



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN
BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA
DETECCIÓN DE PROTEÍNA
INTERLEUCINA-10 (IL-10)**

TESIS PRESENTADA AL

COLEGIO DE FÍSICA

COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE

LICENCIADO EN FÍSICA

POR

DANIELA KAREN REYES RIVERA

ASESORADA POR

**DRA. GEORGINA BELTRÁN PÉREZ (FCFM-BUAP)
DR. RAÚL JACOBO DELGADO MACUIL (CIBA-IPN)**



Puebla, Pue.
Febrero 2024

A Paola, mi madre...

"My star, it will be for you one of the stars.
So, all the stars, you will love to look at them...
They will be all your friends. And then I'll give you a present...
When you look at the sky at night, since I will live in one of them,
since I will laugh in one of them, then it will be for you
as if all the stars were laughing..."

Agradecimientos

Quiero agradecer a las personas que me apoyaron para concluir este trabajo de tesis y así culminar un escalón más de mi carrera profesional.

Agradezco a:

- Mi asesora, la Dra. Georgina Beltrán. Por compartir sus conocimientos conmigo, por siempre tener un trato amable hacia mi persona desde el momento en que comencé a hacer mi servicio social hasta la culminación de este trabajo y también por acercarme un poco más a la Óptica.
- Mi asesor, el Dr. Raúl Delgado. Por su apoyo y explicaciones durante el trabajo en el laboratorio del CIBA, por los muchos seminarios que me impartió y por llevarme múltiples veces en su coche así como por sus consejos sobre estudiar Óptica.
- Mi compañera y amiga, Karina González. Por todo tu apoyo al guiarme durante el proceso de experimentación y posterior análisis. Sin duda el tiempo en el laboratorio fue más divertido al compartirlo contigo.
- A la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la BUAP, por albergarme durante los años de mi licenciatura, dándome lo necesario para realizar mis estudios y brindarme los mejores recuerdos de esta etapa.

Dedicatoria

Esta tesis así como todo el tiempo y esfuerzo invertido se lo dedico en especial a:

- Mi madre, Paola Rivera. Aunque el tiempo no me alcanzó para que pudieras verme cumplir esta meta, llevo tu recuerdo en mi corazón en cada paso que doy. Siempre te amaré, espero el día en que podamos encontrarnos de nuevo.
- Mi esposo Eduardo Valadez, por todos los momentos a tu lado que atesoro, por tu compañía y apoyo en esta locura de ser *científica*. Por tu tenacidad y perseverancia frente a todos los obstáculos a lo largo de los años; tu inigualable amor ha sido el impulso que necesitaba en mi vida para soñar en grande y nunca desistir, te amo.
- Los hombres de mi vida, mi padre Vicente Reyes y mi hermano Cristian Reyes. Por ser y estar en mi vida siempre, porque a pesar de perder a mamá seguimos aquí, juntos. Los amo con todo mi corazón y siempre los llevo en mi mente. Recuerden que los pequeños y grandes logros por los que trabajo y me esfuerzo cada día son para ustedes.
- Mis abuelos Estelita y Chentito, por su apoyo, amor, consejos, tiempo, compañía, paciencia y café que me cobijan el cuerpo y el corazón. Así como a mis tías, tíos, primas y primos por sus risas, fiestas y amor hacia mí.
- Mis mejores amigos Yoltic Cruz y Ricardo López, por su cariño e invaluable compañía.
- Mis mentores y queridos amigos que a lo largo del tiempo me han ayudado, al Mtro. Manuel Basurto, la Profesora Alejandra Coronel, el Dr. Eduardo Mendoza y en especial al Dr. Gerardo Torres del Castillo, gracias por todo el apoyo y todas las oportunidades.

Resumen

En el presente trabajo de tesis se propone desarrollar un biosensor con una rejilla de periodo largo (RPL) en fibra óptica (FO) para la detección de la proteína Interleucina-10 (IL-10), citocina conocida como regulador antiinflamatorio con un potencial terapéutico en diversos entornos clínicos. Como elemento de reconocimiento biológico (ERB) de alta especificidad se utiliza el anticuerpo policlonal receptor de IL-10, el cual detecta particularmente a la proteína IL-10 presente en el plasma sanguíneo del modelo murino, al cual se le induce un cuadro de isquemia cerebral. Cada biosensor es caracterizado mediante microscopía óptica y espectros de transmisión a los que se les realiza Análisis de Componentes Principales, además, para verificar la alta especificidad del ERB se usaron otros analitos como el estándar de proteína IL-10, Anticuerpo Kisspeptina, control OPN-5 y Proteinasa-K, las cuáles sirven como muestras de control.

Índice general

Agradecimientos	II
Dedicatoria	III
Resumen	IV
Introducción	1
0.1 Objetivo general	3
0.2 Objetivo específico y metas	3
1 Teoría	4
1.1 Biosensores	4
1.1.1 Biosensores con Fibra Óptica	5
1.1.2 Interleucina 10 (IL-10)	6
1.2 Fibras ópticas	8
1.2.1 Ecuaciones de guía de onda en fibras con índice de refracción escalonado	12
1.3 Fibra con rejilla de periodo largo	14
1.3.1 Acoplamiento de modos en fibra con rejillas	16
1.3.2 Métodos de grabado de Rejillas de Periodo Largo	17
1.3.3 Sensado usando Fibras con Rejilla de Periodo Largo	19
2 Metodología	21
2.1 Materiales	21
2.2 Grabado de la RPL	22
2.3 Autoensamblado del biosensor	23

2.3.1	Hidroxilación	24
2.3.2	Funcionalización	24
2.3.3	Activación	25
2.3.4	Inmovilización	26
2.4	Suero sanguíneo	27
2.5	Detección	29
2.6	Caracterización del autoensamblado del biosensor	31
2.6.1	Microscopía óptica	31
2.6.2	Análisis de Transmisión	32
2.6.3	Análisis de componentes principales	33
3	Resultados: Biosensores de FRPL	34
3.1	Imágenes de microscopía	35
3.2	Espectros de transmisión	38
3.2.1	Estándar IL-10 y sueros sanguíneos	38
3.2.2	Controles	40
3.3	Análisis de componentes principales	42
3.3.1	Comportamiento en función del tiempo	46
3.3.2	Selectividad	49
4	Conclusiones Generales	52
	Bibliografía	59
	Apéndice	60
4.1	Benzoato de Estradiol y su efecto neuroprotector.	60
4.2	Espectros de Transmisión	62
4.3	Análisis de componentes principales	66
4.4	Costos de cada etapa de fabricación	71

Índice de figuras

1.1	<i>Descripción gráfica de un biosensor.</i>	4
1.2	<i>Estructura básica de una fibra óptica.</i>	8
1.3	<i>Perfiles de índice de una fibra monomodo, multimodo y multimodo de índice gradual.</i>	9
1.4	<i>Propagación de un haz incidente en el núcleo de la fibra a diferentes ángulos.</i>	10
1.5	<i>Bessel de primera clase, orden ν y Bessel Modificada de segunda clase, orden ν.</i>	14
1.6	<i>Esquema de una Fibra con Rejilla de Periodo Largo (FRPL).</i>	15
1.7	<i>Atenuación y guiado de la luz en las FRPL.</i>	16
2.1	<i>Empalmadora y actuador con fibra óptica.</i>	23
2.2	<i>Esquema del grabado de RPL en fibra óptica.</i>	23
2.3	<i>Esquema de las fases del proceso experimental (autoensamblado).</i>	24
2.4	<i>Etapas de activación.</i>	25
2.5	<i>Etapas de inmovilización.</i>	27
2.6	<i>Protocolo de inducción de Isquemia Cerebral Global Aguda (ICGA).</i>	29
2.7	<i>Arreglo experimental para la caracterización del biosensor.</i>	32
3.1	<i>Imágenes de microscopía: a) fibra sin revestimiento, b) FRPL, c) FRPL hidroxilada y d) FRPL Funcionalizada.</i>	35
3.2	<i>Imágenes de microscopía a) Biosensor 1, b) Biosensor 2, c) Biosensor 3, d) Biosensor 4.</i>	36
3.3	<i>Imágenes de microscopía a) Biosensor 5, b) Biosensor 6, c) Biosensor 7, d) Biosensor 8.</i>	37
3.4	<i>Espectros de transmisión a) Biosensor 1, b) Biosensor 2, c) Biosensor 3, d) Biosensor 4.</i>	38
3.5	<i>Espectros de transmisión a) Biosensor 5, b) Biosensor 6, c) Biosensor 7, d) Biosensor 8.</i>	40
3.6	<i>PC 1 contra PC 2 de: a) Biosensor 1, b) Biosensor 2, c) Biosensor 3, d) Biosensor 4.</i>	43
3.7	<i>PC 1 contra PC 2 de: a) Biosensor 5, b) Biosensor 6, c) Biosensor 7, d) Biosensor 8.</i>	44

3.8	<i>PC 1 contra PC 2 de inmovilización y detección de los Biosensores: a) 1, b) 2, c) 3 y d) 4.</i>	46
3.9	<i>PC 1 contra PC 2 de inmovilización y detección de los Biosensores: a) 5, b) 6, c) 7 y d) 8.</i>	47
3.10	<i>PCA detección de biosensor 2 y biosensor 3.</i>	48
3.11	<i>PCA de la detección de STD-IL-10 y sueros sanguíneos.</i>	49
3.12	<i>PCA de la detección de STD-IL-10 y controles.</i>	50
4.1	<i>Fotomicrografías de la población neuronal del segmento CA1 del hipocampo[40].</i>	61
4.2	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 1, estándar de IL-10.</i>	62
4.3	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 2, suero de 2 hrs con tratamiento.</i>	63
4.4	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 3, suero de 2 hrs sin tratamiento.</i>	63
4.5	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 4, suero de 6 hrs sin tratamiento.</i>	64
4.6	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 5, suero T=0 hrs.</i>	64
4.7	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 6, Anticuerpo Kisspeptina.</i>	65
4.8	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 7, Opsina OPN5.</i>	65
4.9	<i>Transmisión Normalizada de Biosensor 8, Proteínasa K.</i>	66
4.10	<i>CPA para biosensor 1, STD-IL-10.</i>	67
4.11	<i>CPA para biosensor 2, suero de 2 hrs con tratamiento.</i>	67
4.12	<i>CPA para biosensor 3, suero de 2 hrs sin tratamiento.</i>	68
4.13	<i>CPA para biosensor 4, suero de 6 hrs sin tratamiento.</i>	68
4.14	<i>CPA para biosensor 5, suero de T=0.</i>	69
4.15	<i>CPA para biosensor 6, Anticuerpo Kisspeptina.</i>	69
4.16	<i>CPA para biosensor 7, Opsina OPN 5.</i>	70
4.17	<i>CPA para biosensor 8, Proteínasa K.</i>	70

Índice de tablas

2.1	<i>Compuestos químicos utilizados en el autoensamblado de biosensores.</i>	22
3.1	<i>Biosensores y muestras.</i>	34
3.2	<i>Datos de componentes principales de los 8 biosensores.</i>	42
3.3	<i>Signo de agrupamiento del valor de PC para las figuras 3.6 y 3.7.</i>	45
4.1	<i>Costos de cada etapa para un biosensor.</i>	71

Introducción

Un biosensor puede ser definido como un dispositivo unitario que comprende un elemento de reconocimiento, biológicamente derivado y sensible, asociado a una respuesta química o física de un transductor [1, 2]. El elemento de reconocimiento biológico (ERB) de un biosensor puede ser enzimas, anticuerpos, organelos, tejidos o células completas que detectan compuestos químicos específicos generando una respuesta (reacción química) en el elemento transductor, el cual puede ser de tipo óptico, acústico, electroquímico, piezoeléctrico, magnético, calorimétrico o mecánico, los cuales nos proporcionan una señal que se mide con facilidad [3].

