

99. Stein-Merlob AF, Hara T, McCarthy JR, Mauskapf A, Hamilton JA, Ntziachristos V, et al. Atheroma Susceptible to Thrombosis Exhibit Impaired Endothelial Permeability In Vivo as Assessed by Nanoparticle-Based Fluorescence Molecular Imaging. Circ Cardiovasc Imaging. 2017 May 1;10(5):e005813.

100. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, Winterhalter S, Wagner S, Kresse M, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditable hyperlipidemic rabbits. Invest Radiol. 2000 Aug;35(8):460–71.

101. Liolios C, Sachpekidis C, Kolocouris A, Dimitrakopoulou-Strauss A, Bouziotis P. PET Diagnostic Molecules Utilizing Multimeric Cyclic RGD Peptide Analogs for Imaging Integrin αvβ3 Receptors. Molecules. 2021 Jan;26(6):1792.

102. Tong W, Hui H, Shang W, Zhang Y, Tian F, Ma Q, et al. Highly sensitive magnetic particle imaging of vulnerable atherosclerotic plaque with active myeloperoxidase-targeted nanoparticles. Theranostics. 2021;11(2):506–21.

103. Kiugel M, Hellberg S, Käkelä M, Liljenbäck H, Saanijoki T, Li X-G, et al. Evaluation of [68Ga]Ga-DOTA-TCTP-1 for the Detection of Metalloproteinase 2/9 Expression in Mouse Atherosclerotic Plaques. Molecules. 2018 Dec;23(12):3168.

104. Optical Visualization of Cathepsin K Activity in Atherosclerosis With a Novel, Protease-Activatable Fluorescence Sensor | Circulation [Internet]. [cited 2021 Dec

4]. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660340?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed

105. Sosnovik DE, Garanger E, Aikawa E, Nahrendorf M, Figuiredo J-L, Dai G, et al. Molecular MRI of cardiomyocyte apoptosis with simultaneous delayed-enhancement MRI distinguishes apoptotic and necrotic myocytes in vivo: potential for midmyocardial salvage in acute ischemia. Circ Cardiovasc Imaging. 2009 Nov;2(6):460–7.

106. Ronald JA, Chen Y, Belisle AJ-L, Hamilton AM, Rogers KA, Hegele RA, et al. Comparison of Gadofluorine-M and Gd-DTPA for Noninvasive Staging of Atherosclerotic Plaque Stability Using MRI. Circ Cardiovasc Imaging. 2009 May 1;2(3):226–34.

107. Evans RJ, Lavin B, Phinikaridou A, Chooi KY, Mohri Z, Wong E, et al. Targeted Molecular Iron Oxide Contrast Agents for Imaging Atherosclerotic Plaque. Nanotheranostics. 2020;4(4):184–94.

108. Lim B, Yao Y, Huang AL, Yap ML, Flierl U, Palasubramaniam J, et al. A Unique Recombinant Fluoroprobe Targeting Activated Platelets Allows In Vivo Detection of Arterial Thrombosis and Pulmonary Embolism Using a Novel Three-Dimensional Fluorescence Emission Computed Tomography (FLECT) Technology. Theranostics. 2017;7(5):1047–61.

109. Jaffer FA, Tung C-H, Wykrzykowska JJ, Ho N-H, Houng AK, Reed GL, et al. Molecular imaging of factor XIIIa activity in thrombosis using a novel, near-infrared fluorescent contrast agent that covalently links to thrombi. Circulation. 2004 Jul 13;110(2):170–6.

110. Yi S, Allen SD, Liu Y-G, Ouyang BZ, Li X, Augsornworawat P, et al. Tailoring Nanostructure Morphology for Enhanced Targeting of Dendritic Cells in Atherosclerosis. ACS Nano. 2016 Dec 27;10(12):11290–303.

111. Neuwelt A, Sidhu N, Hu C-AA, Mlady G, Eberhardt SC, Sillerud LO. Iron-Based Superparamagnetic Nanoparticle Contrast Agents for MRI of Infection and Inflammation. Am J Roentgenol. 2015 Mar 1;204(3):W302–13.

112. Man F, Gawne PJ, T.M. de Rosales R. Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. Adv Drug Deliv Rev. 2019 Mar 15;143:134–60.

