



Benemérita Universidad Autónoma
de Puebla



Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas

Desarrollo de un biosensor de fibra óptica para aplicaciones en
optogenética

Tesis presentada al

Posgrado en Física Aplicada

como requisito parcial para la obtención del grado de
Maestría en ciencias (Física Aplicada)

Presenta:

Karina González León

Asesores de tesis:

Dra. Georgina Beltrán Pérez (FCFM-BUAP)

Dr. Raúl Delgado Macuil (CIBA-IPN)

Puebla, Pue.
Diciembre 2020

Índice general

Agradecimientos	v
Dedicatoria	vii
Resumen	ix
1. Introducción	1
2. Teoría	3
2.1. Biosensor	3
2.2. Elementos de reconocimiento biológico (ERB)	4
2.2.1. Anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina	4
2.2.2. Opsina Opn5	4
2.3. Fibras ópticas	4
2.3.1. Ecuaciones de guía de onda para fibras de índice escalonado	6
2.4. Fibra con rejilla de período largo	9
2.4.1. Acoplamiento de modos en fibras con rejillas	10
3. Metodología	13
3.1. Materiales	13
3.2. Fibra con Taper (FO-taper)	14
3.3. Fibra en FRPL	14
3.4. Sistema de Transducción	15
3.4.1. Limpieza de la matriz soporte	15
3.4.2. Hidroxilación	16
3.4.3. Funcionalización	16
3.4.4. Inmovilización	17
3.4.5. Receptor de kisspeptina	17
3.4.6. OPN5	17
3.5. Material Biológico	18
3.6. Detección	18
3.6.1. kisspeptina	18
3.6.2. Opsina Opn5	18
3.7. Microscopía óptica	19
3.8. Microscopía electrónica de barrido	19
3.9. Espectroscopia de infrarrojo	19
3.10. Transmisión	19
3.11. Análisis de componentes principales	20
3.11.1. Dedución de las componentes principales	20

4. Biosensores en Fibra con Taper	23
4.1. Microscopia óptica	23
4.2. Microscopia electrónica de barrido	24
4.3. Espectroscopia de infrarrojo	26
4.4. Transmisión	27
4.5. Análisis de componentes principales de los resultados experimentales de transmisión . .	28
4.6. Conclusiones Parciales	30
5. Biosensores en FRPL	31
5.1. Microscopia óptica	31
5.2. Espectroscopia de infrarrojo	32
5.3. Transmisión	33
5.3.1. Cerebro	33
5.3.2. Gónadas	37
5.4. Análisis de componentes principales de los resultados experimentales de transmisión . .	40
5.4.1. Cerebro	40
5.4.2. Gónadas	44
5.5. Conclusiones Parciales	47
6. Conclusiones Generales	49
A. Imágenes de Microscopia	51
B. Análisis de componentes principales realizado en python	53
C. Graficas	57
D. Datos de PCA	61
E. Artículo Publicado	63
Bibliografía	65

Agradecimientos

Esta tesis es el producto de muchos días de trabajo, pero no solo mío sino de todos aquellos que me han dado su apoyo, en particular quiero agradecer a:

- A la Dra. Georgina Beltrán Pérez y Dr. Raúl Delgado Macuil por compartir su conocimiento, por la paciencia que han tenido con migo y su apoyo.
- Dr. Raúl Delgado Macuil por trasportarme al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, muchas gracias.
- Estoy muy agradecida con mis asesores porque sin su ayuda este trabajo no hubiese sido posible, ustedes son mi ejemplo a seguir.
- Finalmente, agradezco a CONACYT por la beca de manutención que me fue otorgada.

Dedicatoria

Para poder llegar a este punto de mi vida muchas personas han contribuido, por lo que no me quedá más que dedicarles este trabajo de tesis:

- A mi papá Alberto González Hernández que siempre me motivo a seguir adelante y deseaba con todo su corazón que llegaré este día, se que si estuvieras aquí entre nosotros, estarías orgulloso de mi.
- A mi mamá Araceli León Rosas por darme la vida, sus enseñanzas y todo su apoyo. Gracias, te quiero mucho.
- A mis hermanas Lesly y Karol Naomi que siempre me apoyan.
- Al M. C. Moisés Zeleny Mora por su ayuda, consejos y enseñanzas en el área de programación. Gracias por ser mi compañero, amigo y novio. Te agradezco por apoyarme y acompañarme en todo momento. Siempre estaré muy agradecida con tigo por confiar y creer en mi. Gracias, I Fluvín You.
- A mis tíos Josefina León Rosas y Guadalupe Trujillo por aconsejarme y apoyarme en todo momento de mi vida.
- A mi familia, amigos y compañeros que me acompañaron en esta etapa de mi vida.

Resumen

En este trabajo de tesis se propuso desarrollar un biosensor basado en fibra óptica (FO) el cual utilizó como elemento de reconocimiento biológico (ERB) un anticuerpo policlonal (Receptor de kisspeptina y OPN5), permitiendo detectar con una alta especificidad la kisspeptina y opsina 5 (Opn5), respectivamente. Se desarrolló la metodología del autoensamblado del biosensor en fibra óptica adelgazada (FO-taper) y con rejilla de período largo (FRPL) para amplificar los cambios en amplitud de la señal transmitida. El desarrollo del biosensor FO-taper se utilizó como practica para la detección de la Opn5. Lo que permitió mejorar las etapas del autoensamblado del biosensor.

La respuesta de los biosensores en FO-taper y FRPL, se caracterizó en cada etapa de autoensamblado del biosensor utilizando como analito la proteína kisspeptina y la opsina Opn5, presente en el cerebro en la región del hipotálamo y gónadas del modelo murino. La proteína kisspeptina se genera en el hipotálamo y está relacionado con el inicio de la pubertad y también puede ayudar a suprimir metástasis de melanoma en el cáncer de mama. Y la opsina (Opn5) se sobreexpresa en carcinomas de cerebro, ovario, mama y próstata y puede funcionar como un nuevo biomarcador importante para diagnosticar y controlar varios tipos de cáncer.

La superficie de la fibra se preparó químicamente para inmovilizar el anticuerpo (Receptor de kisspeptina o OPN5), mediante: la preparación de la superficie (FO-taper o FRPL), hidroxilación y funcionalización de la superficie. Después del proceso de la funcionalización, el anticuerpo policlonal se unió a la superficie de la FO, lo que llamamos biosensor. Una vez elaborado el biosensor, la detección de la proteína kisspeptina y la opsina Opn5, se realizó en cortes de tejidos de cerebro en la región hipotalámica y gónadas.

Y la caracterización estructural y microscópica de los biosensores en FO-taper y FRPL, en cada etapa del autoensamblado, permitió determinar la unión química de las moléculas en la superficie de la fibra óptica monomodo (SMF-28). El análisis de homogeneidad morfológica en los biosensores en FO-taper se realizó mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Y para los biosensores en FRPL solo se realizó mediante microscopía óptica.

La homogeneidad estructural de los biosensores en FO-taper y FRPL en cada etapa del autoensamblaje, se caracterizó por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y por mediciones de la transmisión a la salida del biosensor utilizando un diodo superluminiscente. Permitiendo observar la evolución temporal de la transmisión, que está relacionada con la interacción de los biosensores cuando fueron expuestos a los tejidos cerebrales y gónadas. La evolución de los espectros de transmisión permitió determinar la respuesta y funcionamiento de los biosensores en función del tiempo.

Y finalmente se analizaron los espectros en transmitancia a través del análisis de componentes principales (PCA), para facilitar la interpretación de los datos obtenidos en el autoensamblado de los biosensores. Y se realizó un programa en python para obtener los valores de las componentes principales

para mediciones futuras.

Capítulo 1

Introducción

Los biosensores son dispositivos que proporcionan información a partir de reacciones bioquímicas específicas por medio de elementos biológicos para detectar compuestos químicos por señales eléctricas, térmicas u ópticas, entre otras [1]. El biosensor está conformado por un sistema de transducción y un elemento de reconocimiento biológico (ERB). Al entrar en contacto directo el ERB con el compuesto químico que nos interesa detectar (llamado analito), se generará una reacción físico-química la cual se detectará en el transductor, convirtiendo la interacción en una señal cuantitativa o cualitativa. Existen diferentes tipos de transductores: óptico, electroquímico, piezoeléctrico, magnético y mecánico, y existen dos tipos de elementos de reconocimiento: catalítico (enzimas, células, tejidos) y afinidad (anticuerpos, proteínas) y dependiendo del tipo de transductor y el ERB que se esté utilizando definirá el tipo de biosensor [1, 2].

Los biosensores que utilizan como transductor fibra óptica, permiten relacionar la concentración del analito de interés con los cambios en las características de luz propagada a través de la guía de onda, esto al detectar el cambio en el índice de refracción de una solución así como obtener información en tiempo real [3, 4, 5]. Y los biosensores que utilizan como ERB anticuerpos o proteínas, tienen alta afinidad y especificidad para detectar analitos de interés, es decir tienen la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros elementos están presentes [1, 2, 6].

Por otra parte, en el cerebro, específicamente en el hipotálamo, se excretan proteínas (opsinas) las cuales son enviadas a través del líquido cefalorraquídeo a diferentes órganos de nuestro cuerpo, ellas son las responsables del buen funcionamiento biológico de diferentes células [7], por lo tanto la ausencia o exceso de opsinas excretadas, como la opsina 5 (Opn5), inducen que alguna persona pueda o no presentar Alzheimer [8], depresión [9], o síndrome de ovario poliquístico [10], las cuales no tienen cura alguna, solo existen tratamientos para mejorar la calidad de vida. Por lo tanto una de las líneas de investigación que nos permitirá estudiar las proteínas generadas por estas enfermedades es la *Optogenética*. La Optogenética permite controlar y manipular la respuesta de los genes por medio de estímulos luminosos [11].

En 2018, Dennis et al. [12] mostró cómo un conjunto de herramientas optogenéticas puede ayudar a controlar la expresión genética con canales iónicos microbianos activados por luz, bombas de iones y receptores acoplados a proteína G (GPCR). Además, la optogenética combina el uso de proteínas sensibles a la luz con estrategias de orientación genética. Como ejemplo, los optrodos utilizan fibra óptica para manipular la expresión genética mediante estimulación lumínica.

Debido a este tipo de aplicaciones, en este trabajo se desarrolló un biosensor óptico el cual permita

detectar la presencia de la kisspeptina y *Opn5*, expresada en tejidos del modelo murino. Se utilizó como ERB el anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina y opsina 5 (OPN5) y como transductor la fibra monomodo SMF-28. Donde para aumentar la sensibilidad en la FO, una alternativa es por medio del adelgazamiento (taper) químico de la fibra o generar rejillas de período largo.

El desarrollo del biosensor fue posible inmovilizando el anticuerpo al soporte de silicio de la fibra óptica por unión química, esto a través de enlaces covalentes [13]. Se preparó la superficie de la fibra óptica para dejar disponibles los sitios activos donde llegará la opsina a inmovilizarse.

En resumen, este trabajo de tesis presenta el desarrollo y la caracterización de un biosensor basado en fibra óptica con taper y rejilla de período largo; se utilizó fibra óptica SMF-28 como matriz soporte del sistema de transducción para aprovechar la onda evanescente que se propaga en la zona del revestimiento, la cual decae exponencialmente en la zona donde se implementó el biosensor. A la fibra óptica se le hizo el grabado de rejillas de período largo (RPL) para amplificar los cambios en la amplitud de la señal transmitida.

Mediante espectroscopia de infrarrojo se caracterizó cada una de las etapas de autoensamblado del biosensor. La detección se realizó en tiempo real, donde el ERB reconoció a la kisspeptina y la opsina *Opn5* directamente en el tejido del cerebro en la región del hipotálamo y en gónadas de modelo murino, monitoreando las variaciones espectrales en transmisión en la región del infrarrojo cercano.

Los objetivos de esta tesis son los siguientes:

■ **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un Biosensor utilizando como elemento de reconocimiento el anticuerpo policlonal OPN5 y como matriz soporte fibra monomodo SMF-28 para aplicaciones en Optogenética.

■ **OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y METAS**

- Objetivo 1. Desarrollar la metodología del autoensamblado del biosensor en fibras ópticas.
- Objetivo 2. Determinar el tipo de morfología mas adecuada generada en la fibra óptica (fibra óptica estrechada, rejillas de período largo) en función de los cambios en transmitancia y reflexión.
- Objetivo 3. Caracterizar mediante espectroscopia por infrarrojo, microscopias ópticas y electrónicas cada etapa de autoensamblado del biosensor.
- Objetivo 4. Caracterización del biosensor empleando OPN 5 policlonal comercial.
- Objetivo 5. Determinar la respuesta en amplitud y espectral del biosensor desarrollado interactuando con tejido cerebral y gonadas del modelo murino.

Capítulo 2

Teoría

2.1. Biosensor

Los biosensores son dispositivos que proporcionan información a partir de reacciones bioquímicas específicas por medio de elementos biológicos para detectar compuestos químicos por señales eléctricas, térmicas u ópticas, entre otras. Por lo tanto al entrar en contacto directo el elemento de reconocimiento biológico (ERB) con el compuesto químico que nos interesa detectar (llamado analito), se generará una reacción físico-química la cual se detectará en el transductor, convirtiendo la interacción en una señal cuantitativa o cualitativa.

Los biosensores son dispositivos analíticos conformados por un sistema de transducción (transductor) y un ERB. Existen diferentes tipos de transductores: óptico, electroquímico, piezoeléctrico, magnético y mecánico. El biosensor en presencia de algún analito y mediante la interacción entre el ERB y el analito, produce una señal la cual está asociada a un mecanismo de detección e interpretación de la señal obtenida.

Los biosensores que utilizan como transductor fibra óptica (FO) son denominados biosensores ópticos. El principio básico de un biosensor óptico es la interacción de la onda evanescente con el anticuerpo. Con la modificación del índice de refracción circundante, cambia el coeficiente de extinción de la onda evanescente, lo que genera pérdidas en la energía lumínica que viaja por el núcleo de la fibra, y de esta manera, dichas pérdidas pueden relacionarse con la diferente cantidad de proteína detectada.

Para aumentar la sensibilidad en la zona de la cubierta, una alternativa es por medio del adelgazamiento (devaste o mejor conocido como taper) químico de la FO, donde la onda evanescente puede interactuar con el medio externo. La FO con taper (OF-taper) puede aumentar este efecto y es muy atractivo para aplicaciones de biosensores. Por ejemplo, se ha publicado, entre otros trabajos, el desarrollo de un biosensor OF-taper con anticuerpos antigliadina que, de forma importante, puede reducir el tiempo y el volumen sérico necesarios para la prueba de la enfermedad celiaca [14, 15, 16].

También otra manera para aumentar la sensibilidad en la FO es utilizando rejillas de período largo. Por lo tanto, los biosensores basados en rejillas de fibra de período (FRPL) pueden actuar como optrodos y la proteína expresada por la respuesta del gen a la irradiación de luz podría detectarse en tiempo real [17, 18, 19]. En este contexto, los biosensores de fibra óptica han ganado una atención considerable en los últimos años al centrarse en FRPL para numerosas aplicaciones. Debido a que cuando cambia el índice de refracción del medio circundante, también se modifica el índice de refracción efectivo de la cubierta, lo que conduce a un desplazamiento o atenuación en la banda central.

Por el contrario, las interacciones biomoleculares que tienen lugar alrededor de la superficie de un transductor permanecen confinadas dentro de las capas de espesor finito. Por tanto, la FRPL juega un papel importante en la detección física, química y biológica [20, 21]. Además, estos biosensores tienen la capacidad potencial de detección *in situ*, en tiempo real y remota, sin la necesidad de manipular la sustancia bajo examen, y se pueden multiplexar fácilmente para detección multipunto.

2.2. Elementos de reconocimiento biológico (ERB)

Existen dos tipos de ERB; catalítico (enzimas, células, tejidos) y afinidad (anticuerpos, proteínas). Dependiendo del tipo de transductor y el ERB que se esté utilizando definirá el tipo de biosensor. Los biosensores que utilizan como ERB proteínas o anticuerpos, tienen alta afinidad y especificidad para detectar analitos de interés, es decir tienen la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros elementos están presentes.

Las proteínas son capaces de llevar a cabo una gran diversidad de tareas esenciales para el buen funcionamiento del cuerpo humano, por lo tanto son fundamentales para la estructura y función de las células. Existen diferentes tipos de proteínas, por ejemplo: Hormonas, proteínas estructurales, proteínas de transporte, proteínas contráctiles, proteínas relacionadas con la inmunidad y la defensa, proteínas que regulan genes, enzimas, proteínas receptoras y de transducción de señales.

En particular los receptores son proteínas, los cuales tienen la propiedad de unirse a moléculas específicas, como los factores de crecimiento. Y tienen la capacidad de transmitir la señal al interior de la célula.

2.2.1. Anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina

El receptor de kisspeptina se expresa ampliamente en humanos, ratas y ratones. El anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina como ERB, permite detectar con una alta especificidad la proteína kisspeptina en tejidos cerebrales, y es generada en el hipotálamo. El receptor de kisspeptina actúa como un interruptor molecular para la pubertad, también puede ayudar a suprimir la metástasis de melanoma en el cáncer de mama. Además está relacionado con diabetes, sistema cardiovascular y es responsable de la regulación estacional y metabólica de la reproducción mediante la integración de señales internas y externas [22].

2.2.2. Opsina Opn5

La neuropsina es una proteasa descubierta recientemente como un pigmento fotosensible de vertebrados expresado por el gen *Opn5* [23, 24, 25]. Este gen es parte de un nuevo subgrupo de rodopsinas, que comparten solo una pequeña porción de una secuencia con otros tipos de opsinas. Dado que juega un papel importante en la actividad neural y la diferenciación de células embrionarias, este gen puede detectarse predominantemente en el hipotálamo, la médula espinal, los ojos, la piel, el cerebro y los tejidos neuronales [26, 27]. Numerosos estudios han demostrado que las neuropsinas, en particular la opsina (*Opn5*), se sobreexpresan en los carcinomas de ovario, mama y próstata, y que algunas de ellas pueden incluso ser nuevos biomarcadores importantes para diagnosticar y controlar varios tipos de cáncer [10, 28, 29, 30].

2.3. Fibras ópticas

Una fibra óptica (FO) es una guía de onda dieléctrica cilíndrica a través de la cual se propaga la onda de luz. La FO tiene un núcleo central con índice de refracción n_1 y una capa de recubrimiento

exterior llamada cubierta cuyo índice de refracción es n_2 menor a n_1 , figura 2.1. El índice de refracción cuantifica la velocidad de propagación de una onda en un medio en relación a la velocidad de la luz en el vacío.

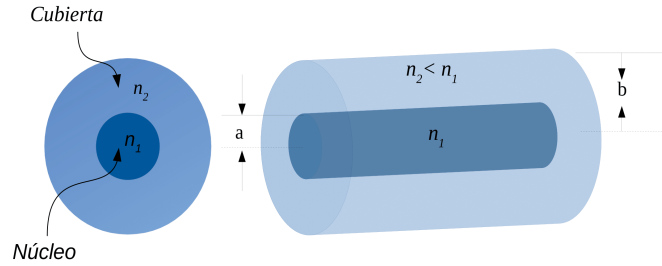


Figura 2.1: Fibra óptica: onda dieléctrica cilíndrica.

Dependiendo del diámetro del núcleo, podrán propagarse uno o más modos. Es decir, si el diámetro del núcleo es pequeño, solo se permite un modo único y se dice que la fibra es una *fibra monomodo* y las fibras con diámetros de núcleo grandes son llamadas *fibras multimodo*. La figura 2.2 (a) muestra los perfiles de índice de fibra monomodo y multimodo, el perfil de índice describe el índice de refracción de una fibra óptica a lo largo del eje transversal de la fibra.

Un haz de luz al incidir en el núcleo de la fibra desde un medio de índice de refracción n_0 en un ángulo θ_0 con respecto al eje de la fibra, incide en la interfaz núcleo-cubierta a un ángulo normal ϕ . Los haces de luz que inciden en el límite del revestimiento del núcleo en ángulos mayores que el ángulo crítico se reflexionan y son guiados a través del núcleo sin refracción. Los haces de mayor inclinación al eje de la fibra pierden parte de su potencia en la cubierta en cada reflexión y no son guiados, figura 2.2 (b).

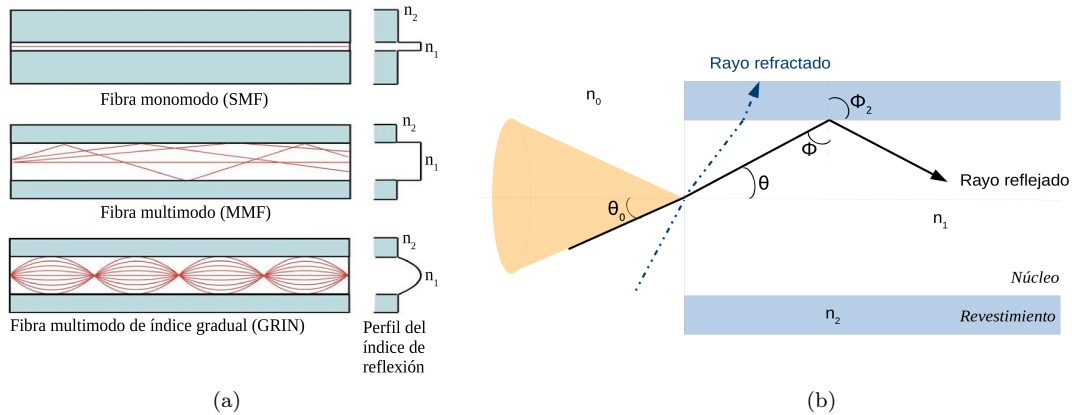


Figura 2.2: (a) Comparación del perfil del índice de refracción de SMF, MMF y GRIN. (b) Haz incidente en el núcleo.

El ángulo crítico se obtiene aplicando la ley de Snell a un haz propagándose de un índice de refracción n_1 a un medio de índice de refracción n_2 , donde los ángulos de incidencia y refracción vienen dados por,

$$\frac{\sin \phi}{\sin \phi_2} = \frac{n_2}{n_1} \tag{2.1}$$

la reflexión total en la interfase entre el núcleo y la cubierta se produce cuando $\phi_2 = 90^\circ$ de forma que el ángulo crítico $\phi = \phi_c$, esta dado por

$$\begin{aligned} n_1 \sin \phi_c &= n_2 \sin 90^\circ \\ \sin \phi_c &= \frac{n_2}{n_1} \\ \Rightarrow \phi_c &= \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \end{aligned}$$

Ahora para conocer el ángulo máximo en el que un haz incide en un medio con índice de refracción n_0 , aplicando la ley de Snell, tenemos

$$\begin{aligned} n_0 \sin(\theta_0) &= n_1 \sin \theta, \text{ donde } \theta = 90 - \phi_c \\ &= n_1 \sin(90 - \phi_c) \\ &= n_1 (\sin 90 \cos \phi_c + \cos 90 \sin \phi_c) \\ \Rightarrow &= n_1 \cos \phi_c \end{aligned} \tag{2.2}$$

si aplicamos la ley de Snell en el límite aire-núcleo, donde $n_0 = 1$, el ángulo θ_0 en el aire correspondiente al ángulo θ en el núcleo se obtiene a partir de

$$\begin{aligned} 1 \sin \theta_0 &= \sin \theta_0 = n_1 \cos \phi_c \\ &= n_1 \sqrt{1 - \sin^2 \phi_c} \\ &= n_1 \sqrt{1 - \frac{n_2^2}{n_1^2}} \\ &= n_1 \sqrt{\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2}} \\ \Rightarrow \sin \theta_0 &= \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \end{aligned}$$

por lo tanto el ángulo de aceptación de la fibra es

$$\theta_0 = \sin^{-1} \sqrt{n_1^2 - n_2^2} = \sin^{-1} NA \tag{2.3}$$

donde el apertura numérica (NA) describe la capacidad de captación de la luz de la fibra, este valor es dado por

$$NA = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \tag{2.4}$$

2.3.1. Ecuaciones de guía de onda para fibras de índice escalonado

En esta sección se examina la propagación de la luz monocromática en fibras de índice escalonado utilizando la teoría electromagnética. El objetivo es determinar los campos eléctricos y magnético de ondas guiadas que satisfacen las ecuaciones de maxwell y las condiciones de contorno impuestas por el núcleo dieléctrico cilíndrico y la cubierta. Cada una de las componentes de los campos eléctrico y magnético debe satisfacer la ecuación de Helmholtz,

$$\nabla^2 U + n^2 k_0^2 U = 0$$

donde $k_0 = 2\pi/\lambda_0$, $n = n_1$ en el núcleo ($r < a$) y $n = n_2$ en el cubierta ($r > a$). Suponemos que el radio b de la cubierta es lo suficientemente grande como para asumir con seguridad que es infinito al examinar la luz guiada en el núcleo y cerca del límite del revestimiento del núcleo. Utilizando el laplaciano en coordenadas cilíndricas,

$$\nabla^2 U = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial U}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2}$$

se tiene la ecuación de Helmholtz en un sistema de coordenadas cilíndrico escrita como;

$$\begin{aligned} & \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial U}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 U = 0 \\ \Rightarrow & \frac{1}{r} \left(\frac{\partial r}{\partial r} \frac{\partial U}{\partial r} + r \frac{\partial^2 U}{\partial r^2} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 U = 0 \\ \Rightarrow & \frac{\partial^2 U}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial U}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 U = 0 \end{aligned} \quad (2.5)$$

$$U(r, \phi, z) = u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} \quad (2.6)$$

donde la amplitud compleja $U = U(r, \phi, z)$ representa cualquiera de las componentes cartesianas de los campos eléctricos o magnéticos. Tomando en cuenta que nos interesan las soluciones que toman la forma de onda que viajan en la dirección z con una constante de propagación β , de modo que la dependencia z de U es de la forma $\exp(-j\beta z)$. Dado que U debe ser una función periódica del ángulo ϕ con período 2π , se asume que la dependencia de ϕ es armónica $\exp(-jl\phi)$, donde l es un número entero.