Recientemente, los sensores a base de fibra óptica (FO), se han convertido en una parte importante en la tecnología de sensado, su uso como pruebas o elementos de sensado se ha incrementado en aplicaciones clínicas, farmacéuticas, industriales y militares. Su capacidad para guiar la luz en un amplio rango espectral, la capacidad de interacción en un segmento largo de la superficie, su capacidad para excitar a las moléculas objetivo y como receptor de la interacción de la luz con el medio que la rodea o los objetivos son las principales ventajas del uso de estos sensores [1, 4–6].

Los biosensores ópticos fabricados con FO, se basan en el principio de la detección de la información recopilada por la onda evanescente que interactúa con el analito que está en contacto directo con la superficie de la guía de onda, esto se logra mediante un cambio en el coeficiente de extinción de la onda evanescente derivado del cambio del índice de refracción circundante a la superficie del sensor. Mientras que los sensores basados en rejillas de periodo largo (RPL) trabajan solo en transmisión y requieren de un periodo de modulación

mayor o igual a los 100 micrómetros, sus propiedades más importantes son que tienen baja reflectividad, menores pérdidas de la información (señal), ancho de banda mayor y una mayor sensibilidad a parámetros externos. El conjunto de estas características permite que se espere una mejor señal y mayor capacidad de sensado.

Además, el uso de proteínas o anticuerpos como ERB en sensores de FO ha reportado tener una alta especificidad para la detección de analitos particulares debido a su afinidad con los mismos [3], por ejemplo, el uso de anticuerpo policlonal OPN5 para la detección de la Opsina OPN-5 presente en el tejido de cerebro de modelo murino y la cual es un importante biomarcador en diferentes tipos de cáncer [7] o el uso del anticuerpo policlonal receptor de Kisspeptina para la detección de Kisspeptina expresada durante la pubertad y la cual podría estar relacionada con la supresión de la metástasis en el cáncer de mama [8].

Por otra parte, podemos mencionar que en el proceso isquémico cerebral se aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias, en las primeras horas de la inducción se liberan factores de necrosis tumoral, interleucinas y distintos tipos de interferón. Las concentraciones de citocinas también se elevan en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, de donde se ha demostrado concentraciones elevadas de IL-6 que se relacionan con el deterioro neurológico. Así mismo se han encontrado niveles bajos de IL-10 en pacientes con un mal pronóstico después del proceso isquémico y niveles altos de IL-10 en respuesta antiinflamatoria en procesos isquémicos de otros órganos, lo que concuerda con las múltiples conclusiones sobre la importancia y beneficios de la IL-10 en el organismo.

En el primer capítulo de este trabajo se abordará la teoría básica de los biosensores de FO con RPL, lo que incluye las ecuaciones de guía de onda, acoplamiento de modos en fibras con rejillas de periodo largo y el sensado usando las mismas. En el segundo capítulo se describe la metodología del autoensamblado del *biosensor* la cual comprende: 1) la construcción de la RPL, mediante grabado por arco eléctrico, 2) la preparación química de la superficie mediante la hidroxilación y funcionalización, 3) la activación grupos aminos de la superficie y la inmovilización del anticuerpo (receptor de IL-10) y finalmente la detección.

El tercer capítulo aborda la caracterización del biosensor mediante microscopía óptica y los espectros de transmisión obtenidos usando un analizador de espectros ópticos (OSA), en los que se puede observar la respuesta de los biosensores en función de la longitud de onda. Finalmente se analizan los espectros de transmisión mediante el análisis de componentes principales (PCA) utilizando el software OriginPro 2016, con lo que se puede discriminar entre las muestras de diferentes tiempos de inducción de la isquemia, con o sin tratamiento y, además, las muestras de control se agrupan en el plano negativo de PC1, mientras que la detección del estándar de IL-10 se agrupa en el plano positivo.

0.1. Objetivo general

Desarrollar un biosensor con anticuerpo policlonal de Interleucina 10 como elemento de reconocimiento biológico y como matriz soporte una rejilla de periodo largo construida en una fibra monomodo SMF-28 para aplicaciones en optogenética.

0.2. Objetivo específico y metas

1. Construcción de rejillas de periodo largo en segmentos de fibra óptica SMF-28.
2. Implementar la metodología del autoensamblaje del biosensor en fibras ópticas con rejillas de periodo largo.
3. Caracterizar la superficie del biosensor usando anticuerpo policlonal IL-10 comercial.
4. Caracterizar el biosensor de FO con RPL en cada una de las etapas del autoensamblado del biosensor.
5. Analizar la evolución temporal de la respuesta espectral del biosensor al interactuar con los analitos propuestos.
6. Con base en los resultados, determinar la respuesta positiva y la especificidad del biosensor al detectar la IL-10.

Capítulo 1

Teoría

1.1. Biosensores

Un biosensor se define como un dispositivo analítico de alta sensibilidad y selectividad que se conforma por un elemento de reconocimiento biológico, ERB por sus siglas, que interactúa o reacciona bioquímicamente con el analito, el cual proporciona información asociada a los cambios de las propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, etcétera, de un transductor, figura 1.1.

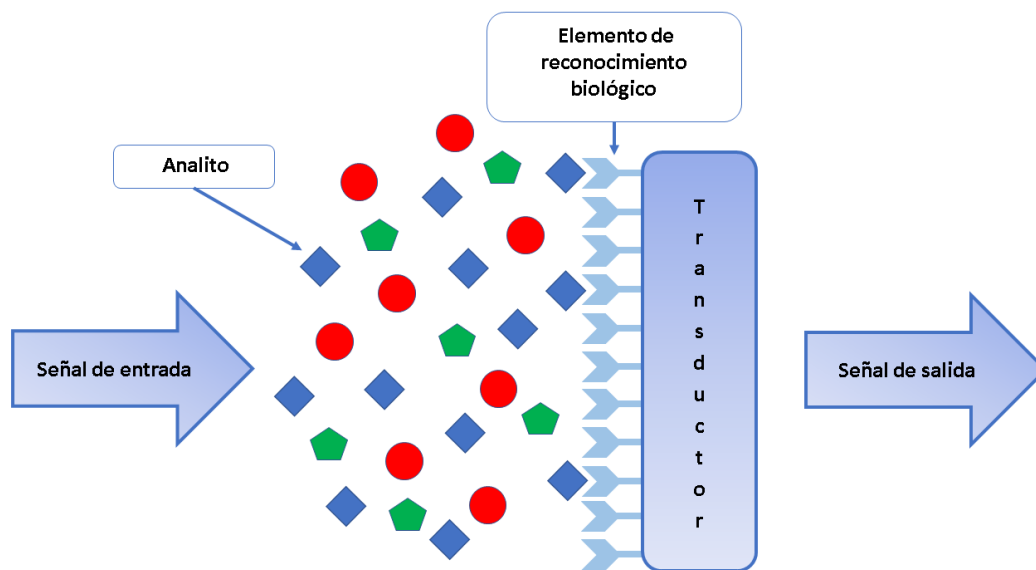


Figura 1.1: Descripción gráfica de un biosensor.

Los elementos de reconocimiento biológico comúnmente pueden ser células, tejido, receptores, ácido nucleico, enzimas, ribosomas, anticuerpos, nanopartículas, nanocompuestos, materiales inteligentes, compuestos biomiméticos como aptámeros (ácidos nucleicos de cadena sencilla), polímeros de microporosidad, sondas de ácidos nucleicos, entre otros. Además, la elección del ERB está determinada por las características fisicoquímicas del analito de interés [9], que es el compuesto o sustancia química que nos interesa detectar, los cuales pueden ser azúcares, aminoácidos, lípidos, alcoholes, entre otras.

Por otra parte, los transductores son sistemas que detectan la reacción bioquímica entre el ERB y el analito, luego la interpretan como cambios en la magnitud de las propiedades fisicoquímicas y las traduce como una señal eléctrica, térmica u óptica la cual puede ser cualitativa o cuantitativa. La señal obtenida es proporcional a la cantidad o concentración de la especie o especies químicas-biológicas que se desean detectar [10]. Los sistemas transductores son determinados por el tipo de ERB que se use, existiendo diversos tipos de transductor como lo son óptico, electroquímico, piezoeléctrico, mecánico y magnético.

1.1.1. Biosensores con Fibra Óptica

Los biosensores ópticos se distinguen por dos características importantes: la propagación de la luz por medio de una guía de onda, que generalmente es el propio transductor y el uso del campo evanescente como principio básico de detección. Cuando el índice de refracción sufre cambios de manera local en la región del campo evanescente también se generan cambios en el índice efectivo de propagación en los modos de la guía, por lo que el campo evanescente permite medir directamente la interacción biomolecular entre el transductor y el ERB que se encuentra fijado a su superficie. Además presentan ventajas adicionales como el bajo consumo de potencia, capacidad de miniaturización, bajo costo de fabricación e integración, detección en tiempo real, de forma directa y sin usar etiquetas (label free) [11,12].

En los últimos años los biosensores que usan fibra óptica (FO) como sistema transductor han tomado mucha importancia debido a su capacidad de detectar bajas concentraciones

de analito y de guiar luz a grandes distancias con mínimas pérdidas, además su tamaño, su flexibilidad y su baja o nula interferencia electromagnética. Todas estas características hacen que los optrodos que incorporan FO sean poderosas herramientas para la detección o medición *in-situ* o *in-vivo* de diversos parámetros químicos y biológicos del analito de interés.

Debido a que las interacciones biomoleculares analito-biosensor ocurren en capas de espesor finito y que en muchas ocasiones las diferencias entre los índices de refracción del medio externo y la cubierta de la FO son muy pequeñas, una técnica importante para aumentar la sensibilidad de los biosensores de FO es la utilización de rejillas de periodo largo (RPL), en las cuales los modos de transmisión de la cubierta y el núcleo se acoplan minimizando las pérdidas de señal y mejorando la sensibilidad a parámetros externos.

1.1.2. Interleucina 10 (IL-10)

Desde el punto de vista del analito, objeto de estudio de este trabajo, se sabe que las citocinas son proteínas cuya función primordial es controlar y regular el crecimiento y la actividad de otras células del sistema inmunitario y las células sanguíneas. En específico la citocina Interleucina 10 (IL-10) tiene un papel importante en la respuesta antiinflamatoria del sistema inmune y es producida por los linfocitos T de tipo Th2 con la capacidad de inhibir la síntesis de interleucinas proinflamatorias como el caso de la Interleucina 6 (IL-6).

Existen diversas enfermedades que producen procesos inflamatorios en el cuerpo, sin embargo el Infarto Cerebral (CI por sus siglas en inglés), que conduce al llamado *Accidente Cerebrovascular Isquémico* (ACI), es una de las principales causas de muerte con un estimado de seis millones de decesos registrados a nivel mundial por año y la cual es más propensa a padecer la población de la tercera edad. En el 2018, en específico, en México se registró un gran número de pacientes de Enfermedad Cerebro Vascular, que afecta los vasos sanguíneos del cerebro, la que ocasiona alrededor de 170 mil casos de ACI, lo que la sitúa como la primer causa de discapacidad adulta y la quinta causa de muerte en el país [13].

Los accidentes cerebrovasculares isquémicos se originan por la obstrucción aguda de alguna de las arterias principales que irrigan sangre al cerebro y los daños que ocasiona dependen de la duración o de la gravedad de la reducción del flujo sanguíneo [14]. La isquemia cerebral causa necrosis de tejido, daño neuronal y una respuesta inmuno-inflamatoria local inmediata, la que es poco entendida. Diversos estudios sugieren que ciertas citocinas modulan el proceso de daño neurológico, como es el caso de las Interleucinas 1, 2 y 6 [15,16].

Como el proceso inflamatorio y los ACI están estrechamente ligados, conocer la relación directa de los niveles de IL-10 en el cuerpo después de un proceso inflamatorio es de suma importancia ya que es considerada como una potencial citocina antiinflamatoria, cuya expresión incrementa significativamente en pacientes con recuperaciones favorables y a su vez niveles bajos de IL-10 aumentan el riesgo de un ACI, además de su utilidad como indicador de posibles daños secundarios en el organismo. La IL-10 aún es estudiada activamente con la finalidad de entender las diferentes vías biológicas en el desarrollo de un accidente cerebrovascular e identificar posibles dianas terapéuticas (lugar en el organismo en el que el fármaco ejerce su acción) para esta enfermedad [17,18].