113. Cheng K, Shen D, Hensley MT, Middleton R, Sun B, Liu W, et al. Magnetic antibody-linked nanomatchmakers for therapeutic cell targeting. Nat Commun. 2014 Sep 10;5(1):4880.

114. Allen S, Liu Y-G, Scott E. Engineering nanomaterials to address cell-mediated inflammation in atherosclerosis. Regen Eng Transl Med. 2016 Mar;2(1):37–50.

115. Ielo I, Rando G, Giacobello F, Sfameni S, Castellano A, Galletta M, et al. Synthesis,

Chemical–Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. Molecules. 2021 Sep 26;26(19):5823.

116. Li W, Chen X. Gold nanoparticles for photoacoustic imaging. Nanomed. 2015 Jan;10(2):299–320.

117. Chen W, Schilperoort M, Cao Y, Shi J, Tabas I, Tao W. Macrophage-targeted nanomedicine for the diagnosis and treatment of atherosclerosis. Nat Rev Cardiol. 2021 Nov 10;1–22.

118. Kim K, Huang S-W, Ashkenazi S, O'Donnell M, Agarwal A, Kotov NA, et al. Photoacoustic imaging of early inflammatory response using gold nanorods. Appl Phys Lett. 2007 May 28;90(22):223901.

119. O'Donnell M, McVeigh ER, Strauss HW, Tanaka A, Bouma BE, Tearney GJ, et al. Multimodality Cardiovascular Molecular Imaging Technology. J Nucl Med. 2010 May 1;51(Supplement 1):38S-50S.

120. Ha S, Carson A, Agarwal A, Kotov NA, Kim K. Detection and monitoring of the multiple inflammatory responses by photoacoustic molecular imaging using selectively targeted gold nanorods. Biomed Opt Express. 2011 Feb 23;2(3):645–57.

121. Yeager D, Karpiouk A, Wang B, Amirian J, Sokolov K, Smalling R, et al. Intravascular photoacoustic imaging of exogenously labeled atherosclerotic plaque through luminal blood. J Biomed Opt. 2012 Oct;17(10):106016.

122. Hu J, Romero Abujetas D, Tsoutsi D, Leggio L, Rivero F, Martín Rodríguez E, et al. Invited Article: Experimental evaluation of gold nanoparticles as infrared scatterers for advanced cardiovascular optical imaging. APL Photonics. 2018 Aug 1;3(8):080803.

123. Wojtkowski M, Kowalczyk A, Leitgeb R, Fercher AF. Full range complex spectral optical coherence tomography technique in eye imaging. Opt Lett. 2002 Aug 15;27(16):1415–7.

124. He J, Huang X, Li Y-C, Liu Y, Babu T, Aronova MA, et al. Self-Assembly of Amphiphilic Plasmonic Micelle-Like Nanoparticles in Selective Solvents. J Am Chem Soc. 2013 May 29;135(21):7974–84.

125. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. J Phys Chem B. 2006 Apr 1;110(14):7238–48.

126. Hu J, Rivero F, Torres RA, Loro Ramírez H, Rodríguez EM, Alfonso F, et al. Dynamic single gold nanoparticle visualization by clinical intracoronary optical coherence tomography. J Biophotonics. 2017;10(5):674–82.

127. Hu J, Ortgies DH, Aguliar Torres R, Fernández N, Porto L, Martín Rodríguez E, et al. Quantum Dots Emitting in the Third Biological Window as Bimodal Contrast Agents for Cardiovascular Imaging. Adv Funct Mater. 2017;27(41):1703276.

128. Yoo H, Kim JW, Shishkov M, Namati E, Morse T, Shubochkin R, et al. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. Nat Med. 2011 Nov 6;17(12):1680–4.

129. Gil HM, Price TW, Chelani K, Bouillard J-SG, Calaminus SDJ, Stasiuk GJ. NIR-quantum dots in biomedical imaging and their future. iScience. 2021 Mar 19;24(3):102189.

130. Marin R, Lifante J, Besteiro LV, Wang Z, Govorov AO, Rivero F, et al. Plasmonic Copper Sulfide Nanoparticles Enable Dark Contrast in Optical Coherence Tomography. Adv Healthc Mater. 2020;9(5):1901627.

131. Luther JM, Jain PK, Ewers T, Alivisatos AP. Localized surface plasmon resonances arising from free carriers in doped quantum dots. Nat Mater. 2011 May;10(5):361–6.