Sustituyendo $U(r, \phi, z) = u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z}$, $l = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ en (2.5),

$$\begin{aligned} & \frac{\partial^2 u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z}}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z}}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z}}{\partial \phi^2} + \\ & \frac{\partial^2 u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z}}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} = 0 \\ \Rightarrow & e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} \frac{\partial^2 u(r)}{\partial r^2} + e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} \frac{1}{r} \frac{\partial u(r)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} u(r) e^{-j\beta z} \frac{\partial^2 e^{-jl\phi}}{\partial \phi^2} + u(r) e^{-jl\phi} \frac{\partial^2 e^{-j\beta z}}{\partial z^2} \\ & + n^2 k_0^2 u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} = 0 \end{aligned}$$

donde

- $\frac{\partial^2 e^{-jl\phi}}{\partial \phi^2} = \frac{\partial}{\partial \phi} \left(\frac{\partial e^{-jl\phi}}{\partial \phi} \right) = \frac{\partial}{\partial \phi} (-jl e^{-jl\phi}) = -jl \frac{\partial e^{-jl\phi}}{\partial \phi} = -jl (-jl) e^{-jl\phi} = j^2 l^2 e^{-jl\phi}$
- $\frac{\partial^2 e^{-j\beta z}}{\partial z^2} = \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial e^{-j\beta z}}{\partial z} \right) = \frac{\partial}{\partial z} (-j\beta e^{-j\beta z}) = -j\beta \frac{\partial e^{-j\beta z}}{\partial z} = -j\beta (-j\beta) e^{-j\beta z} = j^2 \beta^2 e^{-j\beta z}$

al sustituir se tiene,

$$\begin{aligned} & e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} \frac{\partial^2 u(r)}{\partial r^2} + e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} \frac{1}{r} \frac{\partial u(r)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} u(r) e^{-j\beta z} j^2 l^2 e^{-jl\phi} + u(r) e^{-jl\phi} j^2 \beta^2 e^{-j\beta z} \\ & + n^2 k_0^2 u(r) e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} = 0 \\ \Rightarrow & e^{-jl\phi} e^{-j\beta z} \left(\frac{\partial^2 u(r)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u(r)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} u(r) j^2 l^2 + u(r) j^2 \beta^2 + n^2 k_0^2 u(r) \right) = 0 \\ \Rightarrow & \frac{\partial^2 u(r)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u(r)}{\partial r} + \left(\frac{j^2 l^2}{r^2} + j^2 \beta^2 + n^2 k_0^2 \right) u(r) = \frac{\partial^2 u(r)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u(r)}{\partial r} + \left(-\frac{l^2}{r^2} - \beta^2 + n^2 k_0^2 \right) u(r) = 0 \end{aligned}$$

se obtiene una ecuación diferencial ordinaria para $u(r)$:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u}{\partial r} + \left(n^2 k_0^2 - \beta^2 - \frac{l^2}{r^2} \right) u = 0 \quad (2.7)$$

La onda es guiada si la constante de propagación es menor que el número de onda en el núcleo ($\beta < n_1 k_0$) y mayor que el número de onda en el cubierta ($\beta > n_2 k_0$). Conviene definir

- $k_T^2 = n_1^2 k_0^2 - \beta^2$
- $\gamma^2 = \beta^2 - n_2^2 k_0^2$

al sustituir en la ecuación (2.7) se tiene;

$$\frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u}{\partial r} + \left(k_T^2 - \frac{l^2}{r^2} \right) u = 0 \quad (2.8)$$

$$\frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u}{\partial r} + \left(-\gamma^2 - \frac{l^2}{r^2} \right) u = \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u}{\partial r} - \left(\gamma^2 + \frac{l^2}{r^2} \right) u = 0 \quad (2.9)$$

donde (2.8) y (2.9) son ecuaciones diferenciales, que tienen como soluciones a la familia de funciones de Bessel.

$$u(r) \propto \begin{cases} J_\nu(k_T r), & r \leq a \quad (\text{Núcleo}) \\ K_\nu(k_T r), & r \geq a \quad (\text{Cubierta}) \end{cases} \quad (2.10)$$

donde $J_\nu(x)$ es una función de Bessel de primera clase de orden ν y $K_\nu(x)$ es la función de Bessel modificada de segunda clase de orden ν , ver figura 2.3. La función $J_\nu(x)$ oscila como la función seno o coseno pero con una amplitud decreciente. Mientras la función $K_\nu(x)$ decae exponencialmente a lo largo de x .

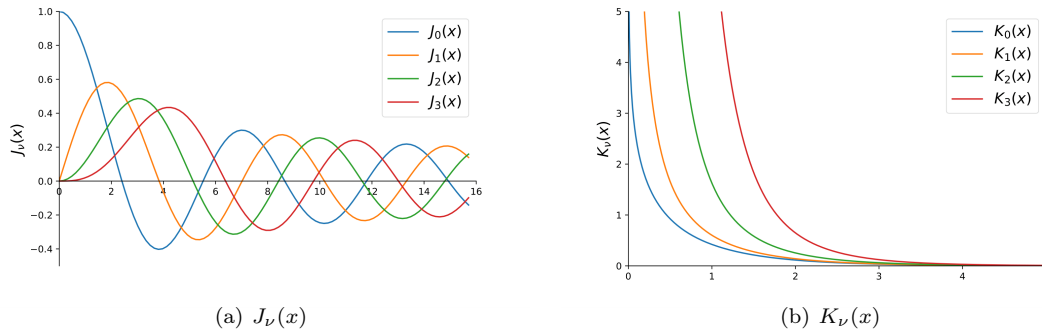


Figura 2.3: Variaciones de la función Bessel $J_\nu(x)$ y $K_\nu(x)$ para los cuatro primeros ordenes ($\nu=0,1,2,3$).

En la figura 2.4, se muestran dos ejemplos de la distribución de $u(r)$, ec. 2.8 para $\nu = 0$ y $\nu = 3$. Donde la región del núcleo es para $0 < r < a$ y la cubierta para $r > a$.

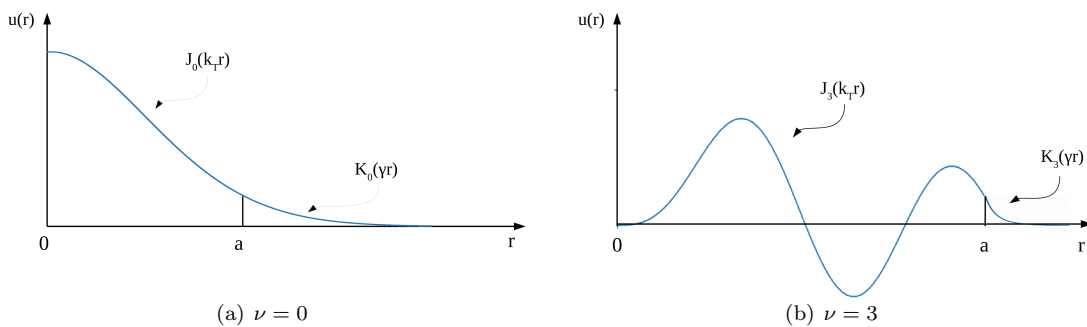


Figura 2.4: Ejemplo de la distribución radial de $u(r)$ para $\nu = 0, 3$.

2.4. Fibra con rejilla de período largo

Las rejillas de fibra óptica se han convertido en los últimos años en componentes básicos dentro de los sistemas de comunicaciones ópticas y en sistemas de sensores y biosensores. Algunas de las ventajas que ofrecen las rejillas de fibra óptica son la geometría de las mismas, la baja pérdida de inserción, y potencialmente, un bajo costo. La aparición de las rejillas de fibra óptica ha hecho que se aumente la estabilidad y portabilidad de estos sistemas y también que se reduzca considerablemente el tamaño de los dispositivos ópticos. Sin embargo la característica que hace de las rejillas un componente tan interesante es la flexibilidad que ofrecen para conseguir determinadas características espectrales (reflexión, transmisión, dispersión y filtrado de campo electromagnético).

Esta flexibilidad se debe a una dependencia de la respuesta espectral a las distintas características de una rejilla de fibra óptica. De esta forma es posible aislar determinadas longitudes de onda a partir del espectro de una señal que viaje por la fibra óptica. Es por esta razón que las rejillas de fibra óptica son usadas en dispositivos ópticos dentro de sistemas WDM como filtros, láseres, amplificadores, OADMs (Optical Add/Drop Multiplexers), compensadores de dispersión cromática, etc. Adicionalmente se han encontrado muchas nuevas aplicaciones para las rejillas en áreas de instrumentación, control, y recientemente un gran desarrollo de sensores y biosensores basados en rejillas de período largo.

Una fibra de rejilla de periodo largo (FRPL) es una modulación periódica del índice de refracción a lo largo del eje longitudinal de la fibra óptica, provocando cambios del valor del índice de refracción del núcleo y de la cubierta de una fibra óptica, ver figura 2.5. Normalmente, el período de modulación Λ del índice de refracción en un FRPL tiene un período entre 100 y 1000 μm . Los métodos más populares para el grabado de las rejilla de período largo en fibra óptica son las siguientes: fabricación por radiación UV, láser de CO_2 , arco eléctrico y métodos mecánicos.

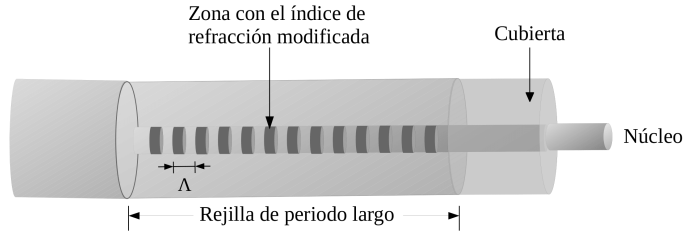


Figura 2.5: Fibra con rejilla de período largo (FRPL).

Cuando cambia el índice de refracción del medio circundante, también se modifica el índice de refracción efectivo de la cubierta, lo que conduce a un desplazamiento o atenuación en la banda central. Por el contrario, las interacciones biomoleculares que tienen lugar alrededor de la superficie de un transductor permanecen confinadas dentro de las capas de espesor finito. Por tanto, un FRPL juega un papel importante en la detección física, química y biológica [20, 21].

Además, la FRPL tiene la capacidad de acoplar los modos ópticos desde el núcleo de la fibra a la cubierta y de producir una o más bandas de atenuación en la transmisión de la fibra [31] centradas en las longitudes de onda λ_m (figura 2.6), descritas por la siguiente ecuación,

$$\lambda_m = [n_{core} - n_{clad}^m] * \Lambda \quad (2.11)$$

donde λ_m es el pico de longitud de onda que está acoplado en los modos de la cubierta, n_{core} y n_{clad}^m son los índices de refracción del núcleo y la cubierta, respectivamente, y Λ es el período de rejilla.

Esta función se puede utilizar para diseñar una FRPL basado en biosensores, ya que este dispositivo es más sensible a los cambios en el índice de refracción externo, que está relacionado con un material de recubrimiento externo.

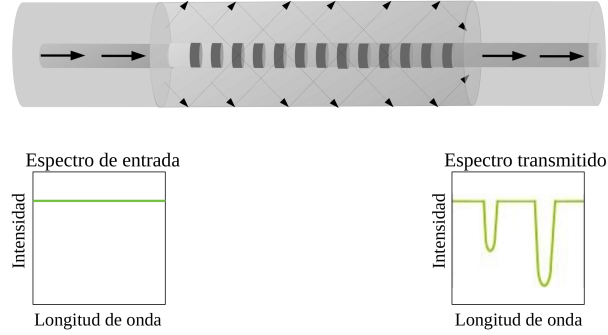


Figura 2.6: Esquema general de los espectros de entrada y salida en una Fibra óptica de periodo largo.

2.4.1. Acoplamiento de modos en fibras con rejillas

El objetivo de cualquier rejilla de fibra óptica es el acoplamiento de modos. Este acoplamiento de modos se presenta cuando existen perturbaciones en la fibra; la magnitud de separación entre los planos o período de la rejilla, determina la longitud de onda de resonancia (λ_m) en el espectro de transmisión. El interés en estructuras de acoplamiento surgió cuando se descubrió que la estructura de estas perturbaciones podía manipularse para acoplar determinados modos o separar determinadas longitudes de onda de una señal óptica.

Actualmente podemos ver una gran variedad de dispositivos ópticos basados en el acoplamiento de modos. En el caso de las FRPLs se desea acoplar el modo guiado fundamental del núcleo de la fibra con los modos de propagación de la cubierta de la fibra con la misma dirección de propagación. Al acoplar estos modos una porción de la luz y de la energía viajando por el núcleo pasará a la cubierta donde se perderá por la absorción y el esparcimiento en la cubierta. El acoplamiento con la rejilla provoca que la energía perdida (acoplada con la cubierta) no sea transmitida.

Para que este acoplamiento ocurra, es necesario que haya un igualamiento de fases entre el modo del núcleo y los modos de la cubierta. Esta condición está dada por

$$\beta_{01} - \beta^m = \Delta\beta^m = \frac{2\pi}{\Lambda}$$

donde β_{01} es la constante de propagación del modo guiado fundamental del núcleo y β^m es la constante de propagación del m-ésimo modo de la cubierta con el que se desea acoplar. Esta condición es comúnmente conocida como condición de Bragg. El subíndice de β_{01} se debe a que el modo fundamental de la fibra óptica en aproximación de guía débil es el modo LP01. El valor de β es dependiente de la longitud de onda ya que de forma general, la constante de propagación β está dada por la siguiente ecuación

$$\beta = n_e k_0$$

donde n_e es el índice de refracción efectivo del modo y $k_0 = 2\pi/\lambda$ es el número de onda en el espacio libre. Esto aunado a que $\Lambda\beta^m$ es un valor discreto resulta en que este tipo de acoplamiento sea algo selectivo. Esto se aprovecha para aplicaciones del biosensado, pues pequeñas variaciones de la concentraciones de Opi5 en el tejido cerebral o gonadas de un modelo murino producirán cambios en

la respuesta espectral de los biosensores basados en FRPL modificando el índice de refracción de la cubierta.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Materiales

Para el desarrollo de los biosensores se utilizó fibra óptica SMF-28 con 10 μm de diámetro del núcleo y 120 μm de diámetro de la cubierta donde se autoensambló el biosensor. Los reactivos químicos utilizados para el desarrollo de los biosensores fueron: Ácido fluorhídrico al 30 %, Hidróxido de Potasio a una concentración de 85 %, 3-aminopropiltrimetoxisilano al 97 %, Tolueno al 99.8 % y Metanol al 99.9 % adquiridos en Sigma-Aldrich Co. Debido a que los compuestos químicos y las reacciones químicas que se llevaron a cabo en este trabajo son altamente peligrosas, ver tabla 3.1, las etapas del autoensamblado del biosensor se llevaron a cabo en una campana química de extracción.

Tabla 3.1: Reactivos químicos utilizados para el desarrollo de los biosensores.

Nombre	Daños
Ácido Fluorhídrico	Puede ocasionar severa irritación al tracto respiratorio o digestivo, con posibles quemaduras. Puede ser fatal si se ingiere o se inhala. Puede causar inflamación , enrojecimiento , dolor y quemaduras , dependiendo de la concentración.
Hidróxido de Potasio	Nocivo en caso de ingestión. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
3-aminopropiltrimetoxisilano	Nocivo en caso de ingestión. Provoca quemaduras graves o reacción alérgica en la piel y lesiones oculares graves .
Tolueno	A niveles mayores de 100 ppm provocan pérdida de coordinación por lo que aumenta la probabilidad de accidentes y a niveles mayores de 500 ppm, los efectos son narcosis , náusea , dolor de cabeza , adormecimiento y confusión mental . Al contacto con la piel causa irritación , resequedad y dermatitis .
Metanol	Su inhalación irrita las mucosas nasales y oculares . Produce asfixia, vértigo, tos, dolor de cabeza, náuseas, vómito, trastornos oculares, convulsiones e inconsciencia. Se absorbe por la piel ocasionando resequedad , enrojecimiento y dolor .

También fueron adquiridos los anticuerpos policlonales receptor kisspeptina y OPN5. Por 100 μl el precio aproximado del receptor de kisspeptina y OPN5 fue de \$15,000 y \$20,000 pesos, respectivamente. Donde los 100 μl se convirtieron en 1 *ml*. En la tabla 3.2 se muestra el costo en cada etapa del autoensamblado de un solo biosensor en FO-Taper y FRPL. Por lo tanto, desarrollar un biosensor costó

menos de \$300 pesos.

Tabla 3.2: Tabla de costos de los reactivos empleados en el armado de los biosensores.

	FO-Taper	FRPL
FO (\$)	1.9	2.1
Preparación de la matriz soporte (\$)	11.1	0
Hidroxilación (\$)	10.97	10.97
Funcionalización (\$)	57.1	57.1
Inmovilización (\$)	150	200
Total (\$)	231.07	270.17

3.2. Fibra con Taper (FO-taper)

Los reactivos químicos empleados para el autoensamblado del biosensor fueron: Ácido Fluorhídrico, Hidróxido de Potasio, 3-aminopropiltrimetoxisilano, Tolueno y Metanol adquiridos en Sigma-Aldrich Co. La metodología del autoensamblado del biosensor basado en fibra óptica SMF-28, se realizó en 52 cm de largo, en donde por la mitad de la fibra se elimina el revestimiento a lo largo de 3 cm, utilizando como elemento de reconocimiento biológico un anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina, el diagrama del autoensamblado se presenta en la figura 3.1.

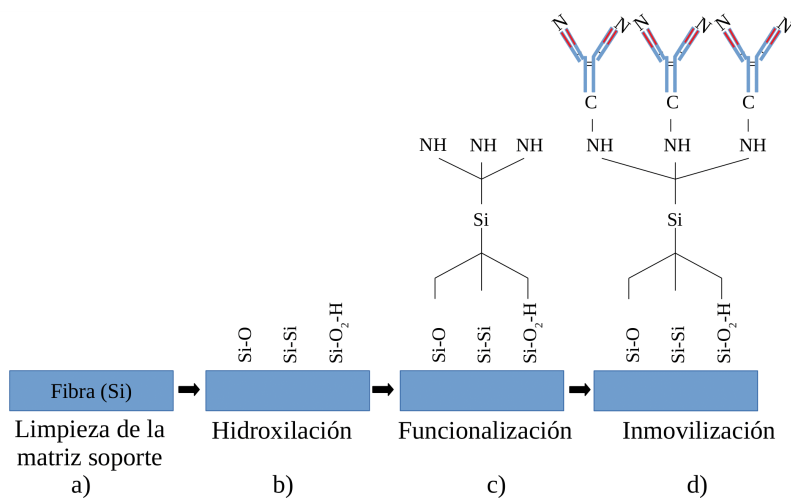


Figura 3.1: Diagrama del autoensamblado, biosensor de FO-taper en cada etapa.

3.3. Fibra en FRPL

Los reactivos químicos empleados para el autoensamblado del biosensor fueron: Hidróxido de Potasio, 3-aminopropiltrimetoxisilano, Tolueno y Metanol. La metodología del autoensamblado del biosensor basado en fibra óptica monomodo SMF-28, se realizó en tramos de fibra óptica de 60 cm de largo, en donde por la mitad de la fibra se eliminó 1.5 cm del revestimiento. Posteriormente, se realizó el grabado de la FRPL mediante la técnica punto a punto con la ayuda de una máquina de empalme por fusión, utilizando el método de arco eléctrico. La fibra fue expuesta a descargas del arco eléctrico emitido por los electrodos de la empalmadora (S-176, FITEL). Para crear todos los puntos en la fibra se utilizó un

actuador lineal (TLA28A, ZABER) que tiene una precisión de $0.1 \mu m$. El actuador permitía mover la fibra para aplicar los arcos eléctricos a determinadas distancias, según el período de la rejilla deseado. Se requirió un número menor de puntos para producir la rejilla debido a que en los procesos de hidroxilación y funcionalización la fibra se rompía fácilmente. Las FRPL se construyeron con 20 puntos, debido a que fue más fácil el traslado. El período de modulación fue de $\Lambda=500 \mu m$, debido a la experiencia previa del laboratorio, por lo tanto la longitud del FRPL fue de 1 cm.

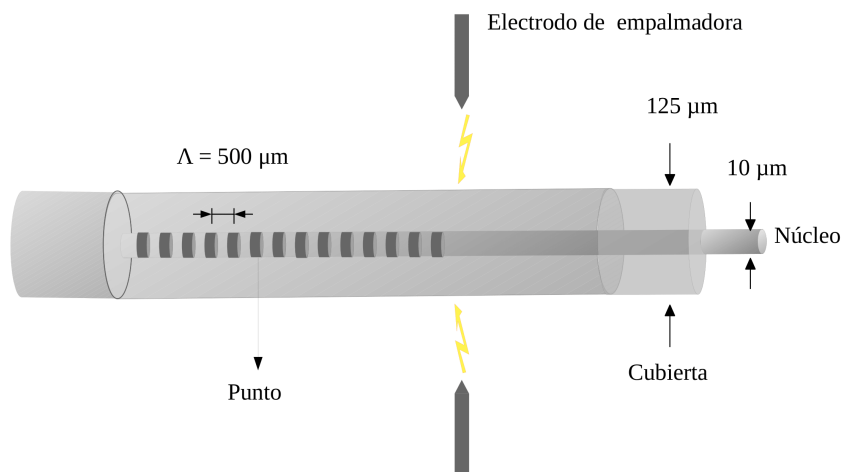


Figura 3.2: Grabado de la FRPL utilizando el método de arco eléctrico.

Una vez realizado esto, la fibra pasó a un proceso de hidroxilación, funcionalización y posteriormente a un proceso de inmovilización del anticuerpo policlonal (OPN5) que actuó como ERB y finalmente la detección de la opsin Opn5, esta secuencia se presenta en la figura 3.3.

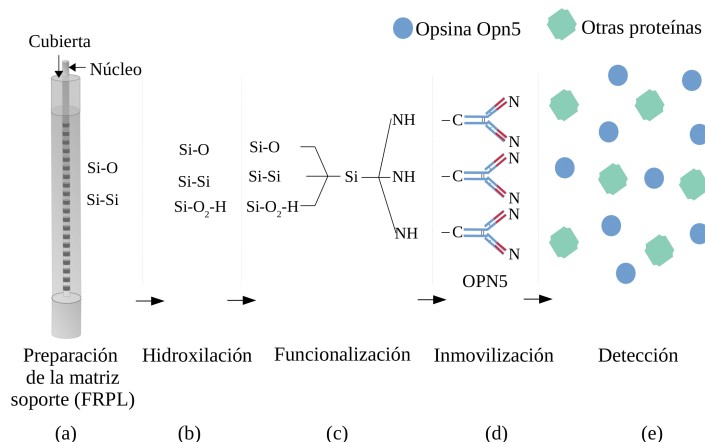


Figura 3.3: Diagrama del autoensamblado, biosensor de FRPL en cada etapa.

3.4. Sistema de Transducción

3.4.1. Limpieza de la matriz soporte

Para la limpieza de la matriz soporte se realizó con HF, añadiendo $4.5 ml$ de HF y $10.5 ml$ de agua desionizada (dH₂O). Con esta concentración de HF nos permitió tener un control en la homogeneidad

en la superficie de la fibra, es decir la fibra fue adelgazada uniformemente, ver figura 3.1 (a). Se realizó una caracterización del tiempo de interacción de la fibra con el HF, para determinar los diámetros de adelgazamiento de la fibra. La Figura 3.4 muestra la respuesta del adelgazamiento en función del tiempo en donde podemos observar que alrededor de las 6 horas se tiene una reducción del 73 % en el diámetro del revestimiento. Cabe mencionar que los diámetros de la fibra se midieron por medio de un microscopio óptico con una magnificación de 50X [ver apéndice A]. A partir de estos resultados decidimos ensamblar el biosensor a un diámetro de $55\mu\text{m}$, es decir después de cuatro horas y cuarenta minutos de inmersión de la fibra en HF.