Actualmente la IL-10 es detectada por diversas técnicas moleculares, como la técnica ELISA, la tinción, la fluorescencia o la fijación, sin embargo, estas técnicas muestran desventajas como: 1) Requieren gran experiencia en la implementación de la técnica por parte del personal capacitado, 2) Intervalos de tiempo largo para la identificación o detección, 3) Altos costos en el mercado, entre otras. El desarrollo de dispositivos enfocados en la detección selectiva de sustancias de interés que puedan ser usados in-vivo e in-situ a menores costos permitirá, por ejemplo, hacer la detección específica de IL-10, la cual puede tener un papel importante como mecanismo protector o en el progreso de enfermedades como los accidentes cerebrovasculares, entre ellos de tipo isquémico.

1.2. Fibras ópticas

La Fibra Óptica (FO) es un medio físico flexible y transparente que funciona como una guía de onda de simetría cilíndrica y que está fabricada comúnmente de Óxido de Silicio o vidrio. La FO está constituida por el *núcleo central* (conocido también como *core*) que tiene un índice de refracción n_1 y un diámetro de entre $9\mu m$ y hasta $70\mu m$ y por el que la onda de luz es guiada, el núcleo está embebido en una capa de recubrimiento llamada cubierta (o *cladding* en inglés) con un diámetro aproximado de $125\mu m$ y con índice de refracción n_2 el cual es menor a n_1 , figura 1.2.

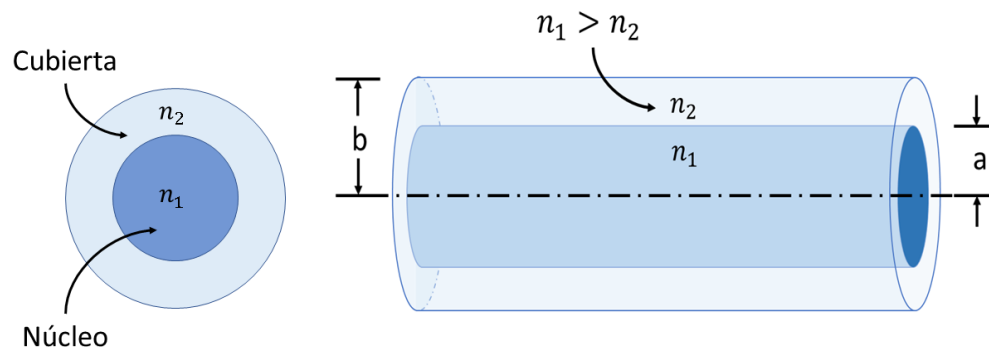


Figura 1.2: Estructura básica de una fibra óptica.

Los modos de propagación son cada una de las configuraciones que puede tener la onda electromagnética que viaja a través de la FO, de otra manera también se puede describir como la forma en que la intensidad de la luz es distribuida espacialmente dentro de la guía de onda.

La cantidad de modos de propagación en una FO dependen principalmente de algunos factores como el radio del núcleo, los índices de refracción de la cubierta y del núcleo, así como de la longitud de onda de la luz que es guiada por la FO. En especial, cuando el núcleo de la FO tiene un diámetro pequeño solo se tendrá un único modo de propagación por lo que se le llamará *fibra monomodo* y las fibras que tienen un diámetro de núcleo grande son conocidas como *fibras multimodo*.

El índice de refracción de la FO a lo largo de la dirección transversal se describe por perfiles de índice como se muestra en la figura 1.3. Además, cada modo dentro de la FO tiene una velocidad propia por lo que se experimenta un índice de refracción propio del modo, al que se le llama índice modal o efectivo [6].

Existen tres tipos de modos conocidos como *guiados*, *radiados* y *fugados*. Los modos guiados se encuentran confinados en el núcleo y pueden ser transmitidos por la FO. Los radiados no están confinados en el núcleo, están confinados en la cubierta y se atenúan rápidamente al salir del núcleo. Los fugados no están confinados en el núcleo ni en la cubierta.

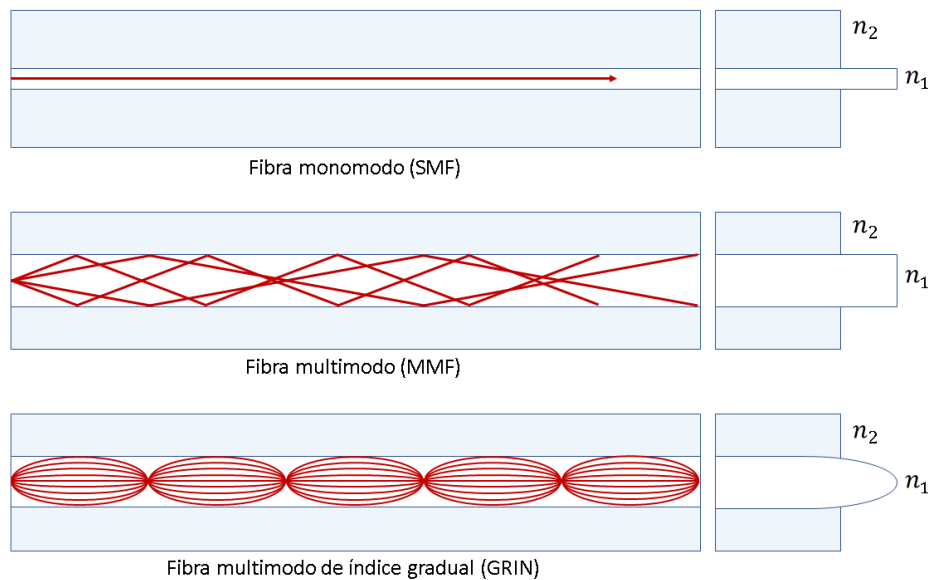


Figura 1.3: Perfiles de índice de una fibra monomodo, multimodo y multimodo de índice gradual.

Cuando un haz de luz que se propaga por un medio de índice de refracción n_0 incide sobre el núcleo de la fibra con un ángulo θ_0 respecto al eje de la FO, este haz viaja dentro del núcleo e incide directamente en la interfaz núcleo-cubierta con un ángulo ϕ con respecto a la normal donde es reflejado debido a la diferencia entre los índices de refracción (reflexión total interna).

Si el haz de luz incide en la interfaz a ángulos mayores que el llamado *ángulo crítico*

ϕ_c este será guiado por la FO y si el haz incide en la interfaz a ángulos menores que ϕ_c se produce refracción hacia la cubierta de la fibra perdiendo potencia en cada reflexión por lo que no hay propagación, ver la figura 1.4.

Solo existirán ciertos ángulos θ_0 de incidencia sobre el núcleo para los que el haz de luz será guiado, estos ángulos cumplen con la condición que $\theta_0 < \phi_c$ y están comprendidos dentro del llamado *cono de aceptación* [19].

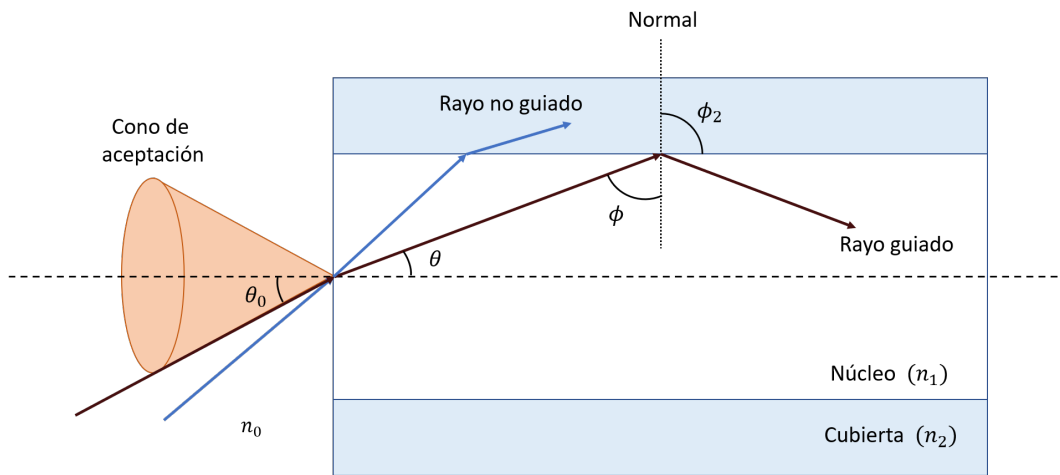


Figura 1.4: Propagación de un haz incidente en el núcleo de la fibra a diferentes ángulos.

Para conocer el ángulo del cono de aceptación primero se calcula el ángulo crítico ϕ_c a partir de la Ley de Snell. Considerando un haz que se propaga de un medio con índice de refracción n_1 a un medio de índice n_2 , con $n_1 > n_2$ se tiene que,

$$\sin \phi n_1 = \sin \phi_2 n_2 \quad (1.1)$$

En la interfase, compuesta por el núcleo y la cubierta, se producirá la reflexión total

interna cuando $\phi_2 = 90^\circ$. De lo anterior el ángulo crítico es $\phi = \phi_c$, por lo que

$$n_1 \sin \phi_c = n_2 \sin 90^\circ \quad (1.2)$$

$$\sin \phi_c = \frac{n_2}{n_1} \quad (1.3)$$

$$\phi_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad (1.4)$$

Para determinar el ángulo máximo en el que un haz puede incidir en la interfase del medio de índice n_0 y el núcleo de la fibra con n_1 , se aplica nuevamente la Ley de Snell y se considera que $\theta = 90 - \phi_c$, ver figura 1.4, por lo que partiendo de

$$n_0 \sin \theta_0 = n_1 \sin \theta \quad (1.5)$$

Se observa que

$$\begin{aligned} n_0 \sin \theta_0 &= n_1 \sin (90 - \phi_c) \\ &= n_1 (\sin 90 \cos \phi_c + \cos 90 \sin \phi_c) \\ &= n_1 \cos \phi_c \end{aligned} \quad (1.6)$$

Considerando que el haz incidente se propaga desde el aire con $n_0 = 1$, en la interfase aire-núcleo se nota que θ_0 corresponde al ángulo θ en el núcleo. El ángulo θ_0 se obtiene de acuerdo a

$$\begin{aligned} n_0 \sin \theta_0 &= (1) \sin \theta_0 = n_1 \cos \phi_c \\ &= n_1 \sqrt{1 - \sin^2 \phi_c} \end{aligned} \quad (1.7)$$

Usando la ecuación 1.3 y sustituyendo en el anterior resultado

$$\begin{aligned}
 \sin \theta_0 &= n_1 \sqrt{1 - \frac{n_2^2}{n_1^2}} \\
 &= n_1 \sqrt{\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2}} \\
 &= n_1 \sqrt{\frac{1}{n_1^2} \sqrt{n_1^2 - n_2^2}} \\
 &= \sqrt{n_1^2 - n_2^2}
 \end{aligned} \tag{1.8}$$

Por lo que el ángulo de aceptación de la fibra se denota por

$$\theta_0 = \sin^{-1} \sqrt{n_1^2 - n_2^2} = \sin^{-1} NA \tag{1.9}$$

de la cual $\sqrt{n_1^2 - n_2^2}$ es la apertura numérica (NA) que describe la capacidad de la fibra óptica para captar luz.