132. Lee S, Baek S, Park JP, Park JH, Hwang DY, Kwak SK, et al. Transformation from Cu2–xS Nanodisks to Cu2–xS@CuInS2 Heteronanodisks via Cation Exchange. Chem Mater. 2016 May 24;28(10):3337–44.

133. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cited 2022 Jan 4]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/

134. Comin A, Manna L. New materials for tunable plasmonic colloidal nanocrystals. Chem Soc Rev. 2014 May 15;43(11):3957–75.

135. Feng W, Nie W, Cheng Y, Zhou X, Chen L, Qiu K, et al. In vitro and in vivo toxicity studies of copper sulfide nanoplates for potential photothermal applications. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2015 May 1;11(4):901–12.

136. Regulatory T cells in cardiovascular diseases | Nature Reviews Cardiology [Internet]. [cited 2022 Jan 4]. Available from: https://www.nature.com/articles/nrcardio.2015.169?proof=t%2Btarget%3D

137. Cui Y, Wang X, Ren W, Liu J, Irudayaraj J. Optical Clearing Delivers Ultrasensitive Hyperspectral Dark-Field Imaging for Single-Cell Evaluation. ACS Nano. 2016 Mar 22;10(3):3132–43.

138. Muñoz-Ortiz T, Hu J, Ortgies DH, Shrikhande S, Zamora-Perez P, Granado M, et al. Molecular Imaging of Infarcted Heart by Biofunctionalized Gold Nanoshells. Adv Healthc Mater. 2021;10(10):2002186.

139. Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, Long CS. Expression and Regulation of Adhesion Molecules in Cardiac Cells by Cytokines. Circ Res. 1998 Mar 23;82(5):576–86.

140. Ban K, Ikeda U, Takahashi M, Kanbe T, Kasahara T, Shimada K. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat cardiac myocytes by monocyte chemoattractant protein-1. Cardiovasc Res. 1994 Aug 1;28(8):1258–62.

141. Ikeda U, Ikeda M, Kano S, Shimada K. Neutrophil Adherence to Rat Cardiac

Myocyte by Proinflammatory Cytokines. J Cardiovasc Pharmacol. 1994 Apr;23(4):647–52.

142. Niessen HWM, Krijnen P a. J, Visser CA, Meijer CJLM, Hack CE. Intercellular Adhesion Molecule-1 in the Heart. Ann N Y Acad Sci. 2002;973(1):573–85.

143. Redistribution of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine precedes reperfusion-induced apoptosis | American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology [Internet]. [cited 2022 Jan 5]. Available from: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.1998.274.1.H242

144. Geldwerth D, Kuypers FA, Bütikofer P, Allary M, Lubin BH, Devaux PF. Transbilayer mobility and distribution of red cell phospholipids during storage. J Clin Invest. 1993 Jul 1;92(1):308–14.

145. Watanabe T, Fan J. Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. Int J Cardiol. 1998 Oct 1;66 Suppl 1:S45-53; discussion S55.

146. Xu CR, Yusuf-Makagiansar H, Hu Y, Jois SDS, Siahaan TJ. Structural and ICAM-1-docking properties of a cyclic peptide from the I-domain of LFA-1: an inhibitor of ICAM-1/LFA- 1-mediated T-cell adhesion. J Biomol Struct Dyn. 2002 Apr;19(5):789–99.

147. Zhang N, Chittasupho C, Duangrat C, Siahaan TJ, Berkland C. PLGA nanoparticle--peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1. Bioconjug Chem. 2008 Jan;19(1):145–52.

148. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. The Lancet. 2012 Dec 15;380(9859):2095–128.

149. Alfonso F, Byrne RA, Rivero F, Kastrati A. Current Treatment of In-Stent Restenosis. J Am Coll Cardiol. 2014 Jun 24;63(24):2659–73.

150. Xhepa E, Bresha J, Joner M, Hapfelmeier A, Rivero F, Ndrepepa G, et al. Clinical outcomes by optical characteristics of neointima and treatment modality in patients with coronary in-stent restenosis. EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol. 2021 Aug 6;17(5):e388–95.

151. Stone GW, Maehara A, Ali ZA, Held C, Matsumura M, Kjøller-Hansen L, et al. Percutaneous Coronary Intervention for Vulnerable Coronary Atherosclerotic Plaque. J Am Coll Cardiol. 2020 Nov 17;76(20):2289–301.