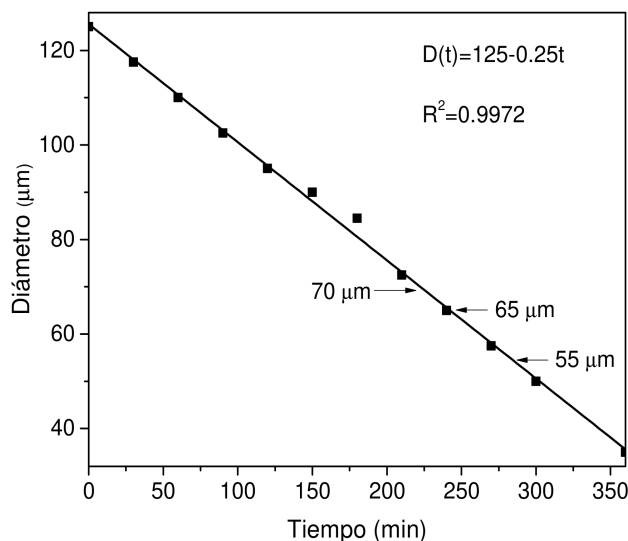


Figura 3.4: Tiempo de respuesta del adelgazamiento de la fibra óptica, usando HF al 30%.

3.4.2. Hidroxilación

Para la hidroxilación de la superficie de la fibra óptica se usó hidróxido de potasio (KOH), el cual eliminará metales y contaminación orgánica, agregando grupos OH en la superficie de la fibra óptica. La solución se generó disolviendo 841 mg de KOH en 7.5 ml de agua desionizada y añadiendo 7.5 ml de metanol.

La solución interactuó con la fibra óptica por un período de tres horas y media. Posteriormente la fibra óptica se enjuagó en metanol por 10 min, para eliminar cualquier residuo de la solución en la superficie, para finalmente secar con nitrógeno durante un minuto, ver figuras 3.1 (b) y 3.3 (b).

3.4.3. Funcionalización

Para la funcionalización se colocó en la superficie 3-Aminopropiltrimetoxisilano (3-AMPTS) al 2 % en tolueno. Utilizando una parrilla se calentó 29.4 ml de tolueno en un vaso de precipitado Kimax hasta los $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al llegar a esa temperatura se le agregaron $600\ \mu\text{l}$ de 3-AMPTS y se retiró de la parrilla. Al bajar la temperatura a los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añadió la solución a una caja coplin de vidrio, donde previamente se colocó la fibra hidroxilada y se dejó actuar durante 1 hora. Al término del tiempo se retiró la fibra óptica de la caja y se enjuagó con abundante tolueno para retirar los residuos que impidan la inmovilización del anticuerpo [ver figuras 3.1 (c) y 3.3 (c)].

3.4.4. Inmovilización

3.4.5. Receptor de kisspeptina

El anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina se utilizó como ERB, que nos permite detectar con una alta especificidad la proteína kisspeptina en los tejidos cerebrales. El anticuerpo se colocó en un buffer de fosfatos (PBS por sus siglas en ingles), cuya función es mantener su pH y presión osmótica lo más parecido al ambiente biológico natural; por lo tanto, ayuda a conservar el anticuerpo. Utilizando una caja de Petri de plástico, se colocaron $10 \mu\text{l}$ de la solución con el anticuerpo del receptor de kisspeptina y $190 \mu\text{l}$ de PBS y se sumergió la FO-taper funcionalizada.

La placa de petri se colocó en un agitador orbital a una frecuencia de 1.66 Hz para asegurar que el autoensamblaje del anticuerpo fuera uniforme en la superficie evitando la precipitación del anticuerpo; esto se dejó interactuar durante 40 minutos. Una vez que se han ocupado todos los sitios activos, donde el anticuerpo se puede anclar o unir a través de enlaces C-H, quedará libre el grupo amino terminal (-NH₂) del anticuerpo para detectar la proteína de interés [ver figura 3.1 (d)].

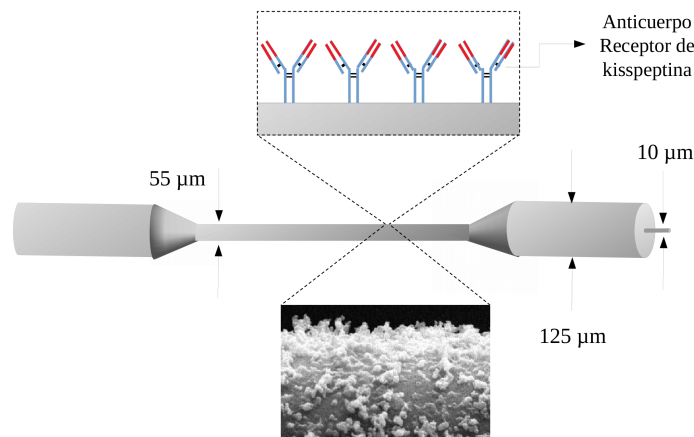


Figura 3.5: Anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina autoensamblado en la superficie de FO-taper.

3.4.6. OPN5

Se utilizó el anticuerpo policlonal (OPN5) como elemento de reconocimiento biológico para determinar la opsina Opn5. El anticuerpo se encuentra en PBS cuya función es mantener su pH y presión osmótica lo más parecido al ambiente biológico natural, por lo tanto ayuda a conservar el anticuerpo. Utilizando una caja de petri de plástico se colocaron $10 \mu\text{l}$ de OPN5 y $190 \mu\text{l}$ de PBS, encima de una fibra óptica funcionalizada. La caja de petri se colocó en un agitador orbital a una frecuencia de 1.66 Hz, para asegurar que el autoensamblado del anticuerpo sea uniforme en la superficie evitando la precipitación del anticuerpo y se dejó actuar entre 60 y 90 minutos, hasta que se dejaban de observar cambios en la señal de transmitancia se detenía la inmovilización, ver figuras 3.3 (d) y 3.6. El tiempo de inmovilización varió dependiendo del tiempo de evaporación.

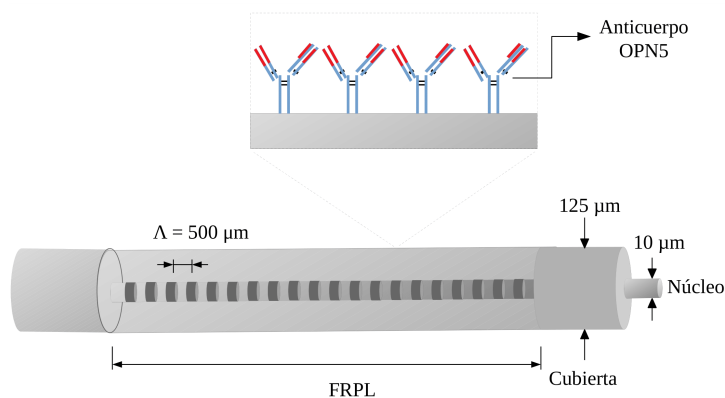


Figura 3.6: Anticuerpo OPN5 autoensamblado en la superficie de la FRPL.

3.5. Material Biológico

Se utilizó el cerebro y gónadas de rata adulto Wistar, del bioterio Claude Bernard de la BUAP, por medio del Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Ciencias Químicas. Los cortes se realizaron en el Centro de Investigación en Reproducción animal del CINVESTAV-UATx, los cuales se realizaron en un criostato marca Leica modelo CM1860, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a un grosor de 70 micrómetros, los tejidos se lavaron con solución salina al 0.9% de PBS y después fijados con formaldehído al 10% y la crio protección del tejido para el corte fue por inmersión en solución de sacarosa al 30% por 72 horas.

3.6. Detección

Una vez realizado la inmovilización del anticuerpo policlonal enseguida se realizó la detección de kisspeptina y Opsina Opn5.

3.6.1. kisspeptina

Después del proceso de inmovilización del anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina en la FO-taper, es decir después del desarrollo del biosensor se colocó un tejido de cerebro de rata en una caja de petri y el biosensor se colocó sobre el tejido cerebral en la región del hipotálamo. Medimos los espectros de transmisión a los 5, 10 y 15 min. Después de eso, el biosensor se cubrió con otro tejido cerebral de rata, y las señales de transmisión se midieron durante 15 minutos.

3.6.2. Opsina Opn5

Para la detección de la opsina en cerebro y gónadas se colocó el primer corte de tejido por debajo de la fibra y se dejó actuar por media hora, ver figura 3.7 (a). Al finalizar el tiempo se colocó un segundo corte de tejido por encima de la fibra, ver figura 3.7 (b). Y se dejó actuar entre 40 y 80 minutos, hasta que se dejaban de observar cambios en la señal de transmitancia se detenía la detección. La fibra se colocó en la región del hipotálamo y en la parte central del corte de ovario y testículo, debido que en esta región se encuentra expresada la opsina Opn5 [ver figura 3.3 (e)].

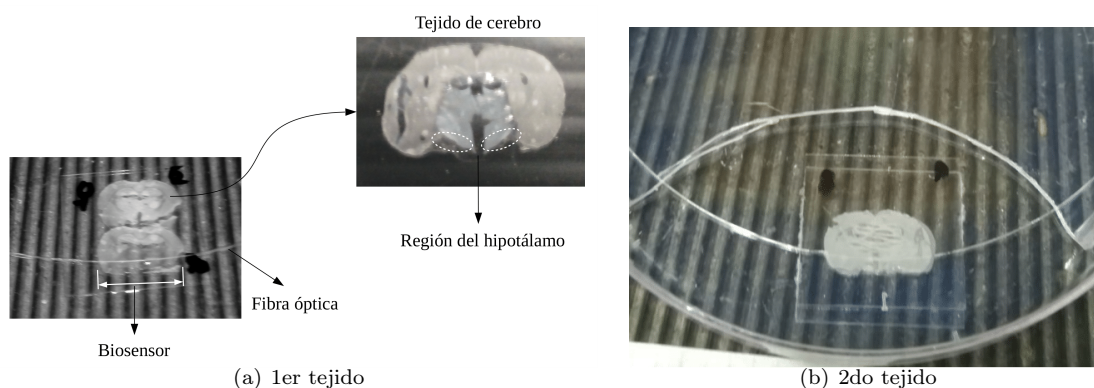


Figura 3.7: Imagen de la interacción del tejido cerebral con el biosensor en FO-taper y FRPL.

3.7. Microscopía óptica

Un microscopio óptico marca Olympus Modelo PME3 con un objetivo de 50X permitió ver la morfología de la superficie en cada etapa del autoensamblado del biosensor mediante el Software StCamSWare.

3.8. Microscopía electrónica de barrido

También se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6610LV en alto vacío con un voltaje acelerador de 20 kV , para obtener imágenes con alta resolución de la morfología de la superficie del autoensamblado en cada etapa. Las muestras fueron rociadas con oro sobre la superficie de la fibra óptica, antes de la caracterización de SEM.

3.9. Espectroscopia de infrarrojo

La caracterización espectroscopica se realizó mediante un equipo de espectroscopia vibracional de infrarrojo por transformada de Fourier marca Bruker Vertex 70 en la región del mediano infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} . Se realizaron 60 muestreos para la línea base y 120 muestreos para cada una de las muestras, en el modo de medición de reflectancia total atenuada ATR con un cristal Diamante- $SeZn$ de una sola reflexión; se utilizó como línea base el cristal de ATR, y se usó bromuro de potasio (KBr) para asegurar el contacto de la fibra óptica con el cristal de ATR.

3.10. Transmisión

Se empalmó la fibra óptica donde se ensambló el biosensor a un diodo superluminiscente (SLD) a 200 mA, con una longitud de onda central de 1565 nm y un ancho de banda de aproximadamente 50 nm y el otro lado se empalmó a un analizador de espectro óptico AQ6317B en la región infrarrojo (1460-1700 nm), ver figura 3.8, el cual permitió observar los cambios en las variaciones de amplitud y corrimientos en longitud de onda durante la transmisión en la fibra óptica, para cada etapa del autoensamblado del biosensor y cuando el biosensor interactúa con los diferentes cortes de tejido.

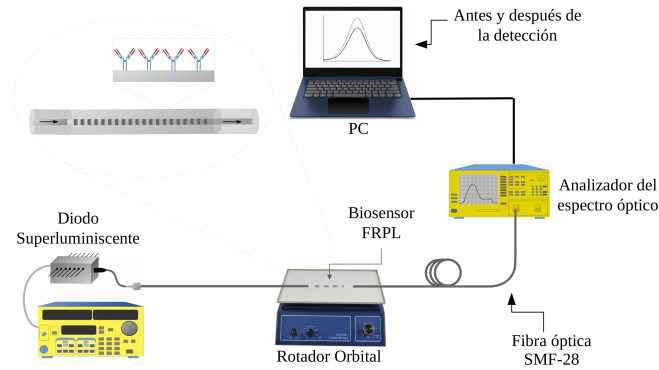


Figura 3.8: Arreglo experimental implementado para la caracterización del biosensor.

3.11. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales en inglés *Principal Components Analysis (PCA)*, permite transformar un conjunto de variables originales a un nuevo conjunto de variables denominadas *componentes principales* es decir, permite visualizar un conjunto de datos que comprende de p variables en un espacio de dimensión $k(k < p)$, al reducir el número de variables permite visualizar relaciones entre las variables y facilita la interpretación de los datos [32], [33].

El método de componentes principales es considerado un método de reducción de dimensionalidad, esto permite reducir la dimensión del número de variables originales que se han considerado en el análisis, sin perder la mayoría de la información, donde las nuevas variables son combinaciones linealmente independientes de las variables originales.

Se utiliza la varianza en una componente como medida de la cantidad de información, debido a que cuanto mayor sea la variabilidad de los datos se considera que existe mayor información.

3.11.1. Deducción de las componentes principales

Consideramos un conjunto de variables (x_1, x_2, \dots, x_p) , cada variable es un vector columna de n componentes (muestras), es decir $x_i = (x_{1i}, x_{2i}, \dots, x_{ni})$, donde x_{ij} son los datos u observaciones. En forma matricial lo podemos representar de la siguiente manera:

$$\mathbb{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2p} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{np} \end{bmatrix}$$

La matriz \mathbb{X} constituye el 100 % de la información. Al aplicar este análisis se asume que los datos tienen una distribución gaussiana o normal, donde su media (μ) es igual a 0 y su varianza (σ^2) igual a 1, por lo tanto a cada variable se le resta su media, de manera que las variables de la matriz \mathbb{X} tienen media cero.

Enseguida calculamos la matriz de varianzas y covarianzas, que nos da la variabilidad de los datos y la información relativa a las relaciones lineales entre las variables. Esta matriz es cuadrada y simétrica de orden p donde los terminos diagonales son las varianzas y los no diagonales son las covarianzas entre las variables, la matriz de varianzas y covarianzas es dada como:

$$\mathbb{S} = \begin{bmatrix} s_1^2 & s_{12}^2 & \dots & s_{1p}^2 \\ s_{21}^2 & s_{22}^2 & \dots & s_{2p}^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ s_{p1}^2 & s_{p2}^2 & \dots & s_p^2 \end{bmatrix} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})'$$

Posteriormente calculamos los valores y vectores propios de la matriz de varianzas y covarianzas, donde el valor propio es una medida de la varianza de los datos. Es decir, se busca un vector \mathbf{v} y un escalar λ tal que:

$$\mathbb{S}\mathbf{v} = \lambda\mathbf{v} \quad (3.1)$$

si se cumple que $\mathbf{v} \neq 0$ y λ satisface (3.1), entonces λ se denomina un *valor propio* de \mathbb{S} y \mathbf{v} un vector propio de \mathbb{S} correspondiente al valor propio λ , [34]. El procedimiento para calcular los valores y vectores propios es el siguiente:

1. Se encuentra el polinomio característico de \mathbb{S} ; $p(\lambda) = \det(\mathbb{S} - \lambda I)$.
2. Se encuentran las raíces $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$ de $p(\lambda) = 0$.
3. Se resuelve el sistema homogéneo $(\mathbb{S} - \lambda_i I)\mathbf{v} = 0$

El número de valores y vectores obtenidos será igual a p , el número de variables originales. Para reducir la dimensión del número de variables originales, primero ordenamos en forma descendente los valores propios; $\lambda_{max}, \dots, \lambda_{min}$, donde los valores altos aportan la mayor parte de la información y los más bajos son los que menos información aportan. Una vez ordenados los valores propios es posible decidir cuál es el menor número de componentes principales (vectores propios) con el que podemos expresar la información contenida en las variables originales esto a través del *gráfico de sedimentación* y la *varianza explicada*. Estos últimos ofrecen los valores propios ordenados de mayor a menor. El gráfico de sedimentación permite determinar el número óptimo de componentes principales debido a que hace una representación gráfica del tamaño de los valores propios. Y la varianza explicada representa el porcentaje de varianza de cada valor propio, la cual se define en terminos de porcentaje de la siguiente manera:

$$\left(\frac{\lambda_i}{\lambda_{total}} * 100 \right) \%, \quad \text{donde } \lambda_{total} = \sum_{i=1}^p \lambda_i$$

este valor permite conocer el porcentaje que corresponde a cada componente principal. La suma de la varianza explicada de todas las componentes principales corresponde al 100% de la varianza total, conocida como la varianza explica acumulada.

Se realizó PCA a los datos obtenidos en los espectros de transmisión mostrados en los capítulos 4.4 y 5.3.2, utilizando el programa IBM SPSS Statistics Visor, versión 22. La desventaja de utilizar este programa es que se tardaba o se bloqueaba debido al número de variables que se procesaban. Por ese motivo se realizó en `python` el programa mostrado en el apéndice B, para realizar el PCA a los datos obtenidos en los espectros de transmisión en un tiempo mucho mas corto. Este programa permitió realizar PCA a los espectros de transmisión mostrados en el capítulo 5.3.1.

El programa es una versión inicial, y sirve para un conjunto de datos en particular. En este programa se realizó una función la cual solicita la dirección de los archivos que se les implementará el PCA y la longitud de onda inicial y final que se desea analizar. Como ejemplo se utilizaron los datos del biosensor 7, figura 5.4 (c) capítulo 5.3.2 en la longitud de onda de 1525 a 1575 nm.

En el apéndice C, la figura C.1 muestra las gráficas al compilar el programa. En la figura C.1(a) se gráfica la componente principal con su respectivo valor propio, ordenados desde el más grande al mas pequeño llamado gráfico de sedimentación. La gráfica C.1(b) muestra la varianza explicada, en donde la primera componente corresponde al 99.884% de la varianza, la segunda componente corresponde al 0.095%, la tercera corresponde al 0.02% y la cuarta componente es cercana a cero. Se obtienen los mismos porcentajes de correspondencia de varianza que el programa IBM SPSS Statistics Visor proporcionó en su análisis, ver tabla D.1. En C.1(c) se grafican los vectores propios correspondientes a la primera componente principal (PC1) versus la segunda componente principal (PC2) y en C.1(d) se grafican los vectores propios correspondiente a PC2 versus PC3. Y finalmente en C.1(e) se grafican los vectores propios correspondientes a PC1 versus PC2 versus PC3.

Capítulo 4

Biosensores en Fibra con Taper

4.1. Microscopia óptica

La caracterización morfológica en cada etapa se realizó mediante microscopia óptica y microscopia y electrónica de barrido (SEM). Con estas técnicas, es posible observar en cada proceso del autoensamblado la homogeneidad estructural en su superficie. Primero en la Figura 4.1, se observa la fibra óptica adelgazada con un diámetro de $55\ \mu\text{m}$, al hidroxilar la superficie se redujo a $50\ \mu\text{m}$ su diámetro, ver Figura 4.1 b), la fibra se adelgaza debido a que el KOH remueve los enlaces Silicio (Si) de la superficie de la fibra óptica posteriormente al funcionalizar el diámetro aumentó $5\ \mu\text{m}$, ver Figura 4.1 c), el diámetro aumenta debido a la inmovilización del 3-AMPTS en la fibra óptica y finalmente al inmovilizar el anticuerpo el diámetro final fue de $55\ \mu\text{m}$, ver Figura 4.1 d) y e) interacción a una hora y dos horas, respectivamente, donde se puede observar que el diámetro es el mismo debido a que fueron ocupados todos los enlaces disponibles del 3-AMPTS.

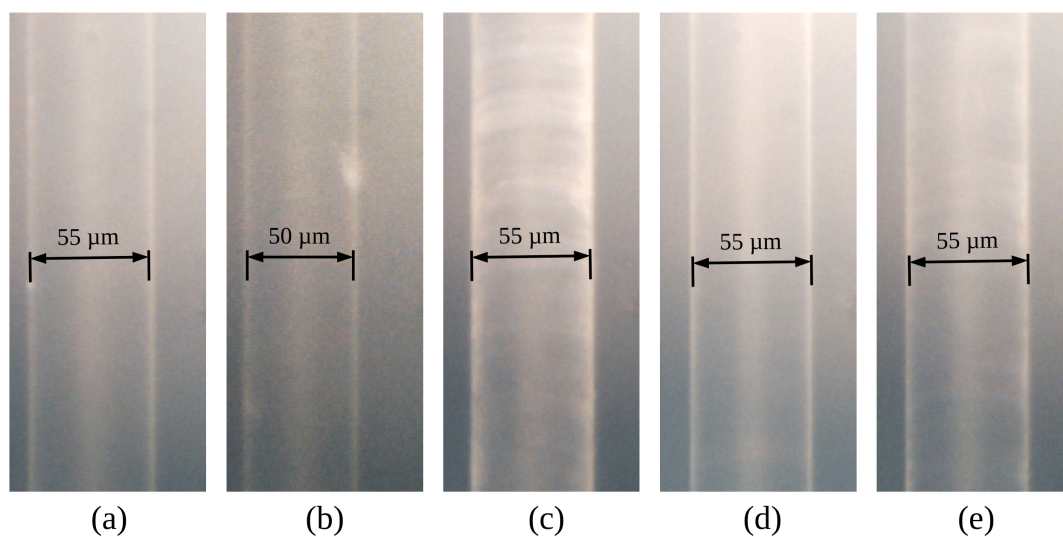
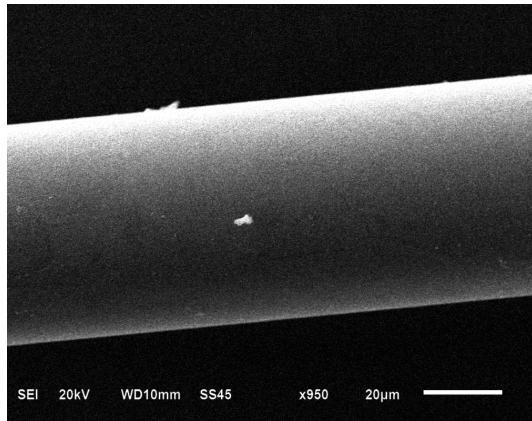
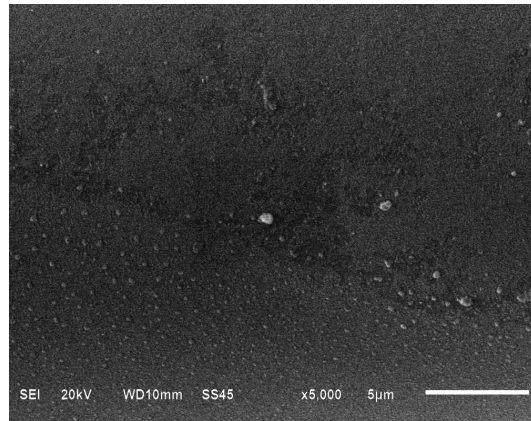


Figura 4.1: Imágenes ópticas obtenidas en la a) FO-taper, b) Hidroxilación, c) Funcionalización, d) Inmovilización y e) detección del analito.