1.2.1. Ecuaciones de guía de onda en fibras con índice de refracción escalonado

En esta sección se examina la propagación de luz monocromática a través de fibras ópticas con índice de refracción escalonado [20]. Los campos eléctrico y magnético de la luz guiada satisfacen las ecuaciones de Maxwell y ciertas condiciones de frontera impuestas en el núcleo, de material dieléctrico, y la cubierta. Adicionalmente, cada uno de los componentes de los campos eléctrico y magnético deben satisfacer la ecuación de Helmholtz,

$$\nabla^2 U + n^2 k_0^2 U = 0 \tag{1.10}$$

donde $n = n_1$ en el núcleo ($r < a$), $n = n_2$ en la cubierta ($r > a$) y $k_0 = 2\pi/\lambda_0$. Al examinar la luz que es guiada en el núcleo y cerca de la frontera núcleo-cubierta, se hace la suposición de que el radio b de la cubierta es lo suficientemente grande como para asumir con seguridad

que es infinito. Usando el Laplaciano en coordenadas cilíndricas, la ecuación de Helmholtz es,

$$\frac{\partial^2 U}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial U}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 U = 0 \quad (1.11)$$

De la anterior ecuación, cualquiera de las componentes cartesianas de los campos eléctrico o magnético o las componentes axiales E_z y H_z , en coordenadas cilíndricas, es representada por la amplitud compleja $U = U(r, \phi, z)$.

Específicamente nos interesan soluciones con la forma de onda que *viaja* a lo largo de la dirección z con una constante de propagación β , por lo que la dependencia de U con respecto a z se expresa como $e^{-j\beta z}$, donde j es la unidad imaginaria. Además U debe ser una función periódica de dependencia armónica con respecto al ángulo ϕ , que tiene periodo 2π , por lo que dicha dependencia se puede expresar como $e^{-jl\phi}$, donde l es cualquier entero. Por lo que se tiene que

$$U(r, \phi, z) = u(r)e^{-jl\phi}e^{-j\beta z}, \quad l = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots \quad (1.12)$$

Sustituyendo la ecuación 1.12 en la ecuación 1.11 y resolviendo, se obtiene la ecuación diferencial ordinaria para $u(r)$,

$$\frac{d^2 u}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{du}{dr} + \left(n^2 k_0^2 - \beta^2 - \frac{l^2}{r^2} \right) u = 0 \quad (1.13)$$

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 la cubierta, $\beta > n_2 k_0$. Se definen

$$k_T^2 = n_1^2 k_0^2 - \beta^2 \quad (1.14)$$

$$\gamma^2 = \beta^2 - n_2^2 k_0^2 \quad (1.15)$$

Usando las ecuaciones 1.14 y 1.15, se puede reescribir la ecuación 1.13 para el núcleo y

la cubierta de la forma,

$$\frac{d^2u}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{du}{dr} + \left(k_T^2 - \frac{l^2}{r^2} \right) u = 0, \quad r < a \text{ (núcleo)} \quad (1.16)$$

$$\frac{d^2u}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{du}{dr} + \left(\gamma^2 - \frac{l^2}{r^2} \right) u = 0, \quad r > a \text{ (cubierta)} \quad (1.17)$$

Las ecuaciones 1.16 y 1.17 son ecuaciones diferenciales cuyas soluciones son la familia de las funciones Bessel, ver figura 1.5.

$$u(r) \propto \begin{cases} J_\nu(k_T r), & r \leq a \text{ (núcleo)} \\ K_\nu(k_T r), & r \geq a \text{ (cubierta)} \end{cases} \quad (1.18)$$

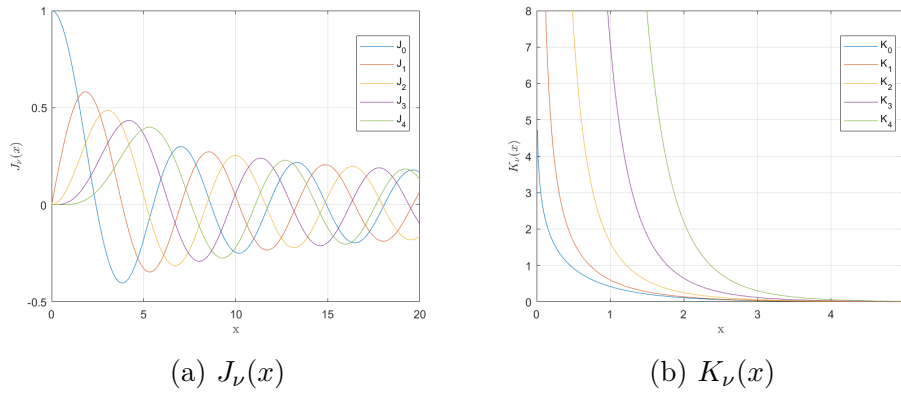


Figura 1.5: Bessel de primera clase, orden ν y Bessel Modificada de segunda clase, orden ν .

1.3. Fibra con rejilla de periodo largo

Las fibras con rejilla de periodo largo (FRPL) son un tipo de rejillas en fibra óptica que, de manera general, se pueden describir como estructuras periódicas adimensionales que funcionan como filtros selectivos en longitud de onda [6]. Las FRPL se crean al modular en forma periódica el índice de refracción del núcleo y de la cubierta de un tramo de la fibra óptica a lo largo de su eje longitudinal [2], y además de trabajar en transmisión requieren de un periodo de modulación $\Lambda \geq 100\mu m$, ver figura 1.6. Su funcionamiento consiste en que, cumpliéndose la condición de igualación de fases, ciertas bandas de la luz guiada dentro

del núcleo de la fibra acoplan energía a modos de la cubierta que se propagan en la misma dirección.

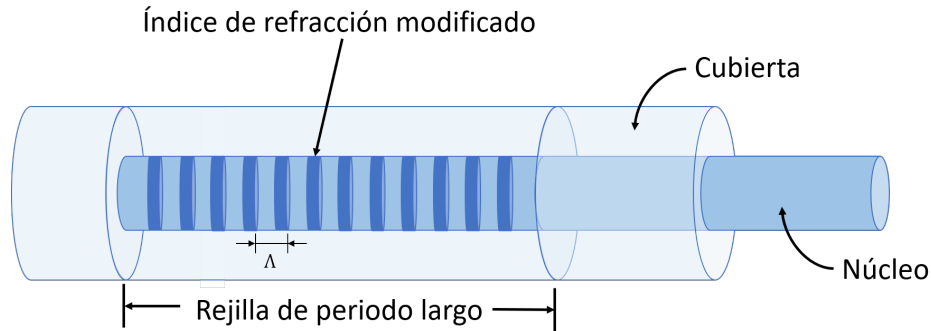


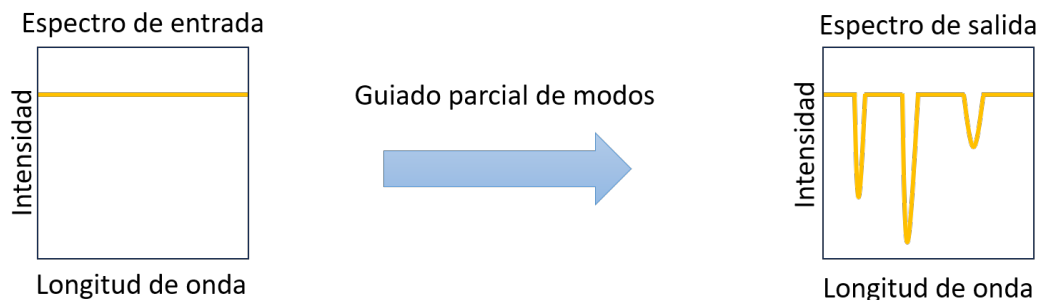
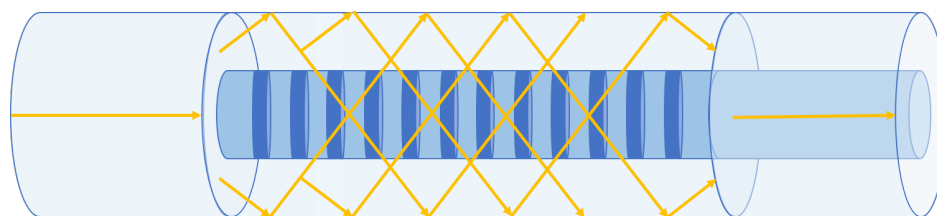
Figura 1.6: Esquema de una Fibra con Rejilla de Periodo Largo (FRPL).

Cuando la luz es transmitida a través de la RPL se observa que la señal de salida presenta una serie de bandas centradas en las longitudes de onda λ_x [21], ver figura 1.7a.

Cada una de dichas *bandas de atenuación* corresponderán a un modo de propagación de la cubierta, ver figura, la cual es multimodo, es decir permite el guiado parcial de varios modos, figura 1.7b. Las longitudes de onda λ_x se determinan de acuerdo a

$$\lambda_x = (n_{nucleo} - n_{cubierta(x)}) \cdot \Lambda \quad (1.19)$$

donde λ_x es la longitud de onda central que está acoplada en los modos de la cubierta, n_{nucleo} y $n_{cubierta(x)}$ son respectivamente los índices de refracción del núcleo y de la cubierta y Λ es el periodo de la rejilla. Conocer esta relación matemática es útil para diseñar una FRPL para su uso en biosensores ya que cuando cambia el índice de refracción del medio circundante, también se modifica el índice de refracción efectivo de la cubierta. Dichos cambios en el índice de refracción conllevan a un desplazamiento o atenuación de la banda central de la FRPL.

(a) *Bandas de atenuación en señal de FRPL.*(b) *Esquema de guiado de varios modos.**Figura 1.7: Atenuación y guiado de la luz en las FRPL.*

Otro aspecto importante es que cuando las FRPL son usadas en el diseño de biosensores, las interacciones moleculares entre el elemento de reconocimiento biológico y la fibra están confinadas en capas de espesor finito [22]. Comparando esto con el medio externo se observa que el dispositivo de sensado tiene mayor sensibilidad a cambios de índice de refracción externo relacionado con material que se adhiere superficialmente a la fibra (analito).

1.3.1. Acoplamiento de modos en fibra con rejillas

En general el acople de modos sucede cuando dos o más modos interactúan cediendo energía entre ellos. Particularmente, en una FO con rejilla se busca el acoplamiento de varios modos que son guiados. Para que ocurra este acople es necesario generar perturbaciones en la fibra, lo cual se produce al modular periódicamente el índice de refracción promoviendo una interacción resonante a cierta longitud de onda λ_x .

En las FRPL generalmente se dan interacciones modales copropagantes o contrapropagantes, es decir, se acoplan modos de la cubierta que viajan en la misma dirección o en dirección contraria que el modo fundamental del núcleo, respectivamente. Cuando sucede

este acoplamiento parte de la luz y de la energía que inicialmente se propagaba en el núcleo es transmitida a la cubierta en donde sufre absorción y esparcimiento por el material de la cubierta. Esta energía acoplada en la cubierta se pierde y no es transmitida.

La teoría de acoplamiento de modos nos dice que esta interacción solo sucederá si los modos del núcleo y la cubierta cumplen con la condición de ajuste de sus fases a una determinada longitud de onda y serán los únicos que podrán transferirse energía de forma eficiente [6]. A su vez la longitud de onda *resonante*, en transmisión, es determinada por el periodo de la rejilla o la magnitud de la separación entre los planos de la misma.

Si la perturbación en la fibra es homogénea, su periodo es siempre el mismo, los modos podrán interactuar y la condición de ajuste de fases se cumple [6, 23]. Dicha condición es

$$\beta_2 - \beta_1 = \frac{2\pi N}{\Lambda} \quad (1.20)$$

donde β_1 y β_2 son las constantes de propagación de los modos que se desean acoplar, N es un entero que indica el orden en el que ocurre la interacción intramodal. Las constantes de propagación de los modos se describe por

$$\beta_i = \frac{2\pi n_e^i}{\lambda} \quad (1.21)$$

siendo n_e^i el índice de refracción efectivo del i -ésimo modo y λ la longitud de onda en el vacío.

1.3.2. Métodos de grabado de Rejillas de Periodo Largo

Existen diversos métodos de fabricación de RPL los cuales, en combinación con diferentes tipos de fibra, pueden cambiar las propiedades ópticas y la *sensitividad* de las RPL a parámetros físicos como la temperatura, tensión, presión, índice de refracción efectivo, etc. Algunos de los métodos más comunes para grabar RPL en fibras ópticas consisten en *grabar*, *inscribir* o *crear* punto por punto la modulación del índice de refracción de la fibra. Entre dichos métodos se mencionan y destacan los siguientes:

1. **Fabricación por radiación UV:** Uno de los primeros métodos para la fabricación de RPL. En esta técnica se utiliza un láser UV que incide sobre la fibra óptica la cual está cubierta por una máscara u obturador que permite el paso de la radiación en cierto segmento de la fibra [24, 25]. La longitud mínima del periodo estará determinada en gran medida por el tamaño del haz del láser y la limitación espacial del obturador o la máscara.
2. **Inscripción por CO_2 :** Esta técnica, propuesta en 1998 [26, 27], es muy parecida al grabado por UV. Aquí una lente cilíndrica enfoca un haz de CO_2 sobre la fibra y no se utiliza obturador ya que la fibra y el láser se mueven de manera automatizada. Como la radiación de CO_2 es tan intensa se puede producir una modulación geométrica provocando que la fibra se estreche. Además el periodo de la modulación del índice de refracción depende de la mancha del láser y de la resolución en la que se mueve la fibra. Tienen mayores pérdidas por la modulación geométrica pero mayor resistencia a altas temperaturas ($< 1000\text{ }^\circ C$).
3. **Grabado por arco eléctrico:** En 1998 Kosinski et al. [28] proponen la técnica de grabado por arco eléctrico en fibra estándar usando una empalmadora de fusión comercial. Este método es similar al grabado con CO_2 ya que la fibra se coloca alineada sobre una montura mecánica que la mantiene perpendicular a los electrodos de la empalmadora. Como el sistema es motorizado el periodo siempre es el mismo y aunque el arco eléctrico también puede ocasionar deformaciones geométricas es más fácil controlar el estiramiento de la fibra para evitarlas.

Este método es de los más simples y económicos debido a que en los laboratorios de fibras se cuenta con empalmadoras comerciales, sin embargo, el periodo mínimo alcanzable es de $300\mu m$ pues la descarga afecta a una zona de ese tamaño aproximadamente. Además es difícil tener dos fibras con las mismas características ya que dependen de la potencia del arco y su tiempo de exposición.

Esta técnica de inscripción, a pesar de sus aparentes desventajas, resulta ser muy

versátil logrando que las rejillas se puedan sintonizar en un gran rango, usando casi cualquier tipo de fibra y mostrando características muy específicas.

En este trabajo se emplea el método de arco eléctrico en la fabricación de las FPRL por lo que se da una explicación más detallada en la sección 2.2.

1.3.3. Sensado usando Fibras con Rejilla de Periodo Largo

Las FRPL tuvieron sus primeras aplicaciones en el área de comunicaciones ópticas, en donde fueron usadas como filtros de rechazo de banda. Posteriormente fueron utilizadas como filtros de banda estrecha, filtros pasa bandas y filtros sintonizables a múltiples longitudes de onda. Además de lo anterior, en los últimos años han tenido aplicaciones muy interesantes en sistemas acopladores, filtros ecualizadores de ganancia, convertidores modales y en sistemas láser de fibra óptica lo que permite sintonizar la longitud de onda de emisión.

Si bien sus aplicaciones iniciales son interesantes, la mayor área de aplicación de las FRPL es el sensado de diversos parámetros físicos y químicos. Esta oportunidad de aplicación se debe a que las RPL son sensitivas al ángulo de doblamiento (bending), a la torsión (ϕ), a la presión (P), a la temperatura (T) y a cambios en el índice de refracción externo [29].

Recientemente las FRPL han tomado protagonismo en el área de sensado químico y biológico al presentar grandes particularidades en comparación con otros sistemas de sensado. Como se ha mencionado anteriormente, su tamaño compacto, poco peso, gran compatibilidad con sistemas optoelectrónicos, su capacidad de multiplexado y su capacidad de medición remota, entre otras, les otorga una gran ventaja. Como lo mencionan muchos autores, una de sus características más importantes es el uso del cambio de las propiedades ópticas (intensidad, longitud de onda, etc) del campo evanescente alrededor de la superficie de la fibra como resultado de la variación del índice de refracción del medio que la rodea cuando el elemento de reconocimiento biológico interactúa con el analito [30–32].

Actualmente se busca mejorar el desempeño de estos dispositivos y disminuir los límites

mínimos en la cantidad de analito necesario para ser detectado, todo esto implementando el uso de películas delgadas, nanorecubrimientos y nanoestructuras.

Capítulo 2

Metodología

Para la elaboración de los biosensores se utiliza como base el proceso de *autoensamblado* propuesto, desarrollado y reportado en [7, 8].

2.1. Materiales

El biosensor fue autoensamblado en fibra óptica SMF-28 con $10\ \mu\text{m}$ y $125\ \mu\text{m}$ de diámetro del núcleo y de la cubierta, respectivamente. Los compuestos químicos utilizados en el proceso de autoensamblado fueron comprados con Sigma-Aldrich Co., sus concentraciones y principales daños se muestran en la tabla 2.1 y sus costos se muestran en la tabla 4.1 de la sección 4.4 del apéndice. Dichos químicos son manipulados y usados con el equipo de protección adecuado y dentro de una campana de extracción química durante todas las fases del proceso, con la finalidad de evitar intoxicaciones.

Además de los reactivos antes mencionados, también se usaron muestras de otros compuestos como son el estándar de proteína IL-10, los anticuerpos policlonales Anti-IL-10 y receptor de Kisspeptina, la proteína Opn5 y la proteinasa K. Los 3 últimos se utilizan como muestras de analitos de *control negativo* en nuestra fase de detección.

En la fase de *detección* del desarrollo del biosensor también es utilizado suero sanguíneo obtenido de ejemplares de modelo Murino sacrificados después de la inducción de la Isquemia

Cerebral Global Aguda (ICGA), su obtención se discute en la sección 2.4.

Tabla 2.1: *Compuestos químicos utilizados en el autoensamblado de biosensores.*

Nombre	Concentración	Advertencia
Hidróxido de Potasio	85 %	Toxicidad aguda, Oral Corrosiones cutáneas Lesiones oculares graves
(3-aminopropil)trimetoxisilano	97 %	Irritaciones cutáneas Lesiones oculares graves Intoxicación severa, Oral
Tolueno	99.8 %	Irritaciones cutáneas Toxicidad específica, Sistema nervioso central, niveles >100 ppm Toxicidad aguda, ingesta o inhalación Provoca somnolencia o vértigo
Metanol	99.9 %	Toxicidad aguda Toxicidad aguda, Inhalación, cutánea Toxicidad específica, Ojos, Sistema nervioso central
N-hidroxisuccinimida	98 %	Irritación cutánea Lesiones oculares graves
1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida	2 %	Irritación cutánea Irritación cutánea Toxicidad específica, Sistema respiratorio

2.2. Grabado de la RPL

Para el grabado de la rejilla (lo que llamaremos matriz soporte) primero se cortaron tramos de fibra SMF-28 con una longitud total de 71 *cm*, en la mitad se elimina el revestimiento plástico de una sección de 1.5 *cm* y se limpia con alcohol isopropílico.

En el tramo sin recubrimiento se construye la RPL por la técnica de punto a punto por arco eléctrico, usando una empalmadora por fusión modelo S-176 de la marca FITEL. Para mover la fibra y generar los cambios de índice a distancias específicas (periodo de la RPL) se empleó un actuador lineal modelo TLA28A de la marca ZABER. Dicho actuador tiene una precisión de 0.1 μm , ver figura 2.1.

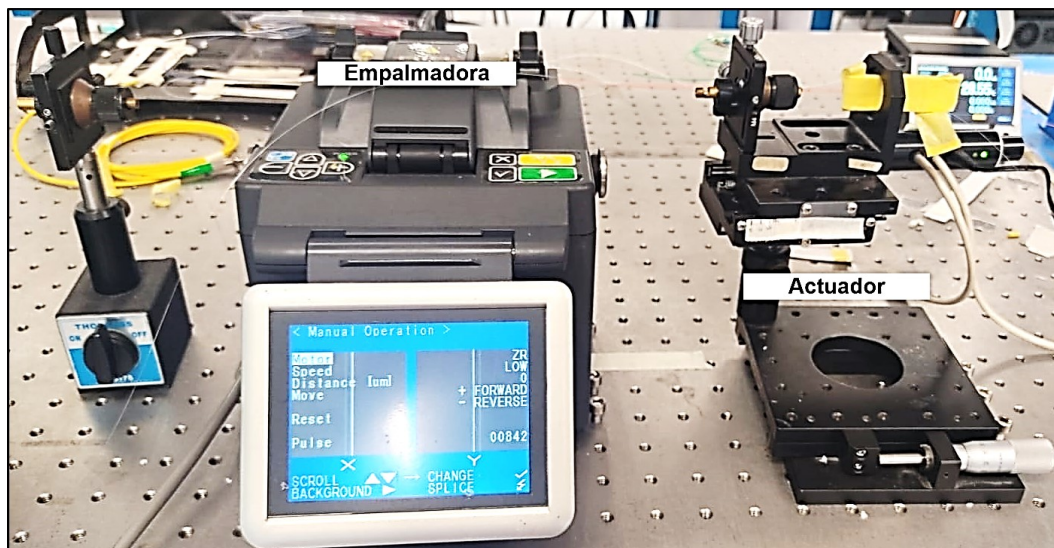


Figura 2.1: Empalmadora y actuador con fibra óptica.

Se generaron 20 puntos en la fibra mediante descargas del arco eléctrico emitido por los electrodos de la empalmadora. La separación entre punto y punto es de $620 \mu\text{m}$, lo que corresponde al periodo de modulación Λ , figura 2.2.

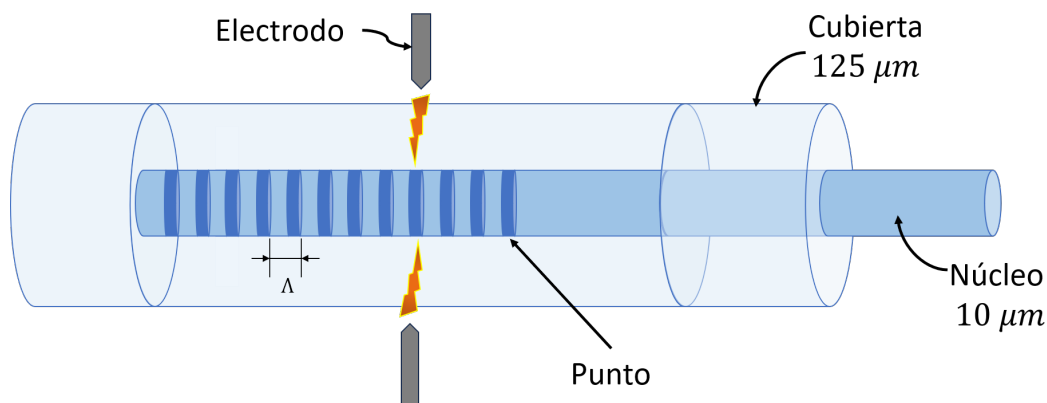


Figura 2.2: Esquema del grabado de RPL en fibra óptica.

2.3. Autoensamblado del biosensor

Después de grabar la RPL en la fibra óptica se lleva a cabo el protocolo de autoensamblado, el cual consiste en cuatro partes fundamentales que son la Hidroxilación, Funcionalización, Activación e Inmovilización para posteriormente usar el biosensor en el proceso de Detección, como se muestra en la figura 2.3.