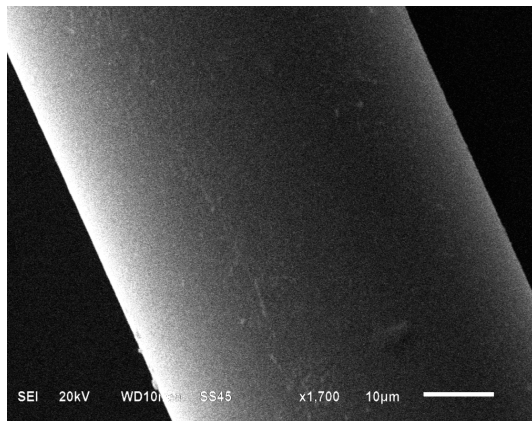
4.2. Microscopia electrónica de barrido



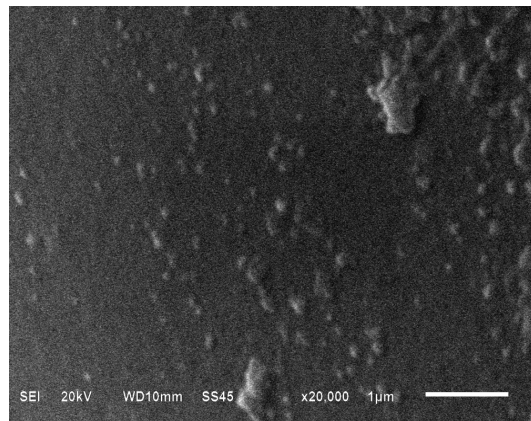
(a)



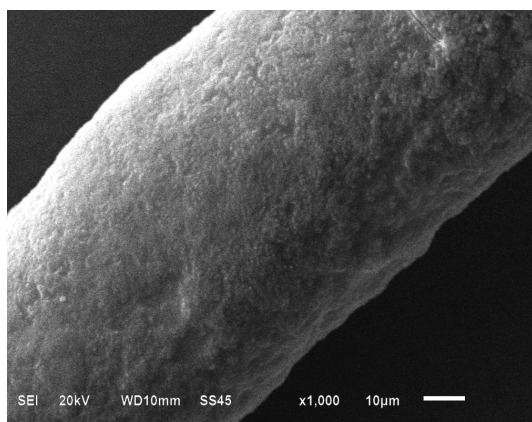
(b)



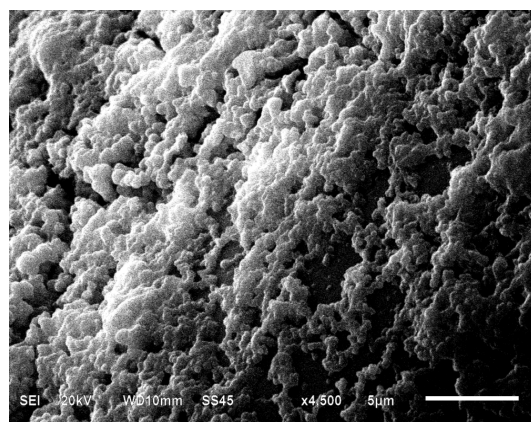
(c)



(d)



(e)



(f)

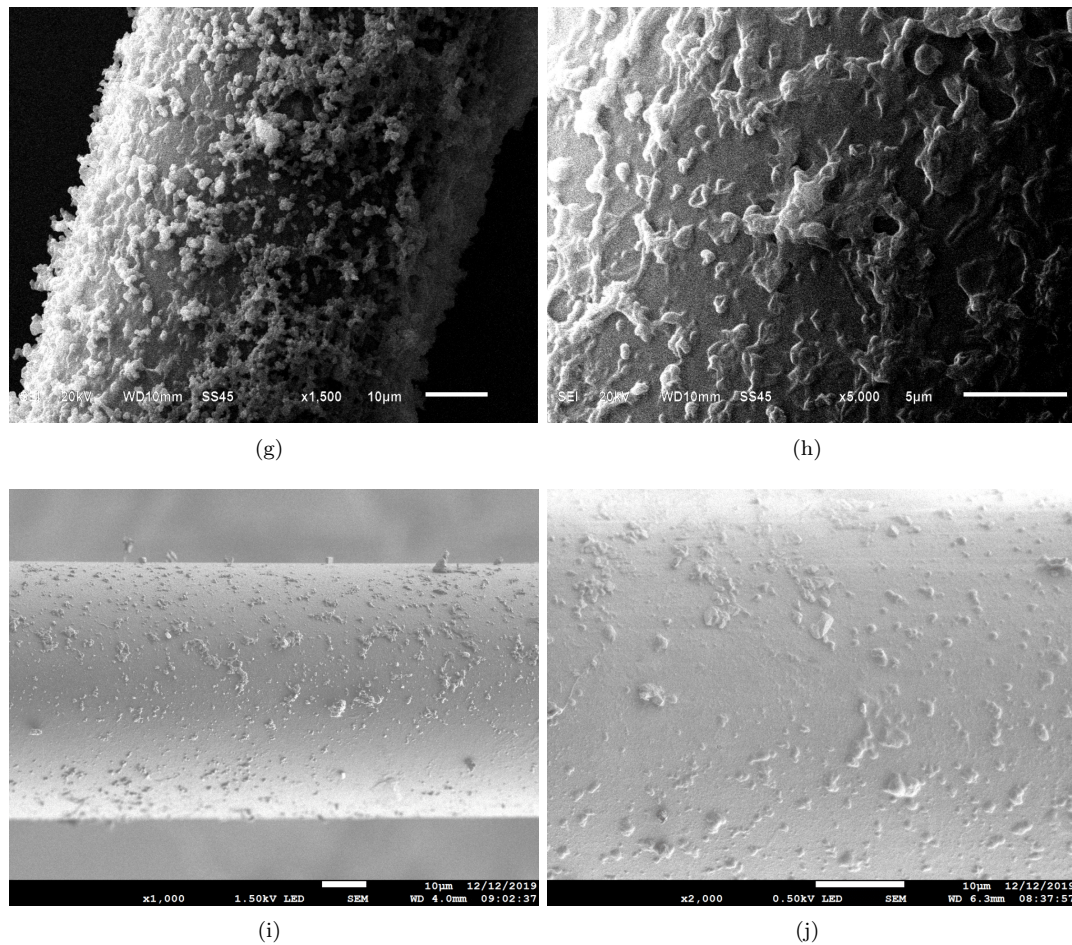


Figura 4.2: Micrografías SEM de la superficie del biosensor: (a) y (b) FO-taper; (c) y (d) hidroxilación; (e) y (f) funcionalización; (g) y (h) inmovilización; (i) y (j) detección del anticuerpo.

Por otra parte en la técnica SEM se puede observar la homogeneidad en la superficie en cada una de las etapas del autoensamblado del biosensor. En la figura 4.2 (a) se observa en la micrografía el proceso de adelgazamiento con el HF, con una resolución de $20 \mu m$, en la cual se puede observar una superficie homogénea y un diámetro de $55 \mu m$, de la fibra, para corroborar esto se realizó un acercamiento de esta superficie a una resolución de $5 \mu m$ en donde podemos ver esta homogeneidad, Fig 4.2 (b).

En la figura 4.2 (c) se observa la superficie homogénea de la fibra hidroxilada, esta micrografía fue tomada con una resolución de $10 \mu m$, mientras que en la figura 4.2 (d) es un acercamiento de esta misma superficie pero a una resolución a $1 \mu m$ y con esta imagen corroboramos una vez más la homogeneidad de la superficie del biosensor. En la figura 4.2 (e) se muestra la micrografía para la fibra óptica funcionalizada con una resolución de $10 \mu m$ en la cual podemos ver que también existe una homogeneidad en su superficie teniendo un diámetro de $55 \mu m$ que corresponde con los datos obtenidos con el método de microscopía óptica anteriormente mencionados, de igual manera en la figura (f) se obtuvo otro acercamiento de la misma superficie donde se puede ver la homogeneidad del 3-AMPTS autoensamblado. Y Finalmente en la figura 4.2 (g) se muestra la micrografía de la inmovilización del anticuerpo en la fibra óptica y también se obtuvo otro acercamiento figura (h) donde se puede corroborar la homogeneidad de la superficie.

4.3. Espectroscopia de infrarrojo

En la figura 4.3 se muestran los espectros infrarrojos obtenidos en cada etapa del autoensamblado del biosensor: FO-taper (gris), hidroxilación (naranja), funcionalización (negro), anticuerpo (cafe), inmovilización (azul) y la detección de kisspeptina (roja). Para la caracterización de las etapas del autoensamblado se analizaron los espectros de infrarrojo en el rango de los 800 a los 1700 cm^{-1} , ya que es la región donde nos interesa ver las variaciones espectrales.

En la figura, la línea gris corresponde al espectro de la FO-taper, en donde se observan los enlaces Si-O₂-Si presentes en el silicio, estos cambios espectrales se observan en la región comprendida entre los 950 a 1200 cm^{-1} . Por otro lado, la línea naranja muestra el espectro de la fibra hidroxilada, donde también se pueden observar cambios espectrales entre 1500 y 1700 cm^{-1} , que se atribuye a la absorción de los enlaces -OH. Posteriormente, la línea negra muestra el espectro obtenido al funcionalizar, aquí se encontraron cambios espectrales en las bandas asociadas a los enlaces NH y NH-R propios del 3 APTMS entre los 1500 y 1700 cm^{-1} . Luego, la línea café muestra el espectro del receptor de kisspeptina, el cual mostró bandas en 1070, 1540 y 1630 cm^{-1} . Esta información fue necesaria para saber a que longitudes de onda se esperaban ver cambios en el proceso de la inmovilización del anticuerpo. Y finalmente, el último espectro (línea roja) muestra el anticuerpo inmovilizado sobre la superficie de la FO-taper interactuando con la kisspeptina presente en el tejido cerebral; esto significa detección de la kisspeptina. Donde se observó la presencia de la banda asociada al enlace C-H del anticuerpo, así como variaciones espectrales en la región de los enlaces N-H al rededor del pico a 1640 cm^{-1} .

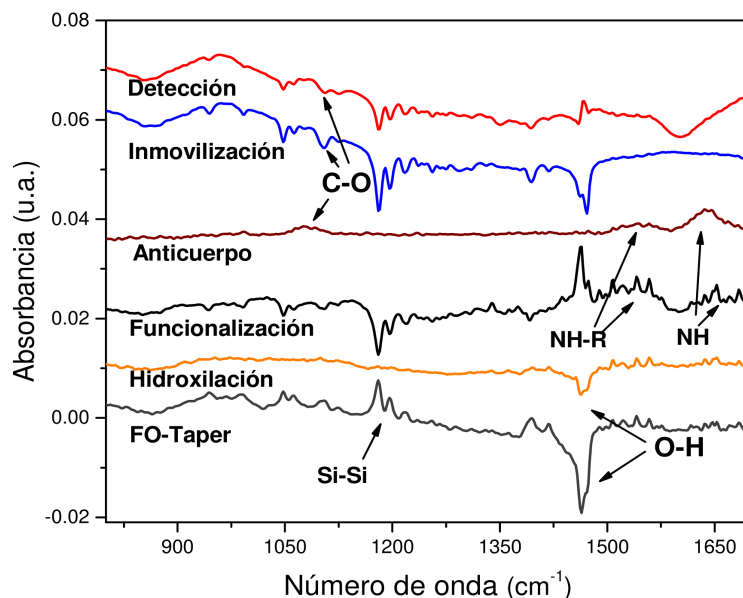


Figura 4.3: Espectros de infrarrojo de las diferentes etapas de autoensamblado, FO-taper (gris oscuro), hidroxilación (naranja), funcionalización (negro), anticuerpo receptor de kisspeptina (cafe), inmovilización del receptor de kisspeptina (azul) y la detección de la kisspeptina (rojo).

4.4. Transmisión

Los espectros de transmisión se midieron cada 5 minutos hasta que no se observaron más cambios en la señal transmitida. Este proceso se siguió 2 veces [denominado Biosensor 1 (B1) y Biosensor 2 (B2)]. Una vez que se desarrollaron los biosensores, colocamos un tejido de cerebro de rata en una placa de Petri y el biosensor se colocó sobre el tejido.

Para asegurar la detección de la proteína kisspeptina, los espectros de salida se obtuvieron en cada etapa del autoensamblaje del biosensor de FO-taper, se utilizaron los controles que se muestran en la tabla 4.1:

Tabla 4.1: Descripción de los controles.

Detección		Descripción
FO	Control I	Fibra óptica sin ERB
FO con tejido	Control II	Fibra óptica sin ERB e interactuando con tejido cerebral
Biosensor OF-taper con otra proteína	Control III	Biosensor que interactúa con albúmina sérica bovina (BSA)

La figura 4.4 muestra las señales de los espectros de salida medidos en cada etapa del autoensamblado del biosensor, junto con sus controles. Para observar los detalles de los espectros, se muestra un rango de 1550 a 1580 nm, aunque los espectros completos se midieron en el rango de 1530 a 1600 nm, como se muestra en el recuadro de la figura. Las variaciones de amplitud y los cambios espectrales en transmisión se pueden interpretar como el cambio del índice de refracción debido a los enlaces covalentes que están presentes en cada etapa.

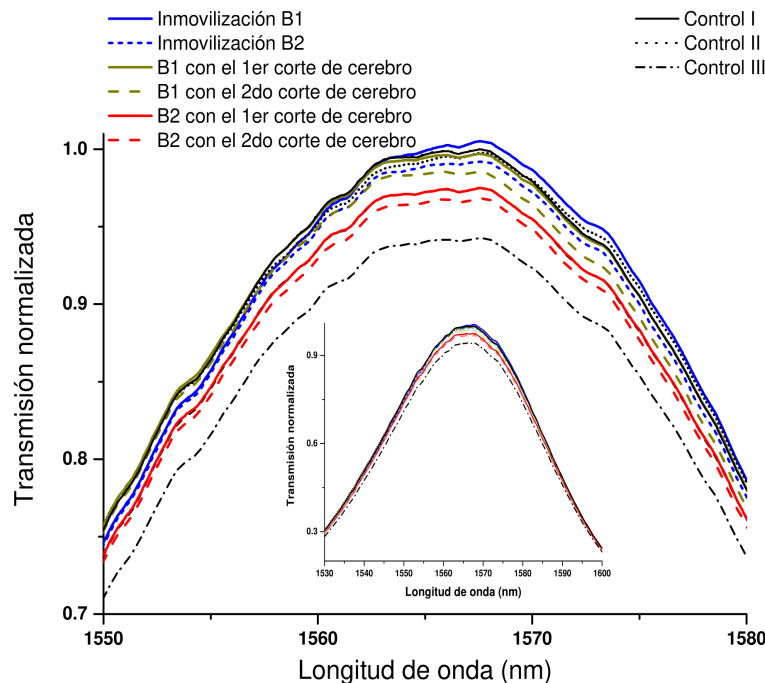


Figura 4.4: Espectros de transmisión medidos en cada etapa del autoensamblado del biosensor y controles.

Sin embargo, de la figura 4.4, no es posible observar más detalles. Por lo tanto, los datos fueron

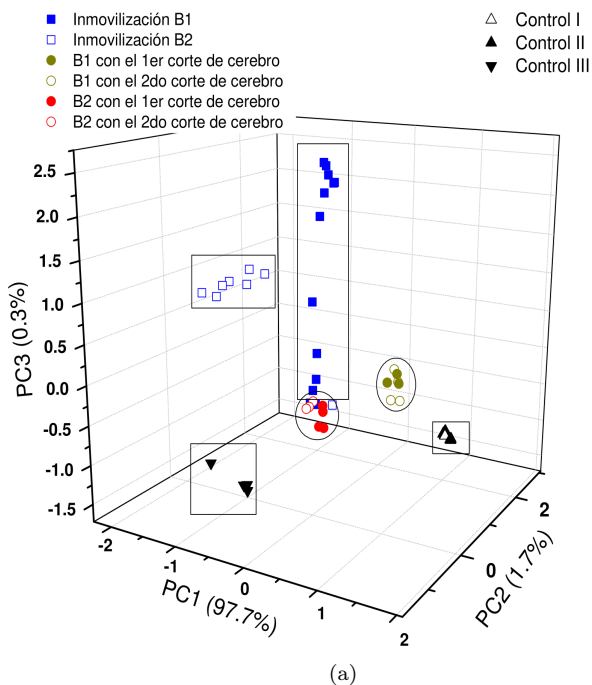
procesados por el método de análisis de componentes principales (PCA), que pueden revelar más detalles de las variaciones del espectro.

4.5. Análisis de componentes principales de los resultados experimentales de transmisión

Para confirmar la detección del biosensor, los espectros de transmisión fueron procesados por PCA en la región entre 1535 y 1595 nm. En la Fig. 4.5, se muestra un gráfico de los primeros tres componentes principales. El PC1 contiene el 97,7% de la varianza total, lo que indica la alta correlación de los datos. Además, PC2 y PC3 contienen 1,7% y 0,3% de la varianza, respectivamente. Ese parece ser un porcentaje de información bajo; sin embargo, es evidente que todavía contienen información significativa.

En la figura, los círculos verdes y rojos son los dos biosensores que detectan la kisspeptina, mientras que los cuadrados representan el proceso de inmovilización del anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina y los triángulos son controles.

En esta figura 4.5 (a), es posible observar cómo los Controles I y II (triángulos blancos y negros) se agrupan en la parte inferior derecha de la gráfica (valores positivos de PC1 y PC2). Mientras el Control III (triángulos invertidos) se agrupa en la parte frontal de la gráfica (valores negativos de PC1 y PC2), separados de los otros procesos de inmovilización. Finalmente, las respuestas de los biosensores al interactuar con kisspeptina (círculos rojos y verdes) se ubican en el medio del gráfico (valores negativos de PC1 y valores positivos de PC2). La Figura 4.5 (b) muestra solo biosensores B1 y B2 (círculos verdes o rojos) en todas las cinéticas de interacción y los controles I, II y III (triángulos blancos, negros e invertidos). En esta figura es más destacable la agrupación de los datos, dependiendo del tipo de señal adquirida, ya sea detección del biosensor o de los controles.



4.5. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE TRANSMISIÓN

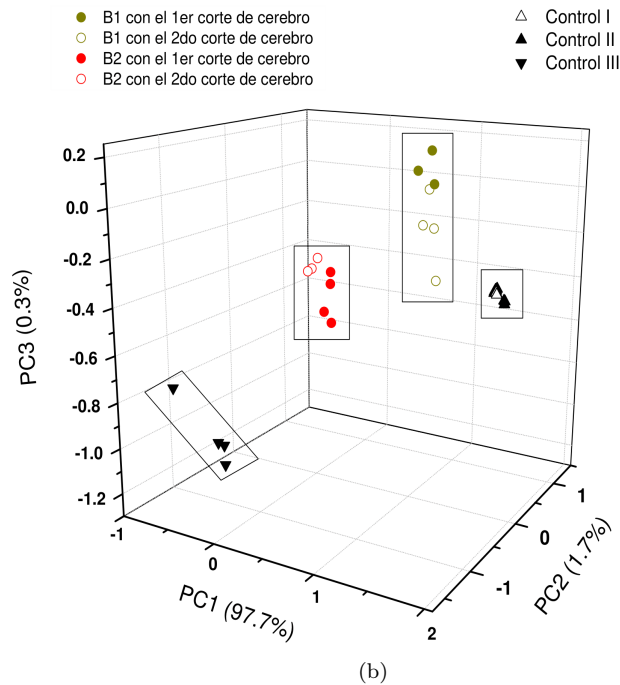


Figura 4.5: Gráfica de PCA de los espectros de transmisión medidos en las diferentes etapas de los biosensores B1 y B2 comparados con BSA y controles.

De la figura anterior, es posible observar que a través de los métodos quimiométricos (análisis numéricos de los resultados experimentales), la discriminación entre el biosensor generado, las interacciones con tejido y los controles es fácilmente observable, debido a la agrupación de la nube de puntos observada en los gráficos de PCA.

En la Figura 4.6 se muestra la evolución temporal de la transmisión, que está relacionada con la interacción de los biosensores cuando fueron expuestos a los tejidos cerebrales. Los espectros de transmisión fueron procesados por el método de PCA para eliminar el efecto de longitud de onda y tener un comportamiento más estable. En el espacio del PCA, cada punto contiene la información de un espectro completo y, por esta razón, dicho punto no depende de la longitud de onda.

La curva de la figura 4.6 se obtuvo normalizando los valores de amplitud de los valores del primer componente principal (PC1), ya que contiene la mayor cantidad de información (97.7% de la varianza total de los datos). PC2 y PC3 contenían 1.7% y 0.3% de la varianza total, respectivamente, y su información no contribuyó significativamente a explicar el comportamiento del sensor. Para el caso del Biosensor 1, se puede observar de figura 4.6 un ligero incremento de transmisión al interactuar con el 1er corte de cerebro; sin embargo, la transmisión presenta una fuerte disminución cuando el biosensor interactúa con el 2do corte de cerebro. Pensamos que en este caso, que es posible que el 2do corte de tejido contenga una mayor cantidad de kisspeptina. También podemos observar una saturación después de alrededor de 20 min, y la respuesta se mantuvo casi constante después de 40 min.

Por otro lado, el Biosensor 2 presenta una disminución al interactuar con el 1er corte de cerebro, y se observó una disminución adicional con la interacción con el tejido 2do corte de cerebro, alcanzando la saturación en 20 min. En este caso, ambos tejidos interactuando con el 1er corte de cerebro, contenían casi la misma cantidad de kisspeptina, ya que las disminuciones del 1er y 2do corte de cerebro son bastante similares. Con esta figura mostramos que, efectivamente, se está produciendo la interacción entre el receptor de kisspeptina-kisspeptina, ya que la transmisión se mantuvo sin cambios después del enjuague.

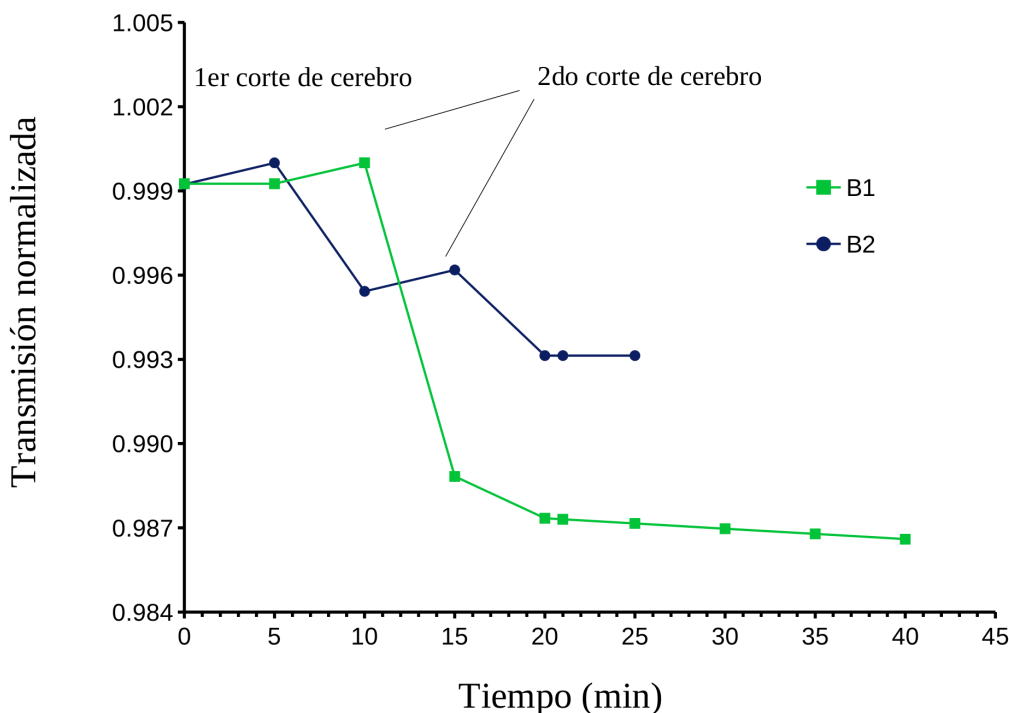


Figura 4.6: Transmisión normalizada en función del tiempo para Biosensores B1 y B2, a la exposición con cerebro de rata.

4.6. Conclusiones Parciales

Se realizó un protocolo experimental para el desarrollo de un biosensor basado en FO estándar y su caracterización. La espectroscopia infrarroja mostró la presencia de enlaces para cada uno de los elementos que componían el biosensor.

Las micrografías obtenidas por SEM mostraron la homogeneidad presentada en cada etapa de autoensamblaje, lo que confirmó los resultados observados a partir de las imágenes obtenidas por microscopía óptica. Se observaron variaciones de amplitud asociadas al proceso de inmovilización o a la interacción con los tejidos, en los espectros de salida del arreglo experimental.

Las técnicas espectrales y morfológicas permitieron determinar la estructura y homogeneidad del biosensor construido mediante el autoensamblaje del anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina en la matriz OF-taper. La caracterización estructural y microscópica del biosensor mostró que el autoensamblaje se logró satisfactoriamente.

Los resultados del biosensor expuesto al analito detectaron kisspeptina (contenida en tejido cerebral de rata), ya que el análisis de los espectros de transmisión indicó claras variaciones en función del tiempo.

Los resultados mostrados fueron publicados en la revista Applied Optics, ver Apéndice E.1.