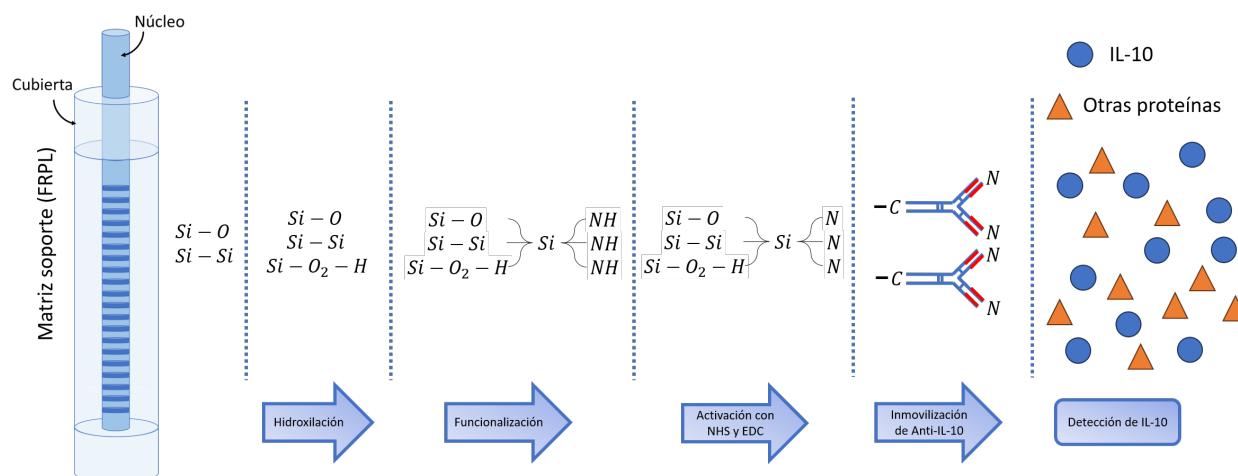


Figura 2.3: Esquema de las fases del proceso experimental (autoensamblado).

Cada una de las partes del autoensamblado de un biosensor se explican a continuación:

2.3.1. Hidroxilación

El proceso de hidroxilación es muy importante ya que elimina metales y contaminación orgánica presente en la superficie de la matriz soporte, además de agregar grupos OH (hidroxilos) a la superficie de la fibra óptica. Para esto se utilizaron 841 mg de hidróxido de potasio (KOH) los cuales se disolvieron en 7.5 ml de agua desionizada (dH_2O) y posteriormente se le agregaron 7.5 ml de metanol.

La solución preparada interactuó con la matriz soporte, en la zona donde se construyó la FRPL, por un periodo de 3 horas y 30 minutos. Después de esta interacción la fibra se enjuagó con metanol por 10 minutos con la finalidad de eliminar todo residuo de la solución usada y finalmente es secada con nitrógeno durante un minuto.

2.3.2. Funcionalización

Para esta etapa se utilizaron $200\ \mu\text{l}$ de (3-aminopropil)trimetoxisilano (3-AMPTS) que se disolvieron en 9.8 ml de tolueno. Para preparar esta solución se colocó el tolueno en un vaso de precipitado y se calentó con la ayuda de una parrilla hasta los $90\ ^\circ\text{C}$. Al alcanzar la temperatura deseada se agregó el APTMS y se retiró de la parrilla para dejar enfriar a

temperatura ambiente. Cuando la temperatura de la mezcla bajó hasta los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ esta se vació a una caja coplin de vidrio donde previamente se había fijado la sección de la fibra en donde se construyó la RPL que fue previamente hidroxilada. La fibra se dejó sumergida en la solución durante una hora. Finalmente se retiró la fibra y se enjuagó con abundante tolueno para eliminar los posibles residuos que impidan la inmovilización del anticuerpo.

La funcionalización de la superficie es un proceso en el cual se unen los enlaces $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$, $\text{Si}-\text{Si}$ y $\text{Si}-\text{O}-\text{H}$ formados en la etapa anterior. Esta unión genera la formación de sitios activos NH conocidos como grupos funcionales aminos.

2.3.3. Activación

La fase de activación asegura que el 3-AMPTS, fijado durante la funcionalización, tiene grupos funcionales amino perpendiculares a la matriz soporte lo que permitirá que el anticuerpo pueda unirse con mayor facilidad a dichos grupos funcionales.

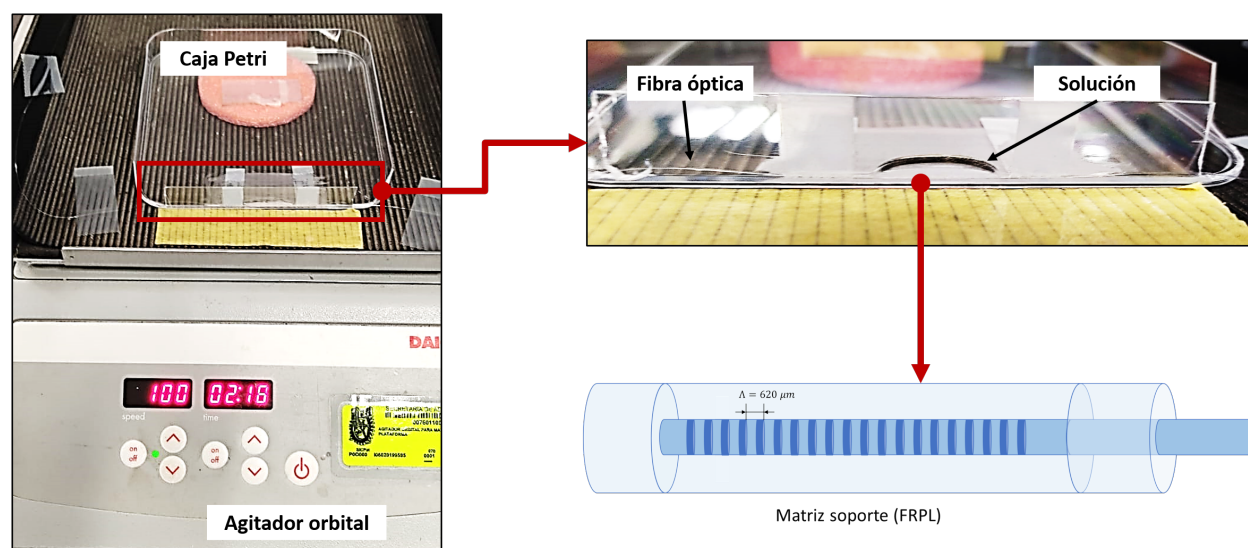


Figura 2.4: Etapa de activación.

Para esta etapa se preparó una solución con $5\ \text{mg}$ de N-hidroxisuccinimida (NHS) en $1\ \text{ml}$ de buffer de fosfato (PBS). Además se preparó otra solución de $5\ \text{mg}$ de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) en $1\ \text{ml}$ de PBS. Posteriormente se mezclaron las soluciones, dicha mezcla se utilizó en la activación del biosensor.

En una caja de Petri se colocaron 100 μl de la mezcla activadora y en ella se sumergió la FRPL. La caja de Petri con la FRPL sumergida se colocó en un agitador orbital a 3.38 Hz para que la activación de la superficie fuera homogénea y se evitaran precipitaciones, ver figura 2.4. La interacción entre la mezcla activadora y la FRPL se lleva a cabo durante 90 minutos.

Después del anterior proceso sin retirar la FRPL de la caja de Petri, ésta se enjuagó 3 veces con PBS. Finalmente se secó la mayor cantidad de PBS posible teniendo especial cuidado de no tocar la fibra ni la zona activa del biosensor.

2.3.4. Inmovilización

Para la fase de inmovilización se preparó una solución con 10 μl del anticuerpo policlonal IL-10 (Anti-IL-10) y 190 μl de PBS. El buffer ayuda a conservar el anticuerpo debido a que mantiene un pH estable y regula la presión osmótica para que el ambiente biológico en el que anticuerpo se encuentra sea lo más parecido a uno natural. El Anti-IL-10 es expresado en conejos, dichos animales son inmunizados con proteína humana IL-10 recombinante. Este anticuerpo es utilizado como ERB en los biosensores y nos permite detectar con alta especificidad la proteína interleucina-10 en el plasma sanguíneo.

Para esta etapa la FRPL, con su superficie previamente *activada*, se mantuvo fijada en la caja petri de plástico utilizada en la etapa anterior. Luego es sumergida en la solución de Anti-IL-10 y PBS. La caja petri también se mantuvo colocada en el agitador orbital a una frecuencia de 1.66 Hz para evitar que el Anti-IL-10 se precipite y así asegurar que el autoensamblaje del biosensor se hiciera de manera uniforme en toda la superficie de la fibra.

La interacción de la fibra con RPL y la solución se lleva a cabo durante 120 minutos. En este intervalo de tiempo todos los sitios activos se ocupan ya que el anticuerpo se *ancla* o *une* a la superficie activada a través de los enlaces $C - H$. Después de esto quedarán grupos

aminos terminales ($-NH_2$) del anticuerpo que detectarán a la proteína de interés.

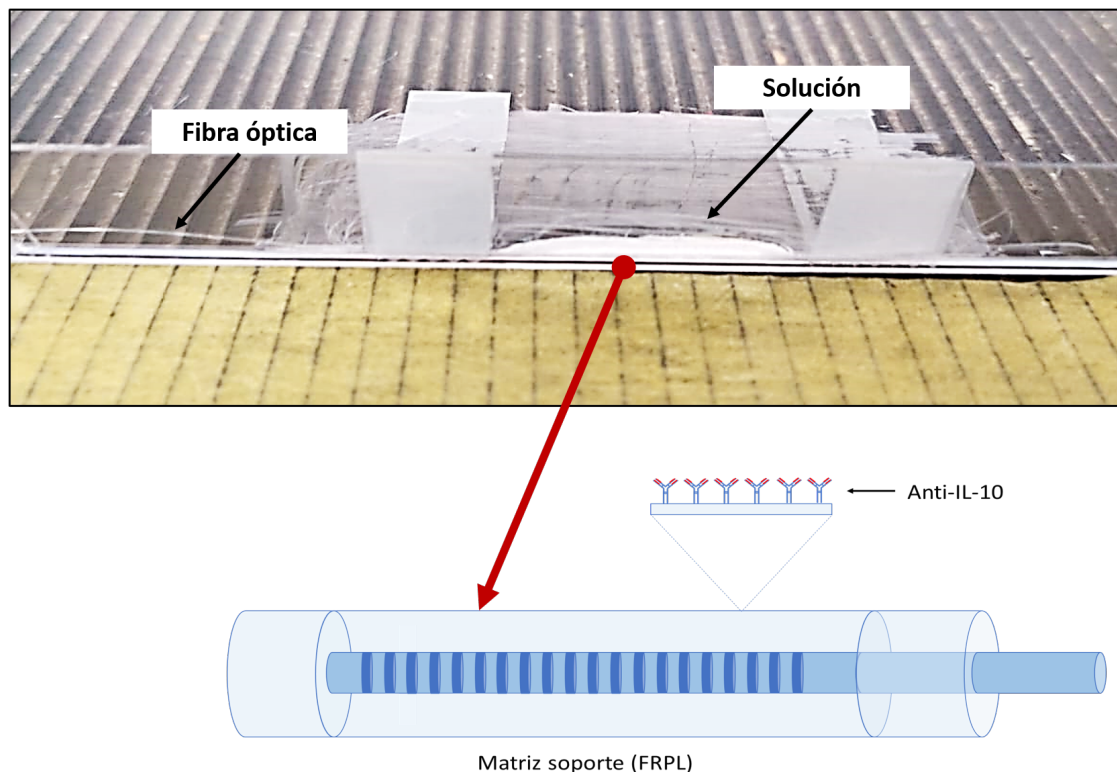


Figura 2.5: Etapa de inmovilización.

2.4. Suero sanguíneo

El suero sanguíneo utilizado en la fase de detección del biosensor fue proporcionado por el Centro de Investigación en Reproducción Animal del CINVESTAV-UATx. Dicho suero es procesado a partir de plasma sanguíneo que es obtenido de ejemplares de modelo murino a los que se les induce la Isquemia Cerebral General Aguda (ICGA) y posteriormente son sacrificados.

El protocolo de inducción de la ICGA es reportado por Pulsinelli y Brierley (1979) y por Pulsinelli y Buchan (1998), [33, 34]. Los ejemplares son Ratas Macho de la cepa Sprague Dawley con una edad entre 3.5 a 4 meses y con un peso de 350 g, en promedio. Las características de edad, sexo y peso aseguran un mayor rango de supervivencia, es decir, sobreviven el tiempo óptimo para llevar a cabo todo el proceso de ICGA.