Capítulo 5

Biosensores en FRPL

La detección de la opsina Opn5 se realizó en tejidos cerebrales de hembra y macho, ovario y testículo, por cada tejido se realizaron dos biosensores, los cuales están asociados en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Biosensores de FRPL por cada material biológico.

Material biológico	Biosensor
Cerebro de hembra	Biosensor 1
	Biosensor 2
Cerebro de macho	Biosensor 3
	Biosensor 4
Ovario	Biosensor 5
	Biosensor 6
Testículo	Biosensor 7
	Biosensor 8

5.1. Microscopia óptica

La caracterización morfológica en el grabado de las RPL, hidroxilación y funcionalización se realizó mediante microscopia óptica. La fibra óptica tiene un diámetro de $125 \mu m$ al eliminar el revestimiento, al hidroxilar la superficie se redujo su diámetro a $120 \mu m$ y al funcionalizar el diámetro aumentó $5 \mu m$, ver figura 5.1, permitiendo observar la homogeneidad superficial en el autoensamblado del biosensor.

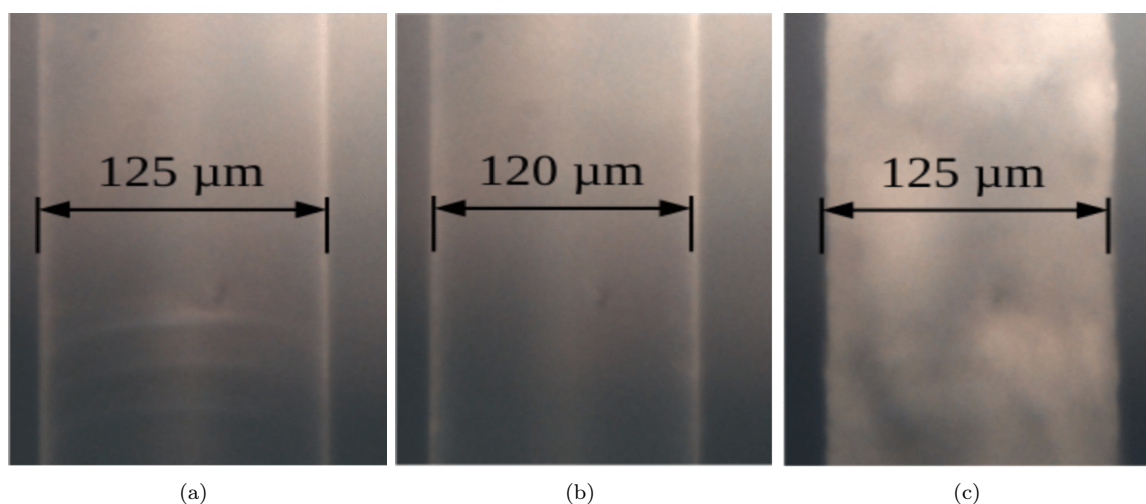


Figura 5.1: Imágenes ópticas obtenidas en: a) Fibra con RPL, b) Hidroxilación y c) Funcionalización.

5.2. Espectroscopia de infrarrojo

En la figura 5.2 se muestran los espectros infrarrojos obtenidos en cada etapa del autoensamblaje del biosensor 1 según: FRPL (gris claro), hidroxilación (naranja), funcionalización (negro), inmovilización (azul) y biosensor de FRPL con el 1er y 2do cortes de tejido cerebral (roja).

La línea gris claro corresponde al espectro de la fibra óptica con RPL, donde se observan los enlaces $\text{Si}-\text{O}_2-\text{Si}$ presentes en el silicio, estos cambios espectrales se observaron en la región entre 950 y 1200 cm^{-1} . La línea naranja muestra el espectro de la fibra hidroxilada, donde se pueden observar cambios espectrales entre 1500 y 1700 cm^{-1} lo que se atribuye a la absorción de los enlaces $\text{C}-\text{O}$ y $\text{N}-\text{H}$ y para la región entre 1000 a 1200 cm^{-1} , estos cambios de absorción se deben a los enlaces $-\text{OH}$ presentes en esta etapa.

Posteriormente, la línea negra muestra el espectro obtenido cuando se realizó la funcionalización, donde se observaron cambios espectrales en las bandas asociadas a los enlaces NH y $\text{NH}-\text{R}$ de APTMS entre 1500 a 1600 cm^{-1} y también de 1600 a 1700 cm^{-1} , la disminución de la absorbancia es notable y los picos asociados a los enlaces de CO están ahora entre 1000 y 1250 cm^{-1} .

La línea azul muestra el espectro de inmovilización de OPN5 en el FRPL, que mostró bandas a 1050 cm^{-1} y un aumento de la intensidad en los picos entre 1540 y 1650 cm^{-1} . Y finalmente, la línea roja muestra la detección del biosensor FRPL de opsina Opn5 presente en tejidos cerebrales donde ahora se observa bien la presencia de la banda asociada al enlace $\text{C}-\text{O}$ del anticuerpo, así como las variaciones espectrales de intensidad en la región entre los 1550 y 1640 cm^{-1} asociadas a los enlaces $\text{NH}-\text{R}$ y $\text{N}-\text{H}$, que están presentes en la proteína Opn5.

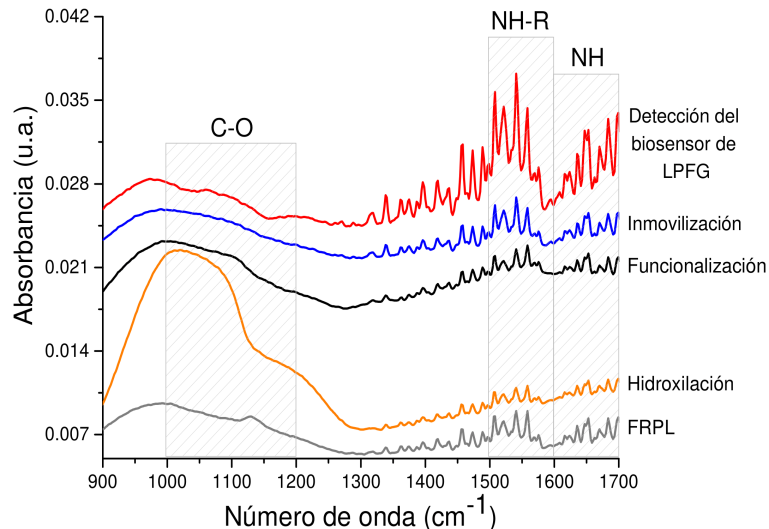


Figura 5.2: Espectros de infrarrojo de las diferentes etapas de autoensamblado, FRPL (gris), hidroxilación (naranja), funcionalización (negro), inmovilización de la OPN5 en 1h (azul) y detección de la Opn5 (rojo).

5.3. Transmisión

5.3.1. Cerebro

Para asegurar la detección de la opsina Opn5 en el tejido cerebral, los espectros de salida se obtuvieron en cada etapa del autoensamblaje de los biosensores de FRPL, así como sus controles, que se muestran en la tabla 5.2.

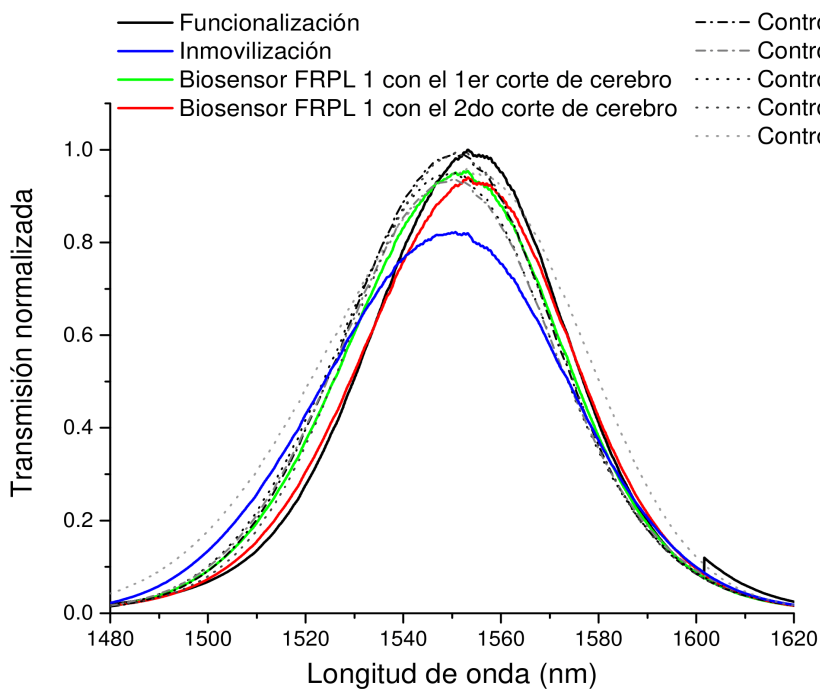
Tabla 5.2: Descripción de los controles.

Detección	Descripción	
Funcionalizada con tejido	Control I	FRPL en la etapa de funcionalización interactuando con tejido de cerebro
Funcionizada con PBS	Control II	FRPL en la etapa de funcionalización interactuando con una solución de PBS sin anticuerpo
Biosensor FRPL con PBS	Control III	Biosensor FRPL interactuando con PBS
Biosensor FRPL con otro tejido	Control IV	Biosensor FRPL interactúa con tejido de riñón
Biosensor FRPL con otra proteína	Control V	Biosensor FRPL interactuando con la proteína kisspeptina

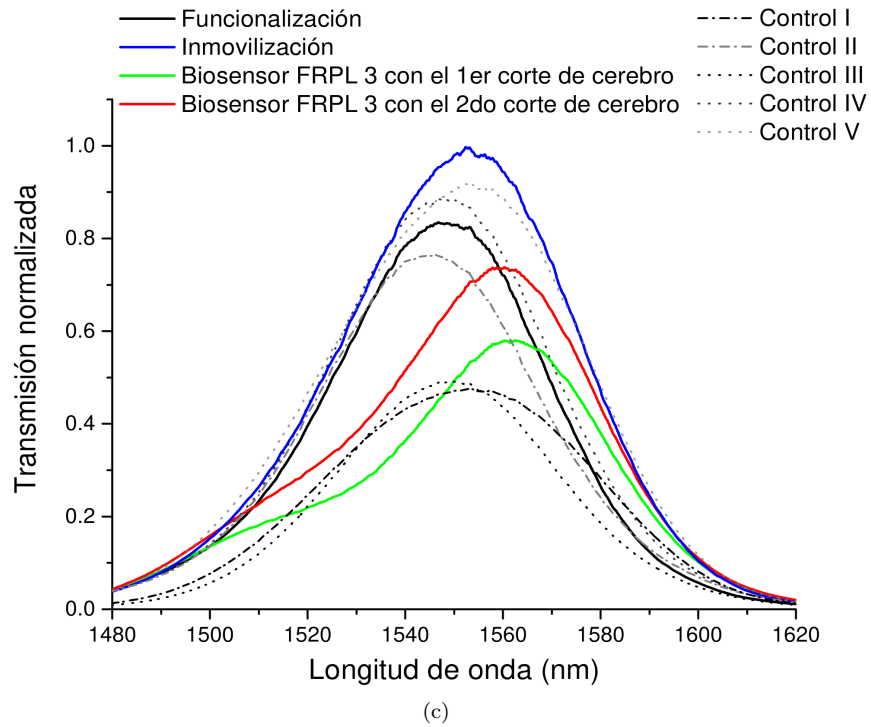
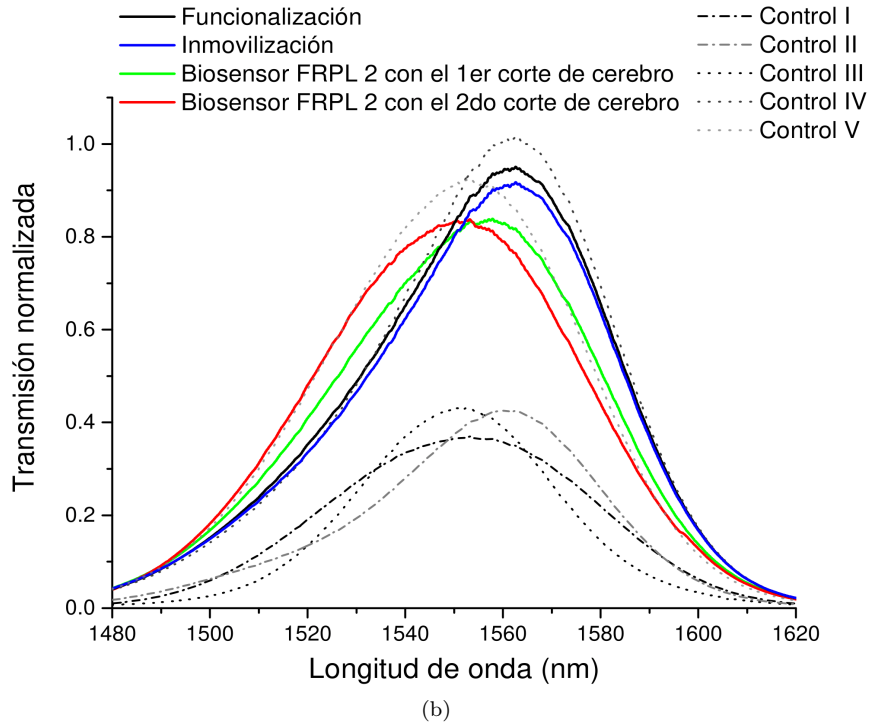
La figura 5.3 muestra los espectros de salida de transmisión normalizada en cada etapa del autoensamblaje de los biosensores (1, 2, 3 y 4): funcionalización (línea negra), inmovilización de la OPN5 (línea azul), detección con el 1er corte de cerebro (línea verde), detección con 2do corte de cerebro (línea roja), Control I (línea discontinua y punto - negra), Control II (línea discontinua y punto - gris), Control III (línea punteada - negra), Control IV (línea punteada - gris) y Control V (línea punteada - gris claro). Los espectros de transmisión medidos en cada etapa del autoensamblado del biosensor se midieron en un rango de 1464 a 1664 nm. Las variaciones de amplitud y los desplazamientos de los espectros de transmisión pueden interpretarse como el cambio del índice de refracción debido a los enlaces covalentes que están presentes en cada etapa.

En la figura 5.3 (a) se observaron corrimientos espectrales en la longitud de onda de 1550.639 a 1553.254 nm en la inmovilización, en la detección con el 1er corte de cerebro de 1553.21 a 1553.192 nm y en la detección con el 2do corte de cerebro de 1553.192 a 1553.202. En (b) se presentó corrimiento espectral de la inmovilización a la detección con el 1er corte de cerebro en la longitud de onda de 1562.57 a 1557.87 nm, también se observaron pequeños corrimiento espectrales en la longitud de onda de 1557.879 a 1557.901 nm en la detección con el 1er corte de cerebro y de 1557.901 a 1557.923 nm en la detección con el 2do corte de cerebro.

En (c) se observó corrimiento espectral de 1546.819 a 1552.42 nm en la inmovilización, en la detección con el 1er corte de cerebro de 1552.42 a 1562.59 nm y en la detección con el 2do corte de cerebro hubo un corrimiento de 1557.905 nm a 1562.63 nm. En (d) se presentó un corrimiento espectral en la inmovilización de 1553.22 a 1553.25 nm, en la detección con el 1er corte de cerebro de 1553.25 a 1557.89 nm y en la detección con el 2do corte de cerebro hubo un corrimiento de 1557.89 a 1557.108 nm.



(a)



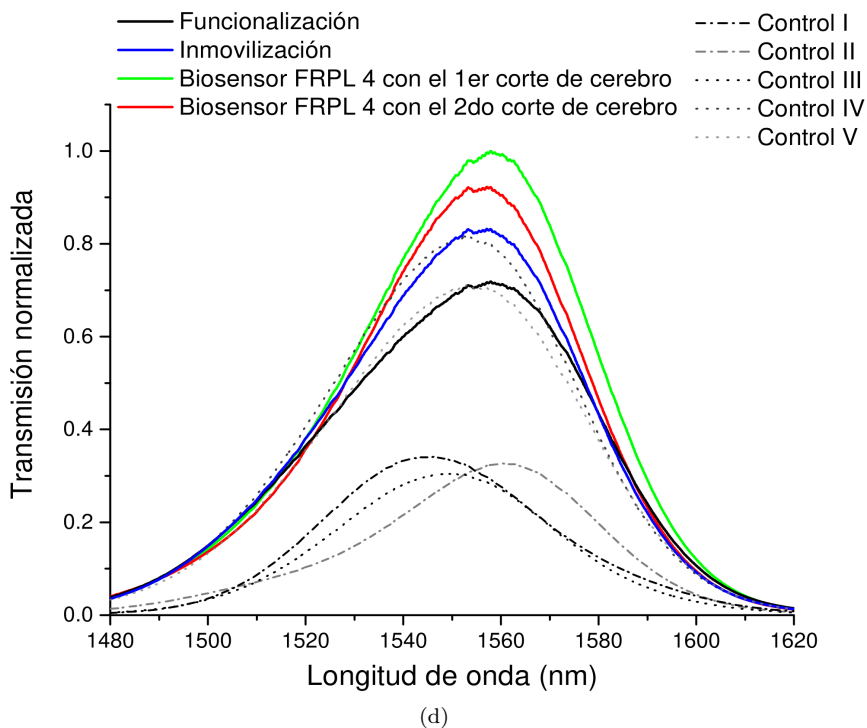


Figura 5.3: Espectros de salida en cada etapa del autoensamblado de los biosensores; (a) biosensor 1, (b) biosensor 2, (c) biosensor 3 y (d) biosensor 4.

En resumen, la respuesta del biosensor a Opn5 en el primer corte de tejido cerebral del modelo murino y el segundo corte se mostró en el espectro de transmisión (a través de la atenuación o corrimiento de longitud de onda de los picos), debido a cambios en el índice de refracción generados por el anticuerpo (OPN5) cuando interactúa con la neuropsina (Opn5).

En general, podemos observar que los Biosensores FRPL 2 y 3 (Fig. 5.3 (b) y (c)) muestran grandes variaciones espectrales, la disminución máxima fue del 17%, el valor máximo en esta región normalizada es 1,00 tanto para el corte cerebral como para el desplazamiento de la longitud de onda de 4,61 nm (Fig. 5.3 (b)) entre el primer y segundo corte de cerebro. Mientras que para el biosensor 3 (Fig. 5.3 (c)), la disminución máxima fue del 42% y del 27% para el primer y segundo corte de cerebro y el cambio de longitud de onda de 2,6 nm. Los biosensores 1 y 4 (Fig. 5.3 (a) y (d)) muestran que la disminución máxima fue del 5% y el 8% y el cambio de longitud de onda fue de 1 nm respectivamente.

Por otro lado podemos mencionar que a partir de estos espectros de transmisión podemos distinguir entre el proceso de autoensamblaje del biosensor (funcionalización e inmovilización) y los controles que no siguen el mismo orden que el resto. En general, para los controles, la disminución máxima del pico fue del 70% y el desplazamiento máximo de la longitud de onda fue de 16 nm, ver Fig. 5.3 (d). Sin embargo, como se discutirá más adelante, el comportamiento general del espectro se observará mediante agrupamientos de los datos en función de la etapa de proceso, lo que fue revelado por el análisis de componentes principales (PCA).

5.3.2. Gónadas

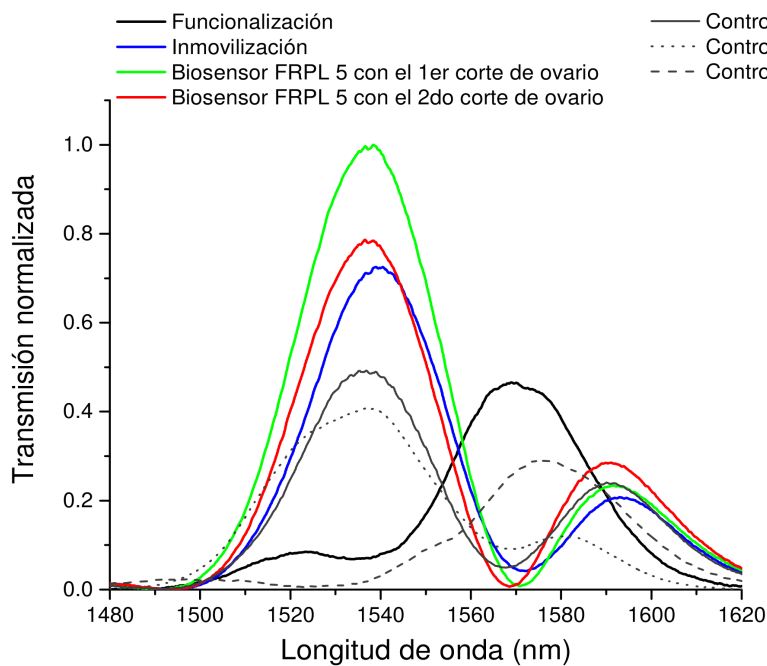
Para asegurar la detección de la opsina Opn5 en gónadas, los espectros de salida se obtuvieron en cada etapa del autoensamblaje de los biosensores de FRPL, así como sus controles, que se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Descripción de los controles.

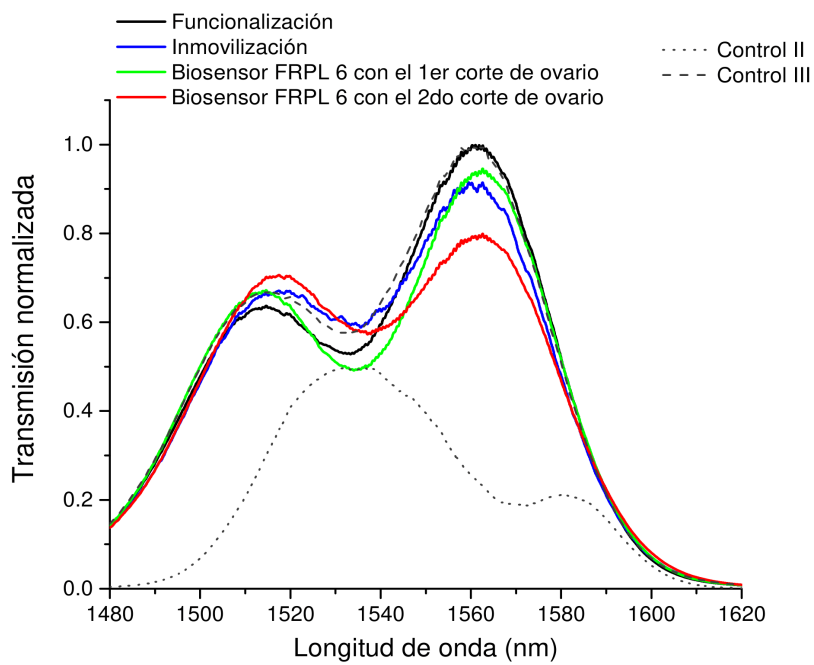
Detección		Descripción
Biosensor de FRPL con PBS	Control I	Biosensor de FRPL interactuando con PBS
Funcionalizada con tejido	Control II	FRPL en la etapa de funcionalización interactuando con tejido de gónada
Funcionalizada con PBS	Control III	FRPL en la etapa de funcionalización interactuando con una solución de PBS sin anticuerpo

La figura 5.4 muestra los espectros de salida de transmisión normalizada en cada etapa del autoensamblaje de los biosensores (5, 6, 7 y 8): funcionalización (línea negra), inmovilización de la OPN5 (línea azul), detección con el 1er corte de gónada (línea verde), detección con 2do corte de gónada (línea roja), Control I (línea gris), Control II (línea punteada) y Control III (línea discontinua).

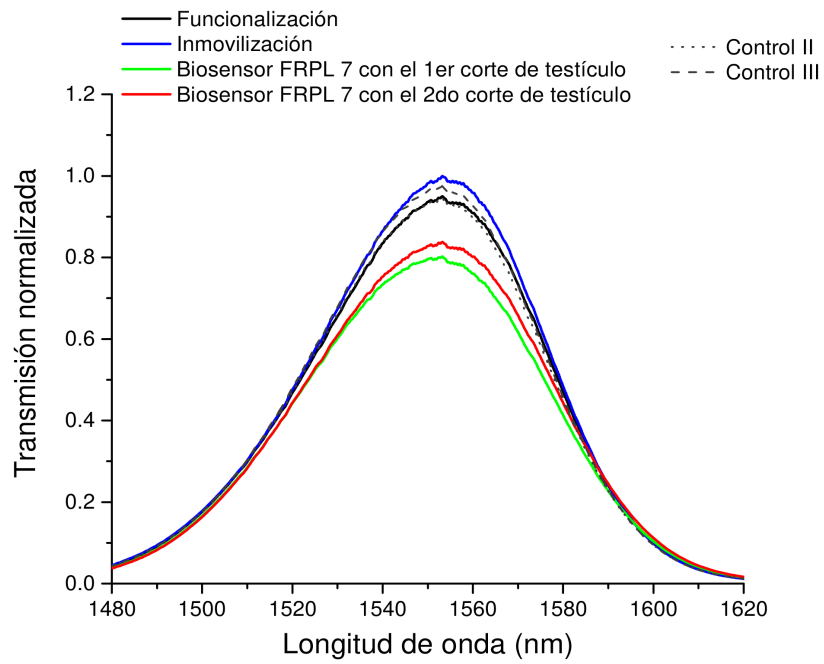
En la figura 5.4 (a) se observaron corrimientos espectrales en la longitud de onda de 1568.93 nm a 1538.98 nm en la inmovilización, en la detección con el 1er corte de ovario de 1538.37 nm a 1538.33 nm y en la detección con el 2do corte de ovario hubo un corrimiento a 1536.52 nm. En (b) se presentó corrimiento espectral de la inmovilización a la detección con el 1er corte de ovario en la longitud de onda de 1561.02 nm a 1559.49 nm y de la detección con el 1er y 2do corte de ovario hubo un corrimiento de 1562.58 nm a 1562.606 nm. Y en la figura 5.4 (c) se observó corrimiento espectral de 1553.218 nm a 1553.24 nm en la inmovilización, en la detección con el 1er corte de testículo se presentó un corrimiento a 1553.16 nm y en la detección con el 2do corte de testículo hubo un corrimiento a 1553.25 nm. Y en (d) se presentó un corrimiento espectral en la inmovilización de 1553.23 nm a 1546.76 nm, en la detección con el 1er corte de testículo se presentó un corrimiento a 1540.58 nm y en la detección con el 2do corte de testículo hubo un corrimiento a 1538.99 nm. Por otro lado podemos mencionar que a partir de estos espectros de transmisión podemos distinguir entre el proceso de autoensamblaje del biosensor (funcionalización e inmovilización) y los controles que no siguen el mismo orden que el resto. En general, para los controles, la disminución máxima del pico fue del 59 % y el desplazamiento máximo de la longitud de onda fue de 39.2 nm (ver Fig. 5.4 (a)).



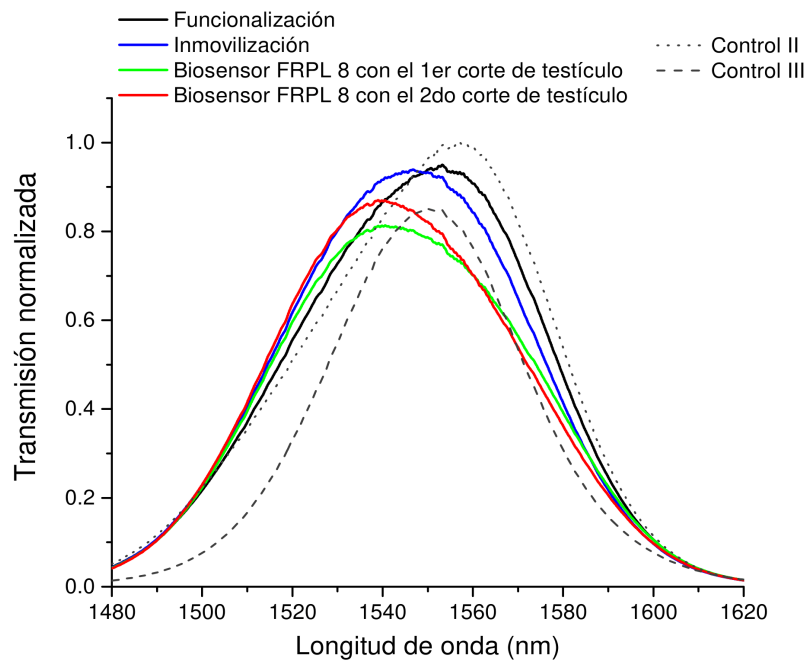
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.4: Espectros de salida en cada etapa del autoensamblado de los biosensores; (a) biosensor 5, (b) biosensor 6, (c) biosensor 7 y (d) biosensor 8.

5.4. Análisis de componentes principales de los resultados experimentales de transmisión

Los datos experimentales muestran diferencias entre cada etapa del proceso de autoensamblaje, esto podría no ser suficiente para discriminar entre muestras o etapas del proceso, el análisis de componentes principales se realizó en los espectros de salida en cada etapa del autoensamblaje, para tener una mejor discriminación y confirmar la detección del biosensor.

Este análisis se realizó a diferentes rangos de longitud de onda, que es donde se observaron los cambios principalmente en la señal de transmitancia (en intensidad y en comportamiento espectral): 1500 a 1550 nm, 1550 a 1600 nm, 1500 a 1600 nm y 1525 a 1600 nm, con un intervalo de medición de 0.05 nm. De manera similar, el análisis se llevó a cabo para tres intervalos de 1464 a 1654 nm, 1480 a 1600 y 1500 a 1600 nm, pero ahora con un intervalo de medición de 0.2 nm. En el apéndice D, se muestran en una tabla D.1 los valores de ajuste del componente principal (PC) obtenidos de las diferentes regiones de longitud de onda analizadas para cada biosensor. En casi todos los casos, el ajuste fue efectivo, alcanzó más del 90 % para el PC1 y también alcanzó más del 99 % con las tres primeras PCs. De la tabla D.1, se observa para el biosensor 1 que el valor de la primera componentes principal se encuentra entre 94.8 % y 99.4 % de la varianza, en este caso la varianza mayor de la primera componente corresponde al 99.486 %, para el rango de la longitud de onda de 1550 a 1600 nm. Por lo tanto para los siguientes resultados solo se mostraran las componentes principales con mayor varianza el cual corresponde a la mayor cantidad de información del sistema.

5.4.1. Cerebro

La figura 5.5 muestra el PCA para el biosensor 1, 2, 3 y 4 de FRPL, el valor de PC1 corresponde al 99,486 %, 96,796 %, 96,427 % y 99,669 % de la varianza total, respectivamente; y más del 99,99 % para los tres primeros componentes principales graficados. El análisis de los biosensores de PCA se realizó en las siguientes longitud de onda: 1550 a 1600 nm (Biosensor 1 y 2), 1525 a 1575 nm (Biosensor 3) y 1530 a 1580 nm (Biosensor 4).

En las cuatro figuras (Fig. 5.5a-d) se pudo observar una buena discriminación entre las diferentes etapas del proceso durante el autoensamblaje de los biosensores FRPL. También se muestran los controles; donde el control V regula la interacción entre el biosensor de FRPL y otro tipo de proteína, kisspeptina (cuadrado blanco con una X). En todos los casos, los otros grupos están separados. En todas las figuras, los datos numéricos asociados a los biosensores FRPL que interactúan con un tejido cerebral que no contiene Opn5 (riñón), etiquetado como control IV, están en valores opuestos a los biosensores de FRPL. De hecho, los controles asociados con la inmovilización (Controles III y IV) están más cerca del agrupamiento de inmovilización. La Tabla 5.4 muestra cómo se ubican los grupos según el valor de PC.

La etapa de funcionalizado y el biosensor de FRPL que interactúan con uno o dos cortes de cerebro, estaban en lados opuestos del PC1. Por otro lado, la etapa de inmovilización y los biosensores FRPL en la mayoría de los casos aparecieron en el mismo valor de eje de PC1 y PC2 sin aglomeración entre ellos. PC2 podría estar asociado con el tiempo transcurrido de la etapa de inmovilización, donde el grupo se mueve a través de los valores de PC2 de acuerdo con el tiempo de inmovilización.

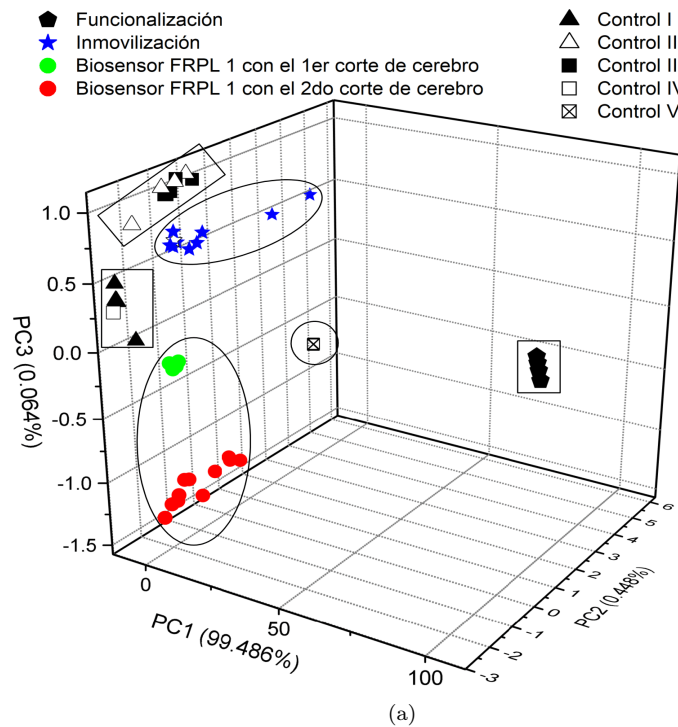
Los resultados anteriores indican que los biosensores FRPL basados en OPN5 tienen una selectividad satisfactoria ya que es posible discriminar entre varios tipos de interacciones FRPL. Asimismo, la combinación de resultados experimentales y métodos numéricos contribuye a una poderosa herramienta

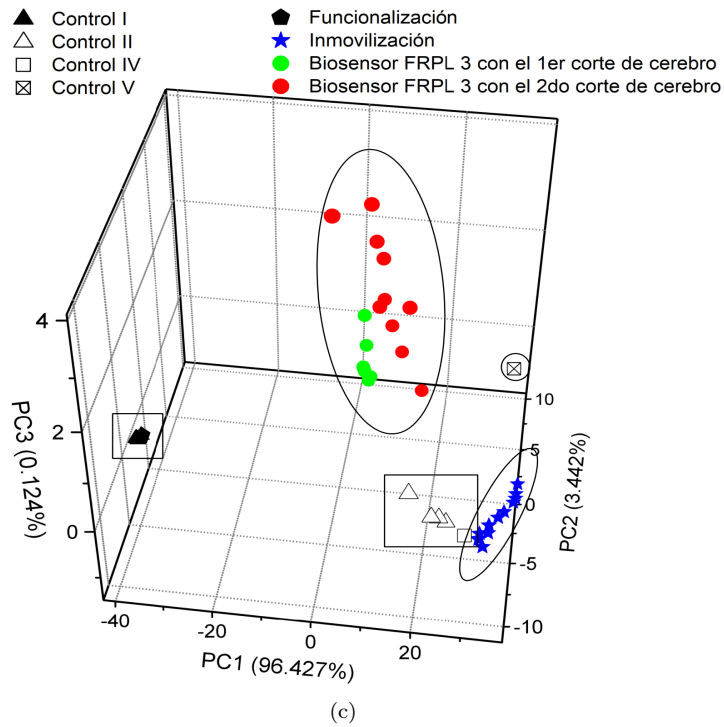
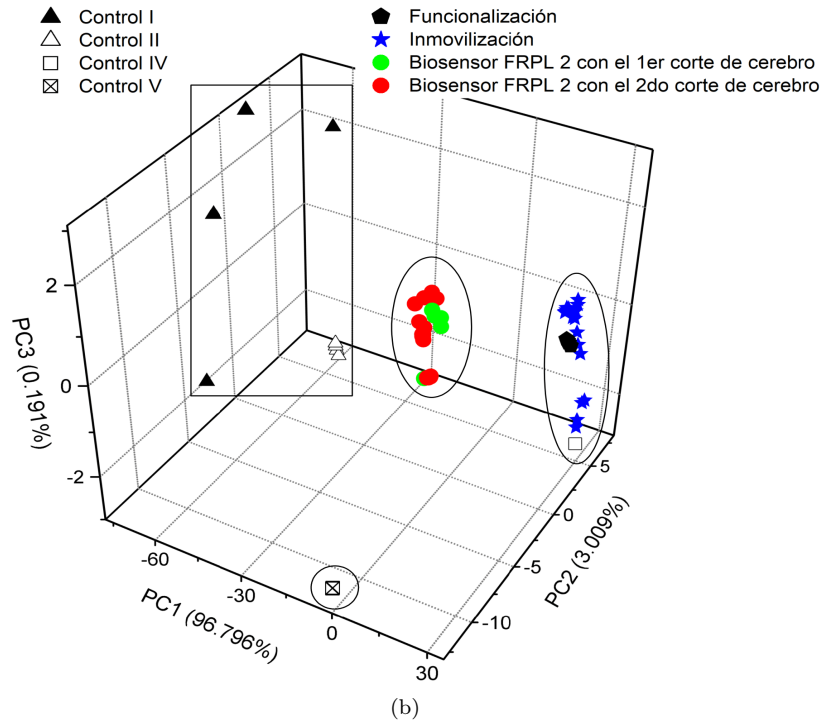
5.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE TRANSMISIÓN

analítica capaz de discriminar cada etapa del autoensamblaje del biosensor FRPL y el tipo de interacción que puede ocurrir al final del proceso de autoensamblaje del biosensor FRPL.

Tabla 5.4: Signo de agrupamiento según el valor de PC para las Figuras 5.5 (a), (b), (c) y (d).

Etapa	Componente principal	Biosensor FRPL 1	Biosensor FRPL 2	Biosensor FRPL 3	Biosensor FRPL 4
Biosensor	PC1	-	-	+	+
	PC2	-	+	+	+
	PC3	-	-	+,-	-
Funcionalización	PC1	+	+	-	-
	PC2	+	+	-	-
	PC3	-	-	+	+
Inmovilización	PC1	-	+	+	+,-
	PC2	+,-	+	+,-	-
	PC3	+	-	-	+,-
Controles de funcionalización I y II	PC1	-	-	+	-
	PC2	-	+	-	-
	PC3	+	+,-	-	-
Controles de inmovilización III y IV	PC1	-	+	+	+,-
	PC2	+,-	+	+,-	-
	PC3	+	-	-	+,-
FRPL vs otras proteínas	PC1	+	+	+	-
	PC2	+	-	+	-
	PC3	-	-	-	+





5.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE TRANSMISIÓN

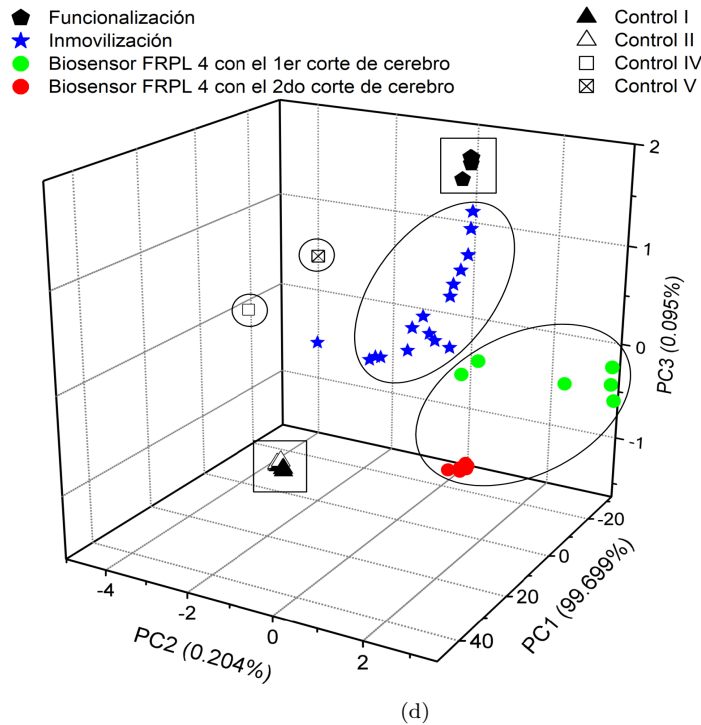


Figura 5.5: Análisis de componentes principales de (a) biosensor 1 , (b) biosensor 2, (c) biosensor 3 y (d) biosensor 4.

Finalmente, para determinar si el PCA podría ayudar a discriminar algo más, se realizó un análisis solo para los resultados de transmisión de la detección con el 1er y 2do corte de cerebro de los biosensores 1, 2, 3 y 4 de FRPL, la Fig.5.6 muestra los resultados para los componentes PC1, PC2 y PC3, para la región de 1550 a 1600 nm. Donde la PC1 corresponde al 96.597 % de la varianza y 99.992 % a la suma de las tres primeras componentes. Los tejidos femeninos que interactúan para los biosensores FRPL se agrupan en los valores positivos de PC3 (biosensores FRPL 1 y 2), y los tejidos masculinos que interactúan con los biosensores FRPL se agrupan en los valores negativos de PC3 (biosensores FRPL 3 y 4). De esta forma PCA permite confirmar que es posible discriminar solo para la detección de Opn5, sino también el genero del tejido, esto a lo largo del PC3.

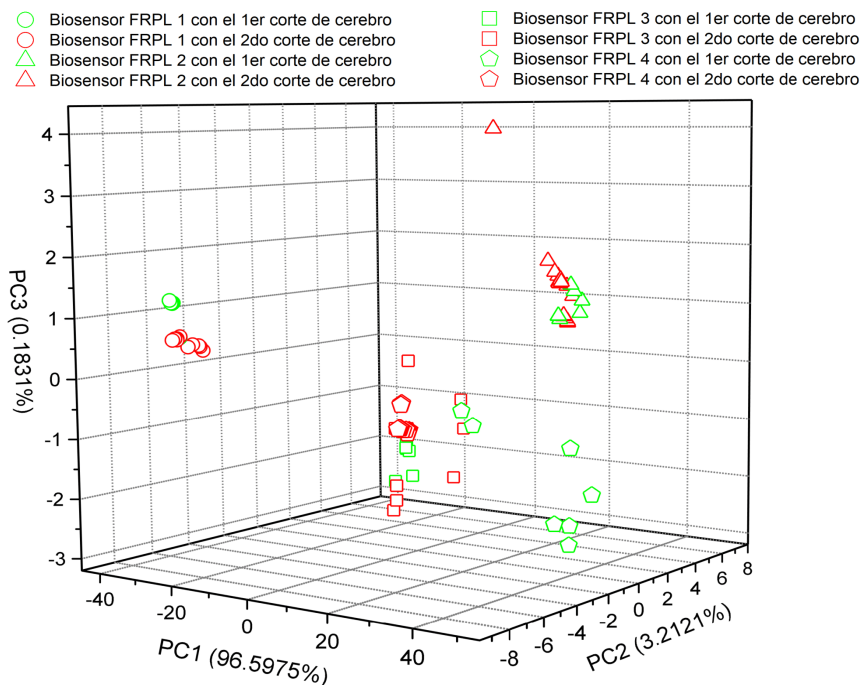


Figura 5.6: Análisis de componentes principales de los espectros de transmisión de la detección con cerebro, de los cuatro biosensores de FRPL.

5.4.2. Gónadas

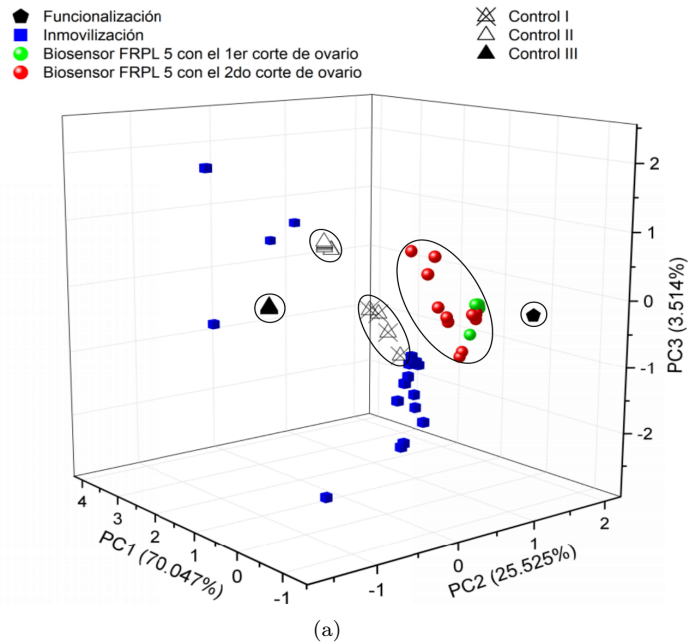
En la figura 5.7(a) se analizó la longitud de onda de 1500 a 1620 nm. En este caso la PC1 corresponde al 70.047 % de la varianza, PC2 a 25.525 % y PC3 a 3.514 %, entre las tres componentes principales se obtiene el 99.086 % de la varianza de las variables originales. La respuesta de detección de funcionalización (pentágonos negros) y los controles de funcionalización con PBS y ovario (triángulos rojos y verdes) se encuentran agrupados y centrados en un solo punto, mientras que el control de biosensor con PBS (triángulos cafés) se alcanzan a diferenciar de las otras señales. La respuesta de la inmovilización (cuadrados azules) tiene valores dispersos correspondientes a los primeros 20 minutos de medición, y los demás se encuentran aglomerados en un intervalo de $[-0.5, 0.5]$ para PC1 y $[-0.5, 0.5]$ para PC2. Y la respuesta de la detección con el 1er y 2do corte (círculos verdes y rojos) se encuentran aglomerados en un intervalo de $[-0.5, 1]$ para PC1 y $[-0.5, 1.5]$ para PC2.

En 5.7(b) corresponde a la longitud de onda analizada de 1500 nm a 1600 nm, donde la PC1 corresponde al 98.803 % de la varianza. Se observa que la funcionalización (pentágonos negros), inmovilización (cuadrados azules), detección con ovario (círculos verdes y rojos) y la funcionalización con PBS (triángulos verdes) se encuentran del lado positivo de PC2 en un intervalo de $[0, 1]$. La respuesta de funcionalización con ovario (triángulos rojos) se encuentra del lado positivo de PC1 y negativo de PC2. La respuesta de inmovilización (cuadrados azules) se encuentra aglomerada del lado positivo de PC3, con algunos valores dispersos correspondientes a los primeros 25 y últimos 10 minutos de medición. Y la respuesta de la detección con el 1er y 2do corte de ovario (círculos verdes y rojos) se encuentran del lado negativo de PC3, los valores dispersos correspondiente a los últimos 10 minutos.

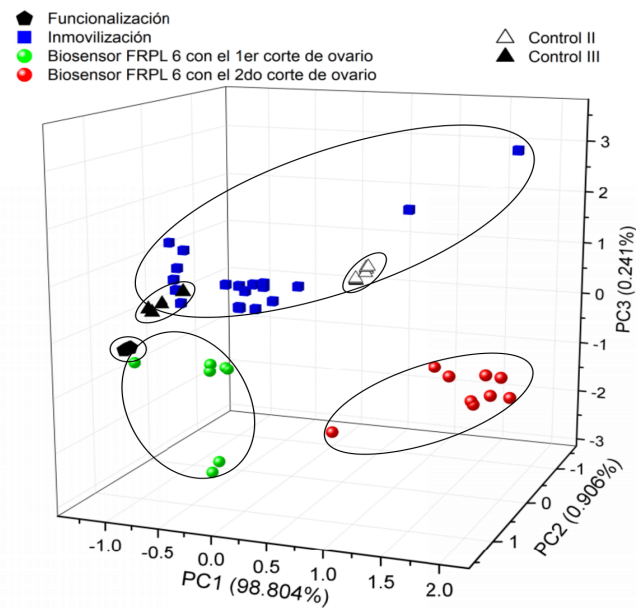
En (c) y (d), la longitud de onda analizada es de 1525 a 1575 nm, donde PC1 corresponde al 97.128 % de varianza, respectivamente. En estas dos gráficas se observa que la funcionalización (pentágonos ne-

5.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE TRANSMISIÓN

gros) y la funcionalización con testículo (triángulos rojos) se encuentran aglomerados y centrados en un solo punto del lado negativo de PC2. Mientras que la inmovilización (cuadrados azules) y la detección con testículo (círculos verdes y rojos) se encuentran del lado positivo de PC2 en el intervalo de [0.5,1]. También en (c) y (d) la detección con el 1er y 2do corte de testículo (círculos verdes y rojos) se encuentran aglomerados en el lado positivo de PC1 y PC3. Y la inmovilización (cuadrados azules) en (c) tiene valores dispersos correspondientes a los primeros 25 minutos de medición, mientras que en (d) a los 30 minutos.