El protocolo de inducción de la IGCA se describe a continuación.

- **Electrocauterización de las arterias vertebrales:** Los ejemplares son anestesiados vía peritoneal con Xilacina y Ketamina. Una vez que están bajo anestesia se hace la oclusión de las arterias vertebrales, ver figura 2.6a. Dichas arterias irrigan la porción superior de la médula espinal, el tronco encefálico, el cerebro y la porción posterior del encéfalo.

- **Exposición de arterias carótidas:** Haciendo una incisión en el cuello se localizan y exponen las arterias carótidas, ver figura 2.6b, las carótidas proporcionan el principal suministro de sangre al cerebro. Una vez que son expuestas, las arterias se anudan con hilo de sutura para su posterior oclusión en el proceso isquémico.

- **Proceso Isquémico:** Para el proceso isquémico los ejemplares se mantienen bajo anestesia inhalada. En este paso se vuelven a exponer las arterias carótidas y se realiza la oclusión de las mismas con clips quirúrgicos, ver figura 2.6c, cuando se pone el último clip se comienza a tomar el tiempo para sacrificar al ejemplar por decapitación. Una vez realizada la oclusión se retira la anestesia y se monitorean los signos vitales.

Transcurridos los primeros 15 minutos se retiran los clips quirúrgicos permitiendo la re-perfusión sanguínea, este tiempo es óptimo para que la ICGA suceda pero el animal no muera. Se verifica que los animales permanezcan inconscientes y sin reflejo de enderezamiento por al menos 20 minutos.

- **Obtención de suero sanguíneo:** Para este trabajo se utilizará el suero sanguíneo procesado del plasma de animales sacrificados por decapitación a 2 y 6 horas post isquemia. El plasma es obtenido inmediatamente después del sacrificio y procesado para obtener el suero, ver figura 2.6d.

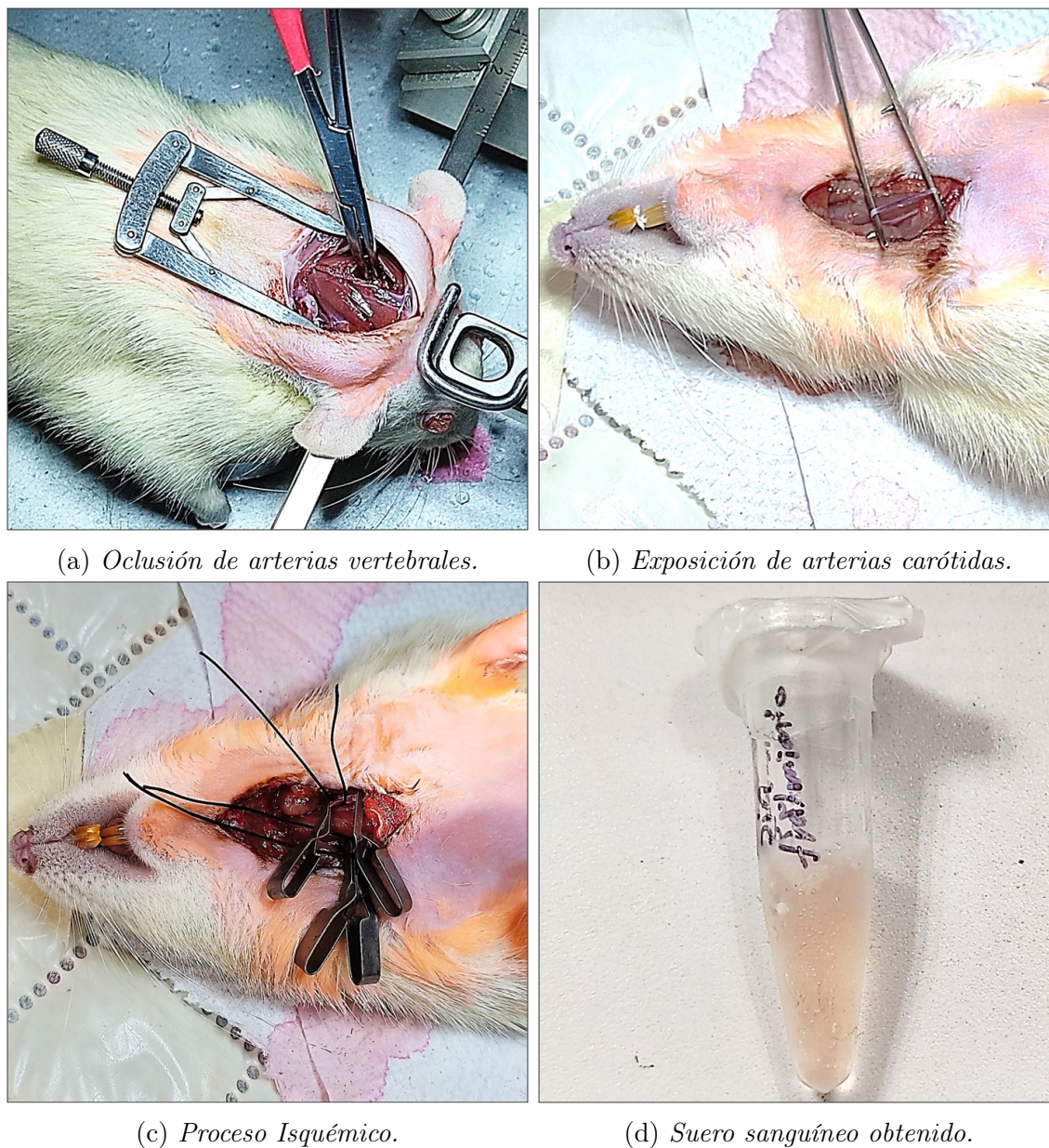


Figura 2.6: Protocolo de inducción de Isquemia Cerebral Global Aguda (ICGA).

2.5. Detección

Después de realizar el proceso de inmovilización de la superficie del biosensor se realizó la detección. Para esto se fabricaron 8 biosensores basados en el protocolo de autoensamblado y se utilizaron diferentes soluciones de compuestos como el estándar de IL-10, el anticuerpo policlonal receptor de Kisspeptina, la Opsina Opn5, la proteinasa K y 4 muestras de suero

sanguíneo obtenidas con diferentes condiciones en el protocolo de inducción. A continuación se da una breve explicación de los compuestos utilizados:

- **Estándar de proteína IL-10 (STD-IL-10):** Esta proteína humana recombinante, comprada en Cell Signaling, es obtenida en laboratorio utilizando líneas celulares distintas a la célula en la que se produce naturalmente. La proteína IL-10, que es producida normalmente por leucocitos (globulos blancos) y linfocitos T, aumenta la producción de anticuerpos que elaboran las células plasmáticas y reduce la inflamación al impedir que las células inmunitarias generen citocinas, como la citocina IL-6.

Para la detección se utilizó una solución compuesta de 10 μl de STD-IL-10 en 190 μl de PBS.

- **Anticuerpo policlonal receptor de Kisspeptina (Anti-Kiss):** Es expresado en humanos, ratas y ratones. Es un receptor de la proteína Kisspeptina tiene un papel de interruptor molecular para la pubertad y en la regulación de la reproducción estacional y metabólica mediante señales internas y externas [35]. También está relacionado con la diabetes, supresión de metástasis de melanoma en cáncer de mama y en el sistema cardiovascular.

Para la detección se utilizó una solución compuesta de 10 μl de Anti-Kiss en 190 μl de PBS.

- **Opsina Opn5 (Opn5):** Es una proteasa que juega un papel importante en la diferenciación de células embrionales y en la actividad neuronal, por lo que puede detectarse principalmente en el cerebro, la piel, los tejidos neuronales, el hipotálamo, la medulla espinal y los ojos [36]. Además de eso, diversos estudios han demostrado que esta opsina puede usarse como biomarcador para diagnosticar y controlar varios tipos de cáncer [37].

Para la detección se utilizó una solución compuesta de 10 μl de Opn5 en 190 μl de PBS.

- **Proteinasa K:** Es una proteasa que se obtiene del hongo *Engyodontium Album* [38], su amplia especificidad es utilizada para la digestión de proteínas y la eliminación de

contaminantes en preparaciones de ácidos nucleicos (ADN y ARN) para evitar que éstos se degraden rápidamente. Sus aplicaciones más comunes son aislamiento de ADN o ARN, destrucción de proteínas en tejidos y cultivos celulares.

Para la detección se utilizó una solución compuesta de 10 μl de Proteinasa K en 190 μl de PBS.

- **Suero sanguíneo:** se utilizaron 4 muestras distintas del suero obtenido del procesamiento del plasma sanguíneo de los ejemplares de modelo murino.
 - 150 μl de suero de animal sacrificado al tiempo cero de iniciada la inducción de la ICGA.
 - 150 μl de suero de animal sacrificado a las 2 horas de la inducción de la isquemia.
 - 150 μl de suero de animal sacrificado a las 2 horas de la inducción de la isquemia pero que recibió tratamiento con benzoato de estradiol (4 mg/kg) 30 minutos antes de la isquemia.
 - 150 μl de suero de animal sacrificado después de 6 horas de iniciada la inducción del proceso isquémico.

Para la detección se extrajo con mucho cuidado la solución de inmovilización, teniendo especial atención en no tocar la RPL. Después, sin quitar la fibra de la caja petri y sin mover la caja petri del agitador orbital se coloca, sobre la región de FRPL, la solución de detección. El agitador se programó a una frecuencia de 1.66 Hz para evitar precipitaciones y asegurar la interacción uniforme. La detección se lleva a cabo durante 120 minutos.

2.6. Caracterización del autoensamblado del biosensor

2.6.1. Microscopía óptica

Se obtuvieron imágenes de la morfología de la superficie para la fibra sin revestimiento, en las etapas de grabado, hidroxilación y funcionalización comprendidas en el autoensamblado del biosensor así como de la etapa de detección, para esto se usó un microscopio óptico

de la marca Olympus Modelo PME3 con un objetivo de $50x$ y con ayuda del software StCamSWare.

2.6.2. Análisis de Transmisión

Uno de los extremos de la fibra óptica en la que se grabó la RPL y sobre la que se ensambló el biosensor se empalmó a un diodo superluminiscente (SLD) a 200 mA . El SLD tiene una longitud de onda central de 1350 nm con un ancho de banda de 50 nm aproximadamente. En el otro extremo de la FRPL se empalmó un analizador de espectro óptico (OSA por sus siglas en inglés) modelo AQ6317B operando en la región de infrarrojo ($1460 - 1700\text{ nm}$), ver figura 2.7.

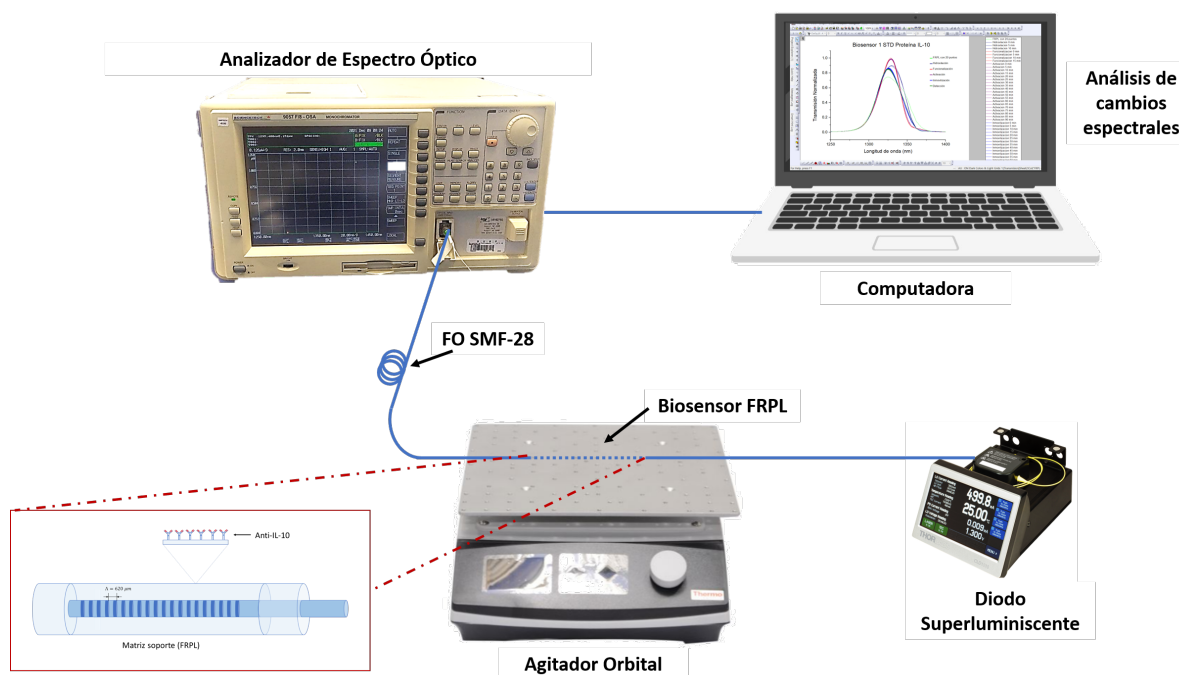


Figura 2.7: Arreglo experimental para la caracterización del biosensor.