(a)



(b)

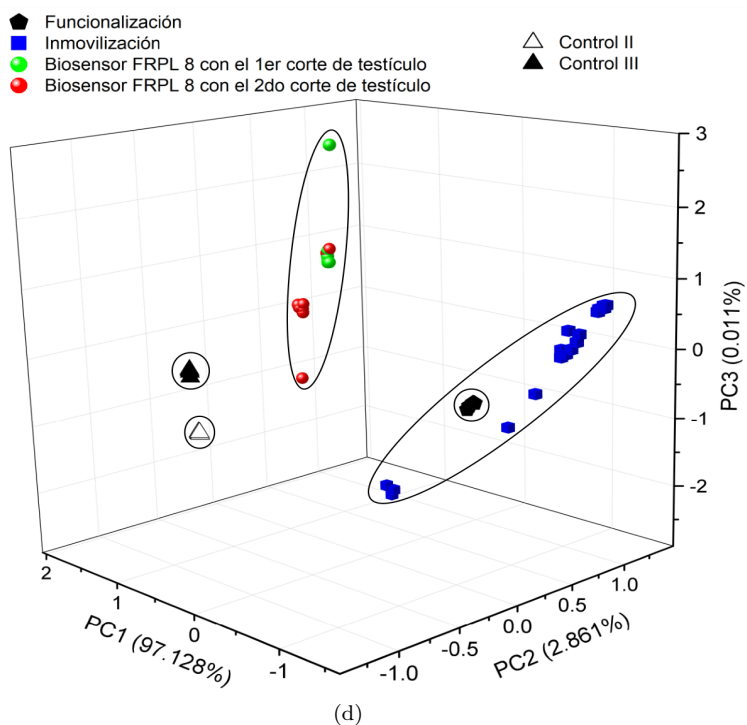
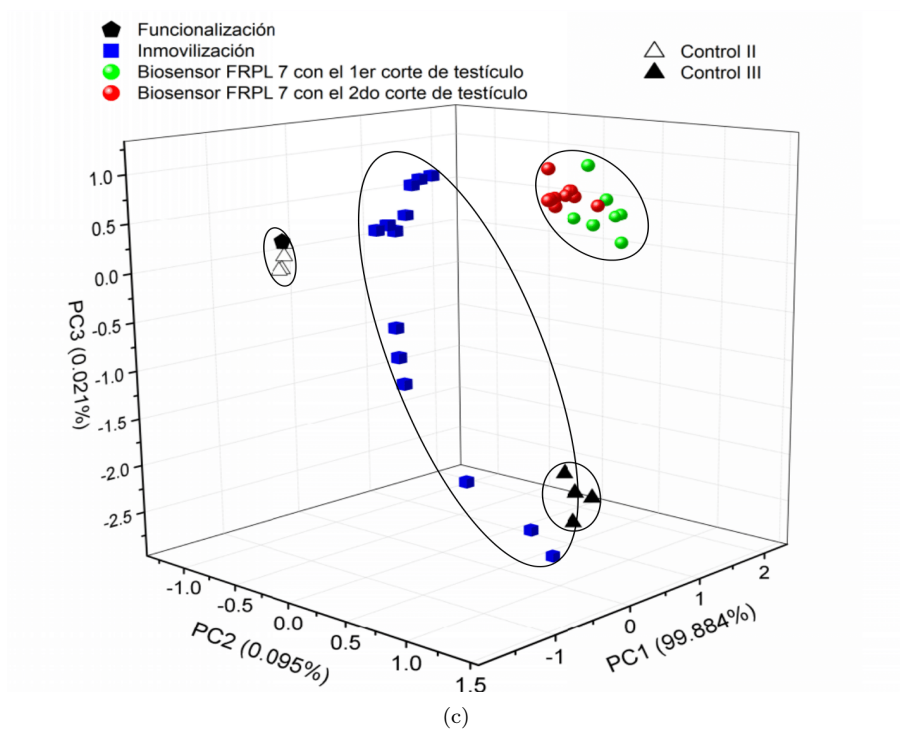


Figura 5.7: Análisis de componentes principales de (a) biosensor 5 , (b) biosensor 6 , (c) biosensor 7 y (d) biosensor 8.

Finalmente, en la figura 5.8 se analizó la detección de los 8 biosensores de FRPL con el 1er y 2do

corte de cerebro, ovario y testículo. La longitud de onda analizada fue de 1550 a 1600 nm. Donde la PC1 corresponde al 95.449 % de la varianza y 99.656 % a la suma de las tres primeras componentes. Se observa que la detección con cerebro de hembra y macho (círculos y cuadrados (rojos, negros, azul y cian)) se encuentra del lado negativo de PC1 y PC2. La respuesta de la detección con ovario (círculos y cuadrados (amarillos y rosas)) se encuentra del lado negativo de PC1 y lado positivo de PC2. Y la respuesta de la detección con testículo (círculos y cuadrados (verde y azul oscuro)) se encuentran del lado positivo de PC1 y lado negativo de PC2. De la figura es posible observar la discriminación entre tejidos, debido a la agrupación de la nube de puntos observada en el gráficos de PCA.

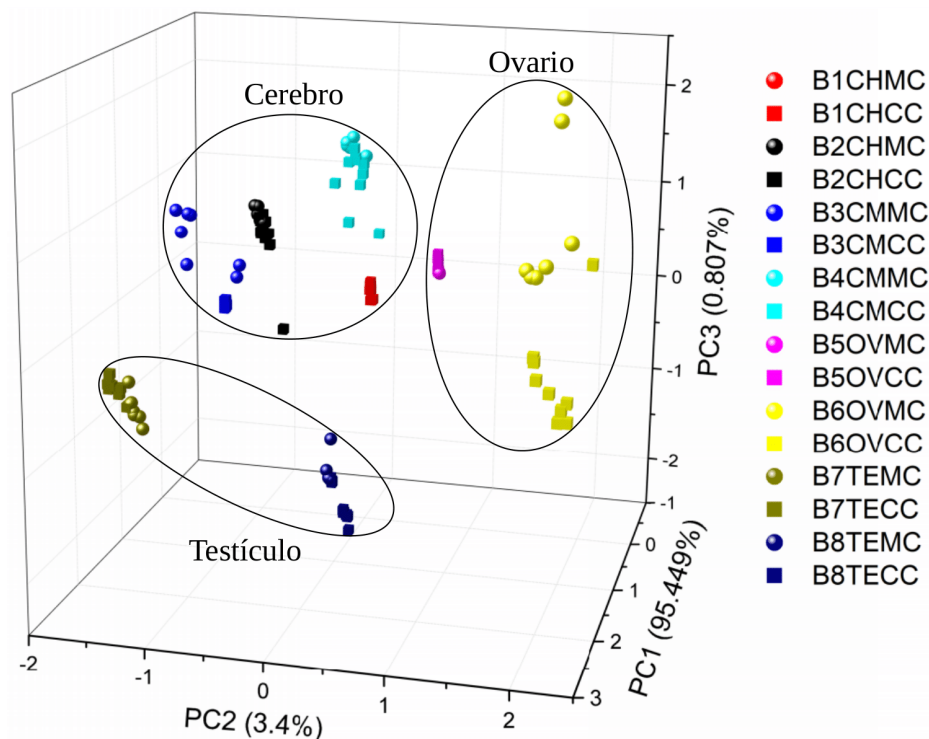


Figura 5.8: Espectros de transmisión medidos en cada etapa del autoensamblado del biosensor y controles.

5.5. Conclusiones Parciales

La experiencia adquirida en el autoensamblado del biosensor en FO-taper sirvió para mejorarla la metodología en biosensores en FRPL.

Se desarrollo la metodología del autoensamblado del biosensor de FRPL y su caracterización. Donde las técnicas espectrales y morfológicas permitieron determinar la estructura y homogeneidad del biosensor construido mediante la inmovilización del anticuerpo policlonal OPN5 en FRPL a través del autoensamblado del biosensor.

Las imágenes de microscopia nos permitieron poder determinar la homogeneidad superficial del sistema biosensor en la hidroxilación y funcionalización. El espectro de IR permitió determinar la estructura y homogeneidad del biosensor FRPL construido mediante el autoensamblaje del anticuerpo policlonal OPN5 en la matriz FRPL.

Se observaron variaciones de amplitud y desplazamiento de longitud de onda en los espectros de salida de los biosensores FRPL. Los cuales están asociados a la inmovilización del anticuerpo policlonal OPN5 y a la detección de la neuropsina (Opn5) presente en el cerebro en la región del hipotálamo y gónadas del modelo murino.

El análisis de componentes principales permitió analizar los datos obtenidos en transmitancia lo que nos ayudo a correlacionar los datos numéricos con los resultados experimentales, mediante la agrupación de los datos en términos de las componentes principales del nuevo sistema. En la región de 1500 nm a 1600 nm el valor de la primera componente se encuentra entre 96 % y 99.884 % de la varianza.

El PCA confirmó que el autoensamblaje del biosensor FRPL y la detección de opsina Opn5 se realizaron correctamente y que el PC1 podría estar asociado a la etapa de detección y el PC2 al tiempo durante cada proceso.

Además, la inmovilización del anticuerpo policlonal OPN5 nos permitirá en un futuro, determinar la presencia de Opn5 en muestras in vivo de interés en optogenética.

Los resultados mostrados en este capítulo fueron publicados en la revista Optics & Laser Technology, ver Apendice E.2.

Y finalmente como trabajo a futuro se desea variar la longitud del tamaño de la detección de los biosensores en FO-Taper y FRPL para determinar en que casos existirán mayores variaciones de amplitud y desplazamiento de longitud de onda.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

Se desarrollaron los protocolos experimentales para la generación de los biosensores basados en FO-taper y FRPL, utilizando anticuerpos como elemento de reconocimiento biológico, cuyos resultados pueden ser extrapolados a otros analitos de interés diferentes a los del presente trabajo.

Se desarrolló la caracterización y metodología del autoensamblado del biosensor en fibra óptica SMF-28 con taper y rejilla de período largo. Donde las técnicas espectrales y morfológicas permitieron determinar la estructura y homogeneidad del biosensor construido mediante la inmovilización del anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina y OPN5 en la superficie de la fibra óptica con taper y rejilla de período largo a través del autoensamblado del biosensor.

Las imágenes de microscopia permitieron determinar la homogeneidad superficial en cada etapa de autoensamblaje de los biosensores desarrollados. La espectroscopia de infrarrojo evidencia la presencia de los enlaces de cada uno de los elementos que componen el biosensor en cada etapa del autoensamblado, permitiendo determinar la estructura y homogeneidad del biosensor FO-taper y FRPL.

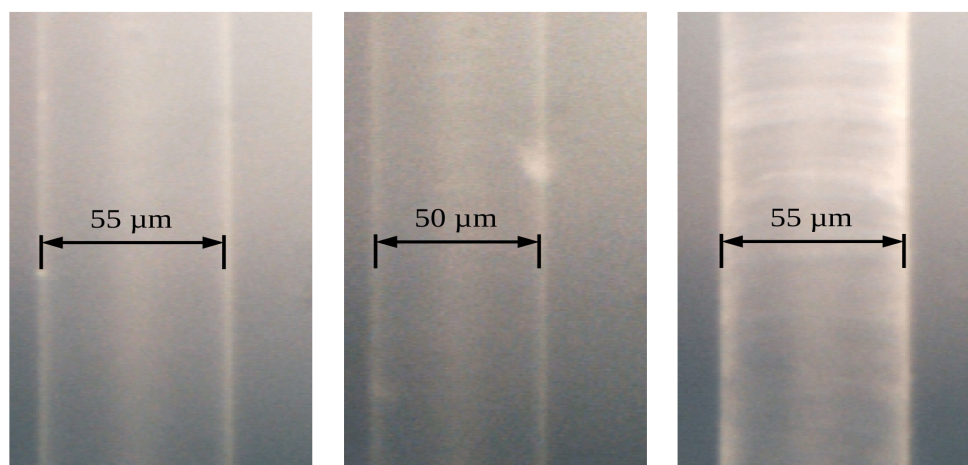
La señal de salida de la transmisión permitió observar variaciones de amplitud y desplazamiento de longitud de onda en los espectros de salida de los biosensores FRPL en tiempo real. En función del tiempo, las variaciones están asociadas a la inmovilización del anticuerpo policlonal receptor de kisspeptina y OPN5 y a la detección de la proteína kisspeptina y neuropsina (Opn5) presente en el cerebro en la región del hipotálamo y gónadas del modelo murino.

El análisis de componentes principales permitió analizar los datos obtenidos en transmitancia de los biosensores de FO-taper y FRPL. Lo que ayudó a correlacionar los datos numéricos con los resultados experimentales, mediante la agrupación de los datos en términos de las componentes principales del nuevo sistema. En la región de 1500 a 1600 nm el valor de la primera componente se encuentra entre 70.047% y 99.699% de la varianza. El PCA confirmó que el autoensamblaje de los biosensores en FO-taper y FRPL, la detección de la proteína kisspeptina y opsina Opn5 se realizaron correctamente. En el PCA de los biosensores de FRPL se observó que el PC1 podría estar asociado a la etapa de detección y el PC2 al tiempo durante cada proceso.

Finalmente, los biosensores de fibra óptica tienen el potencial de detección *in situ*, en tiempo real para numerosas aplicaciones. Como trabajo a futuro, se desea desarrollar biosensores basados en FO-taper y FRPL que puedan actuar como optrodos para detectar en tiempo real la proteína expresada por la respuesta del gen a la irradiación de luz.

Apéndice A

Imágenes de Microscopia

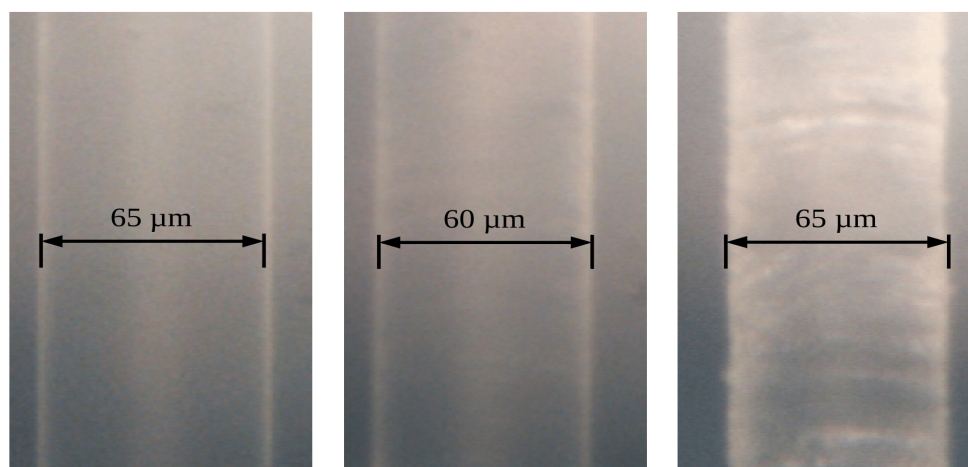


FO-Taper

Hidroxilación

Funcionalización

(a)



FO-Taper

Hidroxilación

Funcionalización

(b)

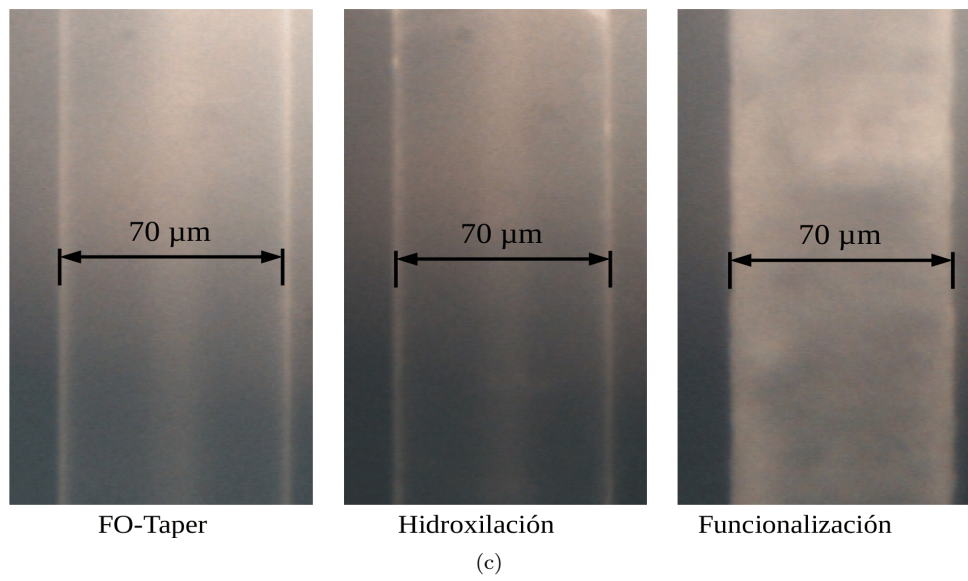


Figura A.1: Imágenes ópticas obtenidas en FO-taper, hidroxilación y funcionalización.

Apéndice B

Análisis de componentes principales realizado en python

```
import pandas as pd
import os
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from sklearn.decomposition import PCA
from sklearn.preprocessing import StandardScaler
from matplotlib import colors as mcolors
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D

def PCA(Longitud_Inicial,Longitud_Final):
    direccion='Cerebro-Hembra/FRPL17-2/Datos-Completos/' #Lugar donde estan los archivos
    direccion1='Cerebro-Hembra/FRPL17-2/Imagenes/' #Lugar donde quieres guardar las graficas
    direccion2=f'Graficas-Longitud_Inicial-Longitud_Final/'
    os.mkdir(direccion1 + direccion2)

    #Se obtiene la lista de nombres en la dirección dada
    archivos=os.listdir(direccion)
    archivos.sort()

    Lista=[]
    for i in range(len(archivos)):
        datos=open(direccion+archivos[i], 'r')
        lista=datos.readlines()
        n=len(lista)
        lista1=[j.split() for j in lista[1:n]]
        Lista.append(lista1)

    nL=len(Lista)
    Minimo=[]
    Maximo=[]
    for i in range(nL):
        lista=[l[0] for l in Lista[i]]
        minimo=min(lista)
        maximo=max(lista)
        Minimo.append(minimo)
        Maximo.append(maximo)
    minimo=min(Minimo)
    maximo=max(Maximo)
    dif=int((float(maximo)-float(minimo))/0.05)

    ListaCeros=[[0]*(dif+1) for i in range(nL)]
    ListaPrueba=[float(minimo)+(0.05*i) for i in range(dif+1)]

    for i in range(nL):
        ListaPrueba1=[l[0] for l in Lista[i]]
```

```

ListaPrueba1=[float(i) for i in ListaPrueba1]
ListaPrueba2=[l[1] for l in Lista[i]]
ListaPrueba2=[float(i) for i in ListaPrueba2]
for j in range(len(ListaPrueba1)):
    ValorBuscado=ListaPrueba.index(ListaPrueba1[j])
    ListaCeros[i][ValorBuscado]=ListaPrueba2[j]

Valor_LI=ListaPrueba.index(Longitud_Inicial)
Valor_LF=ListaPrueba.index(Longitud_Final)
diferencia=Valor_LF-Valor_LI
print('Numero de columnas=', diferencia, type(diferencia))

Valores=[ListaPrueba[l] for l in range(Valor_LI,Valor_LF+1)]

Nombres=[]
Datos={}
for j in range(len(ListaCeros)):
    lista=ListaCeros[j]
    lista=[lista[l] for l in range(Valor_LI,Valor_LF+1)]
    #busca un punto y crea una lista con las subpartes del string original
    nombre=archivos[j].split('.')[0]
    Nombres.append(nombre)
    Datos[nombre]=lista
Datos1=pd.DataFrame(data=Datos)
DatosT=Datos1.transpose()

Datos2={}
for i in range(diferencia+1):
    lista=DatosT[i]
    name=str(Valores[i])
    Datos2[f'(name)']=lista
frame=pd.DataFrame(data=Datos2)

# Se divide la matriz del dataset en dos partes
X = frame.iloc[:,0:diferencia].values
y=np.array(Nombres)

# Normalizacion

from sklearn.preprocessing import StandardScaler
X_std = StandardScaler().fit_transform(X)

# Calculamos los vectores y valores propios de la matriz de covarianza

cov_mat = np.cov(X_std.T)
cov_mat

eig_vals, eig_vecs = np.linalg.eig(cov_mat)

# Lista de parejas (vector propio, valor propio)
eig_pairs = [(np.abs(eig_vals[i]), eig_vecs[:,i]) for i in range(len(eig_vals))]
# Ordenamos estas parejas den orden descendiente con la funcion sort
eig_pairs.sort(key=lambda x: x[0], reverse=True)

tot = sum(eig_vals)
var_exp = [(i / tot)*100 for i in sorted(eig_vals, reverse=True)]
cum_var_exp = np.cumsum(var_exp)

# Diagrama de barras la varianza explicada por cada valor propio y la acumulada
plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.bar(range(4), var_exp[:4], alpha=0.5, label='Varianza individual explicada',color='g');
plt.step(range(4), cum_var_exp[:4], where='mid', linestyle='-', label='Varianza explicada acumulada');
plt.xticks([0,1,2,3], ['1','2','3','4'],fontsize=18);
plt.ylabel('Razon de Varianza Explicada',fontsize=16);
plt.xlabel('Componentes Principales',fontsize=16);
plt.legend(loc='center right', fontsize=18);

```

```

plt.savefig(direccion1 + direccion2 + f'Varianzaexplicada-Longitud_Inicial-Longitud_Final.pdf')

# Grafico de sedimentacion
plt.figure(figsize=(8, 6))
eigenvalor = [i for i in sorted(eig_vals, reverse=True)]
plt.scatter(np.arange(0,diferencia,1), eigenvalor, marker='o', facecolors='none',edgecolors='k')
plt.plot(np.arange(0,diferencia,1), eigenvalor,'k-')
plt.ylabel('Valor propio',fontSize=16);
plt.xlabel('Numero de componente principal',fontSize=16);
plt.title('Grafico de sedimentacion');
plt.savefig(direccion1 + direccion2 + f'GraficoSedimentacion-Longitud_Inicial-Longitud_Final.pdf');

CP=X_std.dot(eig_vecs)
lista=CP[:,3]
Datos3={}
Datos3['Medicion']=Nombres
for j in range(3):
    NombrePCA=f'PCA 1(var_exp[0].real)', f'PCA 2(var_exp[1].real)', f'PCA 3(var_exp[2].real)'
    listaPCA=lista[:,j].real
    nombre=NombrePCA[j] # Busca un punto y crea una lista con las subpartes del string original
    Datos3[nombre]=listaPCA
print(Datos3)

frame=pd.DataFrame(data=Datos3)
frame.to_csv(direccion3, index=None, sep=' ', mode='a')

X=lista[:,0].real
Y=lista[:,1].real
Z=lista[:,2].real

colors = dict(mcolors.BASE_COLORS, **mcolors.CSS4_COLORS)
Color=[]
for color in colors.items():
    Color.append(color[0])

colo=['k', 'b', 'chartreuse', 'r', 'm', 'k']
marcas=['p', 's', 'o', 'o', '>', '>']

ListaValores=[4,13,7,11,14,4]
Clasificacion=['Funcionalizacion', 'Inmovilizacion', 'Biosensor FRPL con el 1er corte de cerebro', 'Biosensor FRPL con el
2do corte de cerebro', 'Control II', 'Control III']

s=0
ListaV=[0]
for l in ListaValores:
    s+=1
    ListaV.append(s)

ListaV
len(ListaV)

plt.figure(figsize=(8, 6))
for i in range(len(ListaV)-1):
    plt.scatter(X[ListaV[i]:ListaV[i+1]],Y[ListaV[i]:ListaV[i+1]], label=f'Clasificacion[i]', c=colo[i], marker=marcas[i],s=40);
plt.xlabel(f'PC1 (round(var_exp[0],3).real %)',fontSize=14);
plt.ylabel(f'PC2 (round(var_exp[1],3).real %)',fontSize=14);
plt.legend(fontsize=10);
plt.savefig(direccion1 + direccion2 + f'PC1vsPC2-Longitud_Inicial-Longitud_Final.pdf');
plt.grid();

plt.figure(figsize=(8, 6))
for i in range(len(ListaV)-1):
    plt.scatter(Y[ListaV[i]:ListaV[i+1]],Z[ListaV[i]:ListaV[i+1]], label=f'Clasificacion[i]', c=colo[i], marker=marcas[i],s=40);
plt.xlabel(f'PC2 (round(var_exp[1],3).real %)',fontSize=14);
plt.ylabel(f'PC3 (round(var_exp[2],3).real %)',fontSize=14);
plt.legend(fontsize=10);
plt.savefig(direccion1 + direccion2 + f'PC2vsPC3-Longitud_Inicial-Longitud_Final.pdf');

```

```

plt.grid();

# Graficas en 3D
fig = plt.figure(figsize=(8, 6))
ax = Axes3D(fig)

for i in range(len(ListaV)-1):
    ax.scatter(X[ListaV[i]:ListaV[i+1]],Y[ListaV[i]:ListaV[i+1]],Z[ListaV[i]:ListaV[i+1]], label=f'Clasificacion[i]', c=colo[i],marker=marcas[i],
s=40);

# metodos para rotular
ax.set_xlabel(f'PC1 (round(var_exp[0],3).real %)',fontsize=14)
ax.set_ylabel(f'PC2 (round(var_exp[1],3).real %)',fontsize=14)
ax.set_zlabel(f'PC3 (round(var_exp[2],3).real %)',fontsize=14)

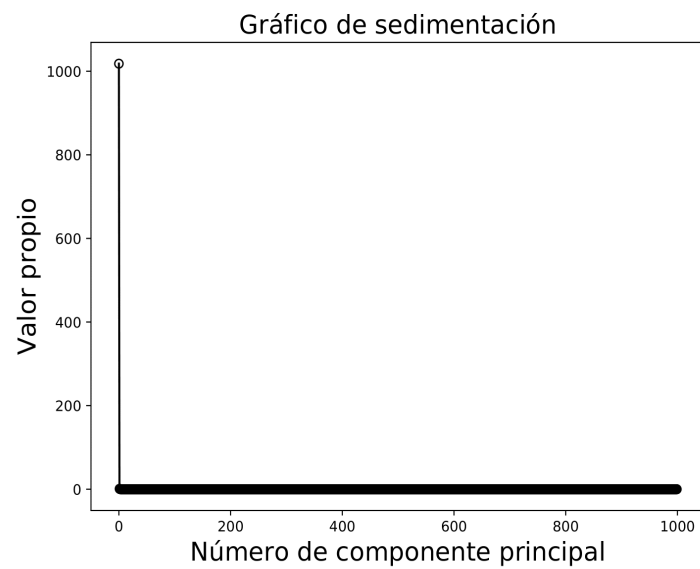
# metodo para configurar la vista
ax.view_init(20, 130)
plt.legend(loc='upper left',fontsize=9);
plt.savefig(direccion1 + direccion2 + f'PC1vsPC2vsPC3-Longitud_Inicial-Longitud_Final.pdf');
plt.show()

PCA(1525,1575)

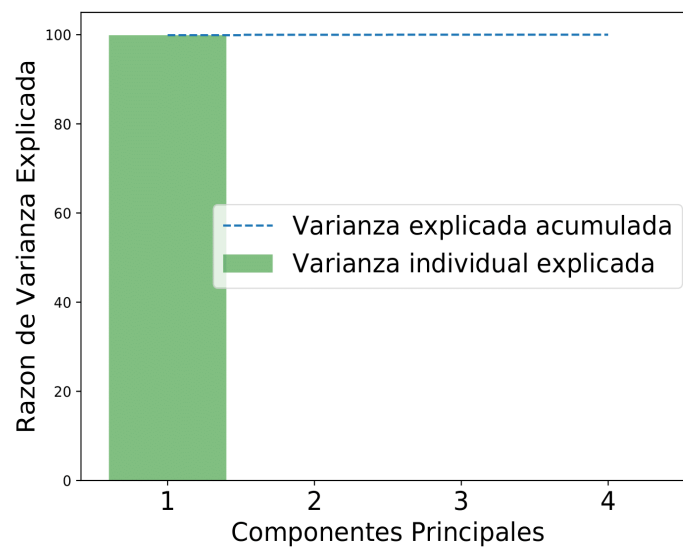
```


Apéndice C

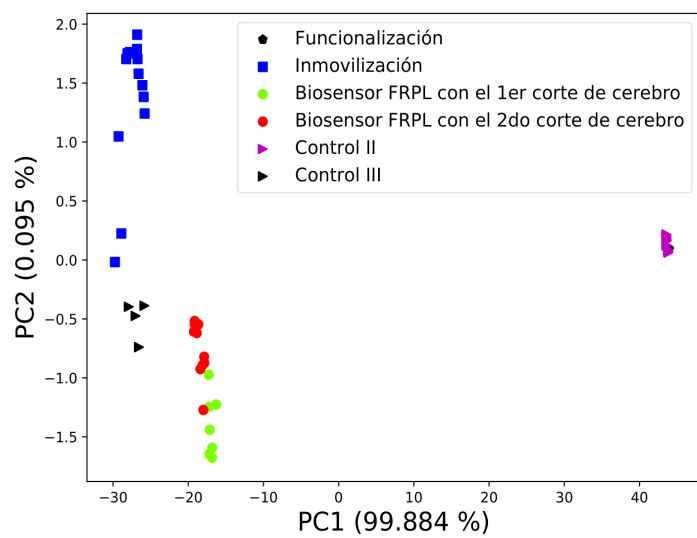
Graficas



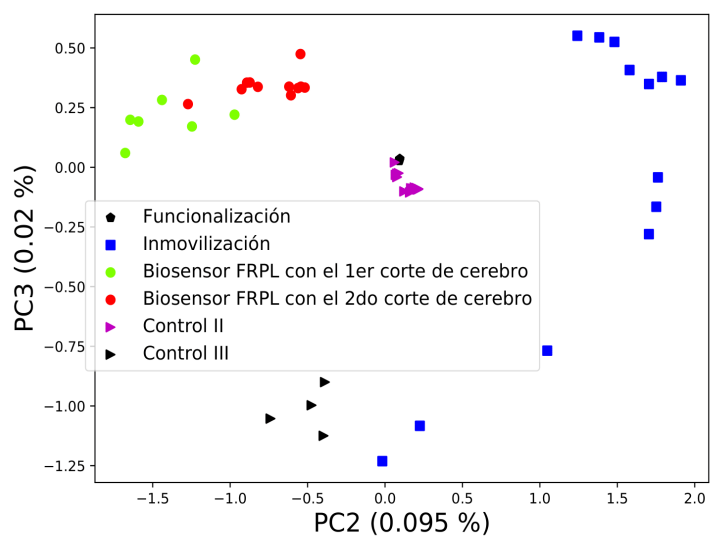
(a)



(b)



(c)



(d)

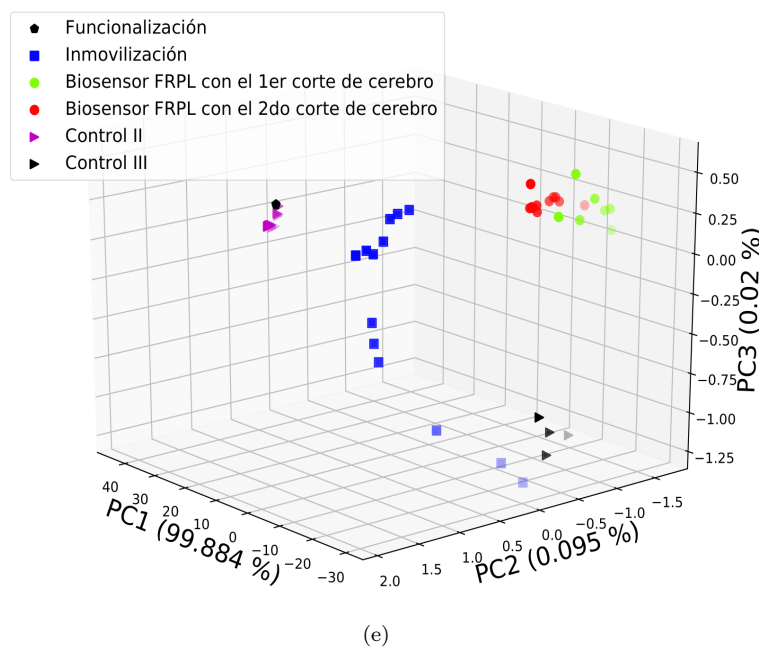


Figura C.1: Graficas obtenidas por el programa de análisis de componentes principales.

Apéndice D

Datos de PCA

Biosensor	Longitud de onda (<i>nm</i>)	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)
Biosensor FRPL 1	1500-1550	97.047	2.541	0.41
	1550-1600	99.486	0.448	0.064
	1500-1600	96.395	2.653	0.924
	1525-1575	97.731	1.902	0.366
	1464-1664	94.812	2.673	1.261
	1480-1600	96.308	2.515	1.097
Biosensor FRPL 2	1550-1600	96.796	3.009	0.191
	1464-1664	85.674	11.422	1.057
	1480-1620	83.776	14.457	1.181
Biosensor FRPL 3	1500-1600	93.348	5.863	0.7
	1525-1575	96.427	3.442	0.124
	1464-1664	90.818	7.247	1.136
	1480-1620	92.429	6.463	0.737
Biosensor FRPL 4	1500-1600	98.862	0.756	0.333
	1530-1580	99.699	0.204	0.095
	1464-1664	97.921	1.389	0.32
	1480-1620	98.693	0.832	0.344
Biosensor FRPL 5	1500-1600	54.359	28.169	9.903
	1520-1570	70.047	25.525	3.514
	1570-1620	57.816	40.930	1.128
	1464-1664	37.320	30.263	13.085
	1500-1620	47.586	28.318	17.395
Biosensor FRPL 6	1500-1550	99.010	0.078	0.001
	1550-1600	99.010	0.941	0.041
	1500-1600	98.804	0.906	0.241
	1464-1664	98.849	0.872	0.146
	1500-1600	98.803	0.906	0.241
Biosensor FRPL 7	1500-1550	99.863	0.101	0.035
	1550-1600	99.473	0.508	0.019
	1500-1600	99.633	0.282	0.061
	1525-1575	99.884	0.095	0.021
	1464-1664	96.658	3.147	0.142
	1500-1600	99.624	0.289	0.062
Biosensor FRPL 8	1500-1550	99.350	0.629	0.020
	1550-1600	99.547	0.356	0.097
	1500-1600	96.783	3.140	0.071
	1525-1575	97.128	2.861	0.011
	1464-1664	97.577	2.007	0.257
	1480-1600	97.232	2.677	0.060

Tabla D.1: Datos del análisis de componentes principales de los espectros de transmisión en las diferentes regiones de longitud de onda, con intervalos de medición de 0.05 (negro) y 0.2 (azul).

Apéndice E

Artículo Publicado



Experimental characterization of a biosensor based on a tapered optical fiber for kisspeptin detection

K. GONZÁLEZ-LEÓN,¹ G. BELTRÁN-PÉREZ,^{1,*} S. MUÑOZ-AGUIRRE,¹ V. LÓPEZ -GAYOU,² J. CASTILLO-MIXCOATL,¹ V. ALATRISTE,³ AND R. DELGADO-MACUIL²

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Puebla, Avenida San Claudio y 18 Sur, Col. San Manuel CU Puebla 72570, Mexico
²Centro de Investigaciones en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda de San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla km 1.5, Tepetitla, Tlaxcala 90700, Mexico
³Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Puebla, Avenida San Claudio y 14 Sur, Col. San Manuel CU Puebla 72570, Mexico
*Corresponding author: gbeltran@cfm.buap.mx

Received 15 November 2019; revised 21 January 2020; accepted 21 January 2020; posted 11 February 2020 (Doc. ID 383487); published 0 MONTH 0000

This paper presents the development of a biosensor based on optical fiber, using a polyclonal antibody kisspeptin receptor as a biological recognition element that is connected to puberty onset and may also help to suppress metastasis in melanoma breast cancer. The fiber surface was chemically prepared to immobilize the antibody. The structural homogeneity of the biosensor, at each stage of the self-assembly, was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and by measurements of the transmission at the output of the biosensor. The morphological homogeneity analysis was performed by optical microscopy and scanning electron microscopy. The biosensor developed was checked to detect kisspeptin in brain tissues by spectral transmission using a superluminescent diode. The data were analyzed using principal components analysis. The interaction of the kisspeptin with its counterpart by means of the evolution of the transmission spectrum as a function of time was observed. © 2020 Optical Society of America

<https://doi.org/10.1364/AO.383487>

1. INTRODUCTION

In the last few years, materials researchers have made a great effort to develop new fabrication strategies by exploiting the matter auto-organization phenomenon, which has not been widely applied to biosensors in optical fibers (OFs). Such a phenomenon has the potential to be exploited in the fabrication of future OF devices [1–4]. The synergy between OF technology and self-assembly processes is relatively recent. Many self-assembly processes were initially conceived and developed on different OF platforms: D-fibers, photonic crystal fibers, or simple glass capillaries [5]. However, the first systematic research studies to engineer self-assembly processes on the OF were carried out only in recent years [2]. In such research studies, the assessment of the fabrication process goes beyond the simple proof of principle, but it is pushed to attain specific recipes for various structures with different geometrical features. The self-assembly techniques and methodologies adopted are so varied that it is difficult and sometimes misleading to make a direct comparison in terms of performance or fabrication

ability [5–9]. Moreover, the biosensors based on the OF have been very attractive for many applications, since these present many advantages; particularly, we can mention that they are very useful in the optogenetics field [10,11]. As is well known, optogenetics allows controlling and manipulating the response of genes through a light stimulus, so that optrodes made by OF have been widely used as tools in brain cells [5,12]. Therefore, we believe that the development of biosensors based on OF will be an excellent option in this research field. On the other hand, the biosensors that use antibodies or proteins as a biological recognition element (BRE) have high affinity and specificity to detect the substances of interest, i.e., they have the ability to recognize a particular type of compound in a mixture of various elements [11,13].

For the assembly process, it is important to know that proteins are constituted by the association of several amino acids placed in a linear chain. They contain at least one alpha carboxyl group (-COOH) and one alpha amino group (-NH₂). The amino acids are linked together by peptide bonds, joined by means of covalent bonds at the amino end to that of carboxyl of



Figura E.1: DOI: 10.1364/AO.383487

Optics & Laser Technology 139 (2021) 106972

Contents lists available at ScienceDirect

Optics and Laser Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/optlastec

Review

Neurospins (Opn5) detection in the brain tissue of a murine model using long period fiber grating (LPFG)

R. Delgado-Macuil^a, K. González-León^b, G. Beltrán-Pérez^{b,*}

^a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda de San Juan Molino, Carretera Estatal Toluca-Mexico-Tepetlala Am 1.5, Tepetlala, Tlaxcala 90700, Mexico

^b Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Avenida San Claudio y 18 Sur, Col. San Manuel, C.U., C.P. 72570, Puebla, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
 Biosensor
 Long period fiber grating
 Opn5 detection
 Self-assembly
 Biological recognition element
 Structural and microscopic characterization

ABSTRACT

This paper presents the development of a biosensor based on long period fiber grating, using a polyclonal antibody (OPN5) as a biological recognition element, which enables the detection of opsin (Opn5) in the brain tissue of a murine model with high specificity. Opsin (Opn5) is overexpressed in brain, ovarian, breast and prostate carcinomas and it may function as an important new biomarker to diagnose and monitor several types of cancer. In this study, the fiber surface was chemically prepared for antibody immobilization. The structural homogeneity of the biosensor was characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy at each stage of the self-assembling process, and the response changes were measured by a signal transmission at the biosensor output. The biosensor developed was tested to detect Opn5 in brain tissue, and the interaction of Opn5 was observed through the evolution of the transmission spectrum in real time. Finally, the transmission data were analyzed by a principal component analysis (PCA).

1. Introduction

Neurospins is a protease recently discovered as a vertebrate photosensitive pigment expressed by the gene *Opn5* [1–3]. This gene is part of a new subgroup of rhodopsins, which shares only a small portion of a sequence with other types of opsins. Since it plays an important role in neural activity and embryonic cell differentiation, this gene may be predominantly detected in spinal cord, eye, skin, brain and neuronal tissues [4,5]. Numerous studies have shown that neurospins, particularly opsin (Opn5), are overexpressed in ovarian, breast and prostate carcinomas, and that some of them may even be important new biomarkers to diagnose and monitor several types of cancer [6–9]. In 2018, Eickelbeck et al. [10] showed how an optogenetic toolbox may help to control genetic expression with light-activated microbial ion channels, ion pumps and G protein-coupled receptors (GPCRs). Furthermore, optogenetics combines the use of light-sensitive proteins with genetic targeting strategies [11–13]. As an example, optrodes use optical fiber to manipulate genetic expression by light stimulation. In this context, optical fiber biosensors have gained considerable attention over the last years by focusing on LPFG for numerous applications. In addition, these biosensors have the potential ability of *in situ*, real time and remote sensing without the need of handling the substance under examination, and they can easily be multiplexed for multipoint sensing [14]. Thus, biosensors based on long-period fiber gratings (LPFG) may act as optrodes and protein detection devices expressed by the gene response to light irradiation.

An LPFG is a periodical modulation of the core and cladding refractive index of an optical fiber. When the refractive index of the surrounding medium changes, the effective refractive index of the cladding is also modified, leading to a shift or attenuation in the central band. Conversely, biomolecular interactions that take place around the surface of a transducer remain confined within the layers of finite thickness. Therefore, an LPFG plays an important role in physical, chemical and biological detection [15,16].

Additionally, an LPFG has the ability to couple the optical modes of the fiber core with the cladding and to produce one or more attenuation bands in the fiber transmission [17], centered at λ_m wavelengths described by Equation (1).

$$\lambda_m = [n_{co} - n_{cl}^2]^{\frac{1}{2}} \Lambda \quad (1)$$

where λ_m is the wavelength peak that is coupled into the cladding

* Corresponding author.
 E-mail address: gbeltran@cfm.buap.mx (G. Beltrán-Pérez).

<https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2021.106972>

Received 15 August 2020; Received in revised form 22 January 2021; Accepted 28 January 2021

0030-3992/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Figura E.2: DOI: 10.1016/j.optlastec.2021.106972

Bibliografía

- [1] Eduardo Torres Ramírez and Alia Méndez Albores. Biosensores enzimáticos. Revista Digital Universitaria, 15(11):1-8, 11 2014.
- [2] Shikha Sharma, Hannah Byrne, and Richard J. O’Kennedy. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. Essays in biochemistry, 60(1):9-18, 2016.
- [3] David R. Walt. Fiber optic array biosensors. BioTechniques, 41:529, 531, 533, 12 2006.
- [4] Wang Xu-dong and Otto Wolfbeis. Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2015-2019). Analytical Chemistry, 2019:1-51, 10 2019.
- [5] Francisco López Huerta, Georgina Beltrán Perez, , and Rodolfo Palomino Merino. Fiber optic sensors for the ph measurement based on the absorption of the evanescent wave. Optics InfoBase Conference Papers, 10 2005.
- [6] Francesco Galeotti, M. Pisco, and Andrea Cusano. Self-assembly on optical fibers: A powerful nanofabrication tool for next generation "lab-on-fiber" optrodes. Nanoscale, 10:22673-22696, 11 2018.
- [7] Raul N. Ondarza. Biología Moderna. Trillas, 12a edition, 2017.
- [8] C. Shimizu-Okabe, G. M. Yousef, E. P. Diamandis, S. Yoshida, S. Shiosaka, and M. Fahnstock. Expression of the kallikrein gene family in normal and alzheimer’s disease brain. Neuroreport, 12(12):2747-2751, 2001.
- [9] Kinga Bobińska, Joanna Mossakowska-Wójcik, Janusz Szemraj, Piotr Gałęcki, Marlena Zajączkowska, and Monika Talarowska. Human neuropsin gene in depression. Psychiatria Danubina, 29(2):195-200, 2017.
- [10] Tadaaki Kishi, Linda Grass, Antoninus Soosaipillai, Andreas Scorilas, Nadia Harbeck, Barbara Schmalfeldt, Julia Dorn, Michal Mysliwiec, Manfred Schmitt, and Eleftherios P. Diamandis. Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. Cancer Research, 63(11):2771-2774, 2003.
- [11] Hiromu Yawo, Hideki Kandori, and Amane Koizumi. History and Perspectives of Light-Sensing Proteins, pages 3-16. Springer Japan, Tokyo, 2015.
- [12] Dennis Eickelbeck, Raziye Karapinar, Stefan Herlitze, and Katharina Spoida. Optogenetic approaches for controlling neuronal activity and plasticity. In Denise Manahan-Vaughan, editor, Handbook of in Vivo Neural Plasticity Techniques, volume 28 of Handbook of Behavioral Neuroscience, pages 285-310. Elsevier, Amsterdam, 2018.
- [13] Amna Ahmad, Muhammad Rizwan Javed, Muhammad Ibrahim, Arfaa Sajid, Khadim Hussain, Muhammad Kaleem, Hafiza Mubasher Fatima, and Habibullah Nadeem. Methods of Enzyme Immobilization on Various Supports, pages 1-28. Materials Research Forum: Millersville, 2019.

- [14] Sarada Idris, Nur Hidayah Azeman, Noor Azwen Noor Azmy, Chantara Theyy Ratnam, Mohd Adzir Mahdi, and Ahmad Ashrif A. Bakar. Gamma irradiated py/pva for gox immobilization on tapered optical fiber for glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 273:1404 – 1412, 2018.
- [15] J.M. Corres, I.R. Matias, J. Bravo, and F.J. Arregui. Tapered optical fiber biosensor for the detection of anti-gliadin antibodies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(1):166 – 171, 2008.
- [16] A.B. Socorro-Lerános, D. Santano, I. Del Villar, and I.R. Matias. Trends in the design of wavelength-based optical fibre biosensors (2008–2018). *Biosensors and Bioelectronics: X*, 1:100015, 2019.
- [17] Kay M. Tye and Karl Deisseroth. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4):251–266, 2012.
- [18] Cristian Miguel Ortiz-Vilchis. Modelos experimentales en optogenética y su aplicación en enfermedades neurodegenerativas motoras. *Medicina e Investigación*, 3(2):162–168, 2015.
- [19] Hideki Kandori. History and perspectives of light-sensing proteins. In Hiromu Yawo, Hideki Kandori, and Amane Koizumi, editors, *Optogenetics*, pages 3–16. Springer, Tokyo, 2015.
- [20] Sankhyabrata Bandyopadhyay, Palas Biswas, Francesco Chiavaioli, Tanoy Kumar Dey, Nandini Basumallick, Cosimo Trono, Ambra Giannetti, Sara Tombelli, Francesco Baldini, and Somnath Bandyopadhyay. Long-period fiber grating: a specific design for biosensing applications. *Applied Optics*, 56(35):9846–9853, 2017.
- [21] Jaw-Luen Tang and Jien-Neng Wang. Chemical sensing sensitivity of long-period grating sensor enhanced by colloidal gold nanoparticles. *Sensors*, 8(1):171–184, 2008.
- [22] Helen R. Kirby, Janet J. Maguire, William Henry Colledge, and Anthony P. Davenport. International union of basic and clinical pharmacology. lxxvii. kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacological reviews*, 62(4):565–78, 12 2010.
- [23] Takahiro Yamashita, Hideyo Ohuchi, Sayuri Tomonari, Keiko Ikeda, Kazumi Sakai, and Yoshinori Shichida. Opn5 is a uv-sensitive bistable pigment that couples with gi subtype of g protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51):22084–22089, 2010.
- [24] Thomas P. Sakmar and T. Huber. Rhodopsin. In Larry R. Squire, editor, *Encyclopedia of Neuroscience*, pages 365–372. Academic Press, Oxford, 2009.
- [25] T. H. Oakley and D. C. Plachetzki. The evolution of opsins. In Darlene A. Dartt, editor, *Encyclopedia of the Eye*, pages 82–88. Academic Press, Oxford, 2010.
- [26] Emma E. Tarttelin, James Bellingham, Mark W. Hankins, Russell G. Foster, and Robert J. Lucas. Neuropsin (opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS letters*, 554(3):410–416, 2003.
- [27] Sadao Shiosaka and Yasuyuki Ishikawa. Neuropsin—a possible modulator of synaptic plasticity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(1):24–29, 2011.
- [28] Panteleimon Kountourakis, Amanda Psyrris, Andreas Scorilas, Sonia Markakis, Diane Kowalski, Robert L. Camp, Eleftherios P. Diamandis, and Meletios A. Dimopoulos. Expression and prognostic significance of kallikrein-related peptidase 8 protein levels in advanced ovarian cancer by using automated quantitative analysis. *Thrombosis and haemostasis*, 101(03):541–546, 2009.
- [29] Azza Eissa and Eleftherios P. Diamandis. Kallikrein-related peptidase 8. In Neil D. Rawlings and Guy Salvesen, editors, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, pages 2792–2798. Academic Press, third edition, 2013.

- [30] Chris Planque, Yun-Hee Choi, Serge Guyétant, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Laurent Briollais, and Yves Courty. Alternative splicing variant of kallikrein-related peptidase 8 as an independent predictor of unfavorable prognosis in lung cancer. Clinical chemistry, 56(6):987–997, 2010.
- [31] Stephen W. James, Serhiy Korposh, Seung-Woo Lee, and Ralph P. Tatam. A long period grating-based chemical sensor insensitive to the influence of interfering parameters. Optics Express, 22(7):8012–8023, 2014.
- [32] Lindsay I. Smith. A tutorial on principal components analysis. Technical report, Cornell University, USA, February 26 2002.
- [33] Jonathon Shlens. A tutorial on principal component analysis. CoRR, abs/1404.1100, 2014.
- [34] Stanley I. Grossman S. Álgebra Lineal. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., sexta edition, 2008.