El analizador permitió observar y medir las variaciones en amplitud y en longitud de onda en la transmisión de la fibra óptica. Dichos empalmes y observaciones se hicieron en cada etapa del autoensamblado del biosensor y en la etapa de detección. Para tomar las mediciones en cada etapa del autoensamblado del biosensor, los datos generados por el OSA se grabaron en un archivo *.txt* cada 5 minutos.

2.6.3. Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales, PCA por sus siglas en inglés, es una técnica estándar en el análisis de datos. Esta herramienta de análisis permite encontrar patrones, estructuras, similitudes o diferencias en conjuntos de datos de n variables y después los *comprime*. Es una técnica no paramétrica y simple que usa soluciones analíticas con bases de álgebra lineal. El PCA cuantifica la importancia de cada una de las $m < n$ dimensiones que tiene el conjunto de datos para describir su variabilidad. Con este análisis se transforma el conjunto de variables originales en un nuevo conjunto de *componentes principales*.

Cuando el conjunto de datos tiene gran dimensión, esta herramienta reduce la dimensión del número de variables facilitando la interpretación de los datos, sin perder la mayoría de la información, esto lo logra al establecer nuevas variables que son combinaciones linealmente independientes de las variables originales.

Además el PCA mide la varianza a lo largo de cada uno de los componentes principales lo que provee una forma de caracterizar (razonablemente) al conjunto de datos completo [39].

En este trabajo se utilizó el programa OriginPro 2016 para realizar el PCA de los datos de cada una de las etapas de autoensamblado de los 8 biosensores que se construyeron.

Capítulo 3

Resultados: Biosensores de FRPL

Se fabricaron 8 biosensores siguiendo el protocolo de autoensamblado, cada uno interactuó con una muestra diferente. Los biosensores y sus nombres abreviados así como las muestras con la que interactúan se describe en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Biosensores y muestras.

Etiqueta	Nombre	Interacción
Biosensor 1	STD-IL-10	Biosensor, control, interactúa con estándar de IL-10.
Biosensor 2	2hrsConTto	Interactúa con suero sanguíneo de animal sacrificado a las 2 hrs CON tratamiento.
Biosensor 3	2hrsSinTto	Interactúa con suero sanguíneo de animal sacrificado a las 2 hrs SIN tratamiento.
Biosensor 4	6hrsSinTto	Interactúa con suero sanguíneo de animal sacrificado a las 6 hrs SIN tratamiento.
Biosensor 5	ControlT=0	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo de animal sacrificado al tiempo cero.
Biosensor 6	Kisspeptina	Biosensor, control, interactúa con Anticuerpo Kisspeptina.
Biosensor 7	OPN5	Biosensor, control, interactúa con Opsina OPN5.
Biosensor 8	Proteinasa K	Biosensor, control, interactúa con Proteinasa K.

3.1. Imágenes de microscopía

Para observar la homogeneidad de la superficie del biosensor durante cada una de las etapas de autoensamblado y de la detección se realizó una caracterización morfológica mediante microscopía óptica. En la figura 3.1 se observa que la fibra óptica sin revestimiento y después de la inscripción de la RPL tiene un diámetro de $125 \mu m$, al realizar la hidroxilación de la superficie el diámetro disminuye a $120 \mu m$ y posteriormente a la funcionalización el diámetro aumenta $5 \mu m$, para un diámetro total de $125 \mu m$. Cada división de la escala mostrada en las imágenes corresponde a $5 \mu m$.

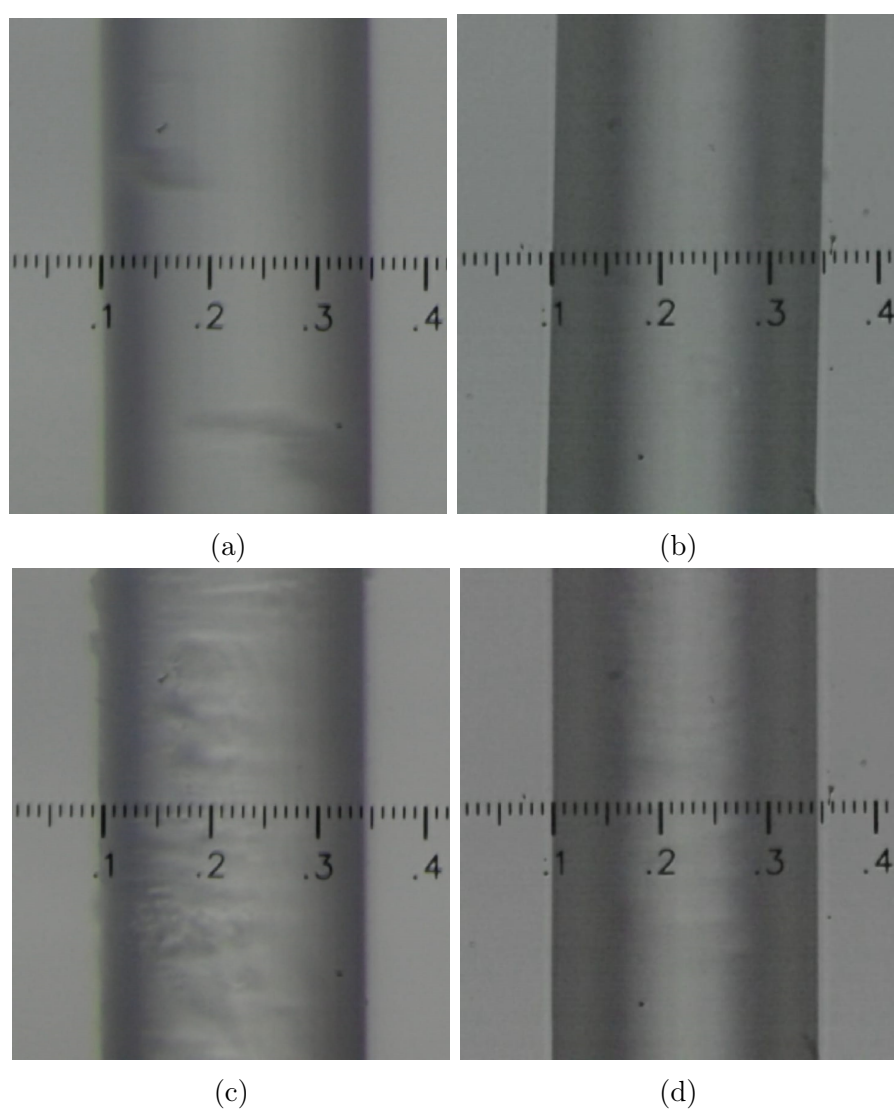


Figura 3.1: Imágenes de microscopía: a) fibra sin revestimiento, b) FRPL, c) FRPL hidroxilada y d) FRPL Funcionalizada.

Al finalizar la detección se tomaron imágenes de la superficie del biosensor para observar la homogeneidad superficial, en las figuras se observa la forma en la que las muestras se fijaron a la superficie de la fibra.

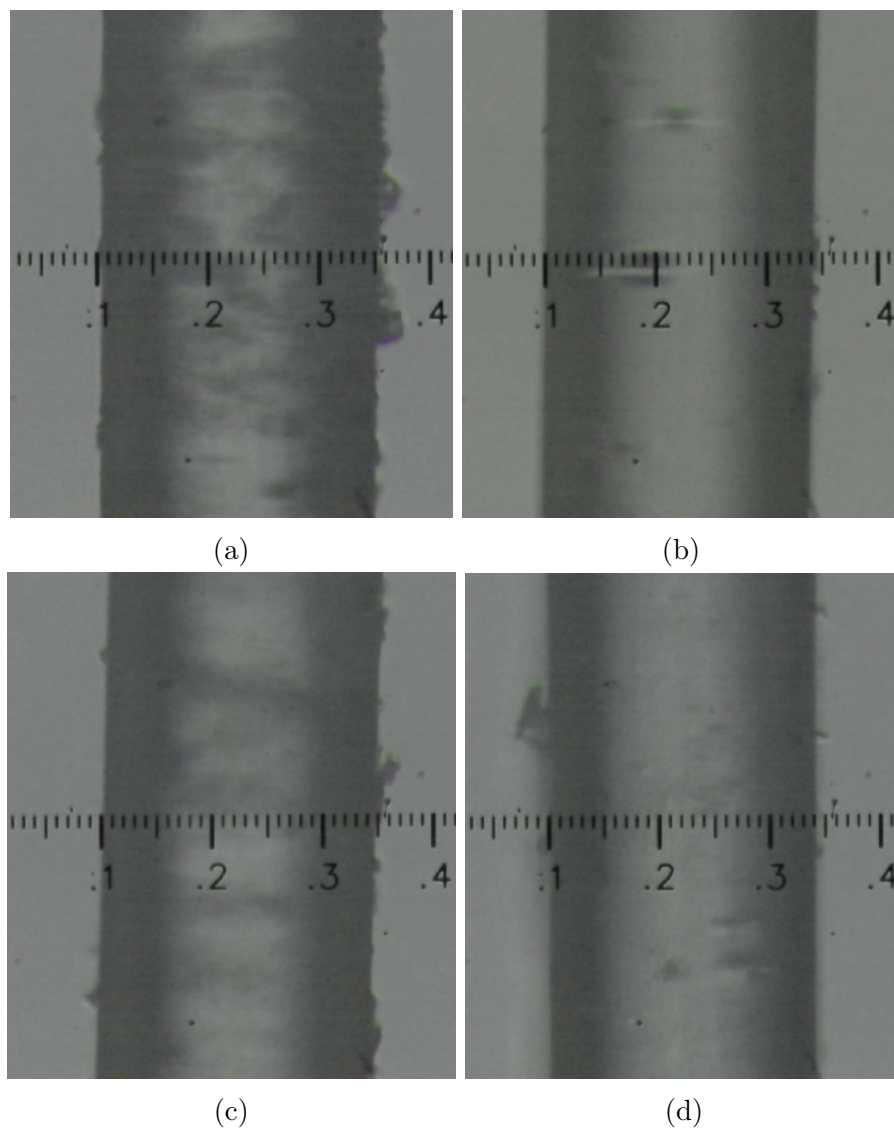


Figura 3.2: Imágenes de microscopía a) Biosensor 1, b) Biosensor 2, c) Biosensor 3, d) Biosensor 4.

En la figura 3.2a se observa la superficie del biosensor que interactúa con estándar de Interleucina IL-10, la figura 3.2b muestra la superficie del biosensor que interactuó con suero sanguíneo de 2 horas después de la inducción con tratamiento. En las figuras 3.2c y 3.2d se observan las superficies de los biosensores que interactuaron con suero sanguíneo sin tratamiento obtenido a 2 y 6 horas después de la inducción, respectivamente.

En la figura 3.2 se puede notar que hubo una mayor aglomeración superficial en el biosensor 1 y en el biosensor 3.

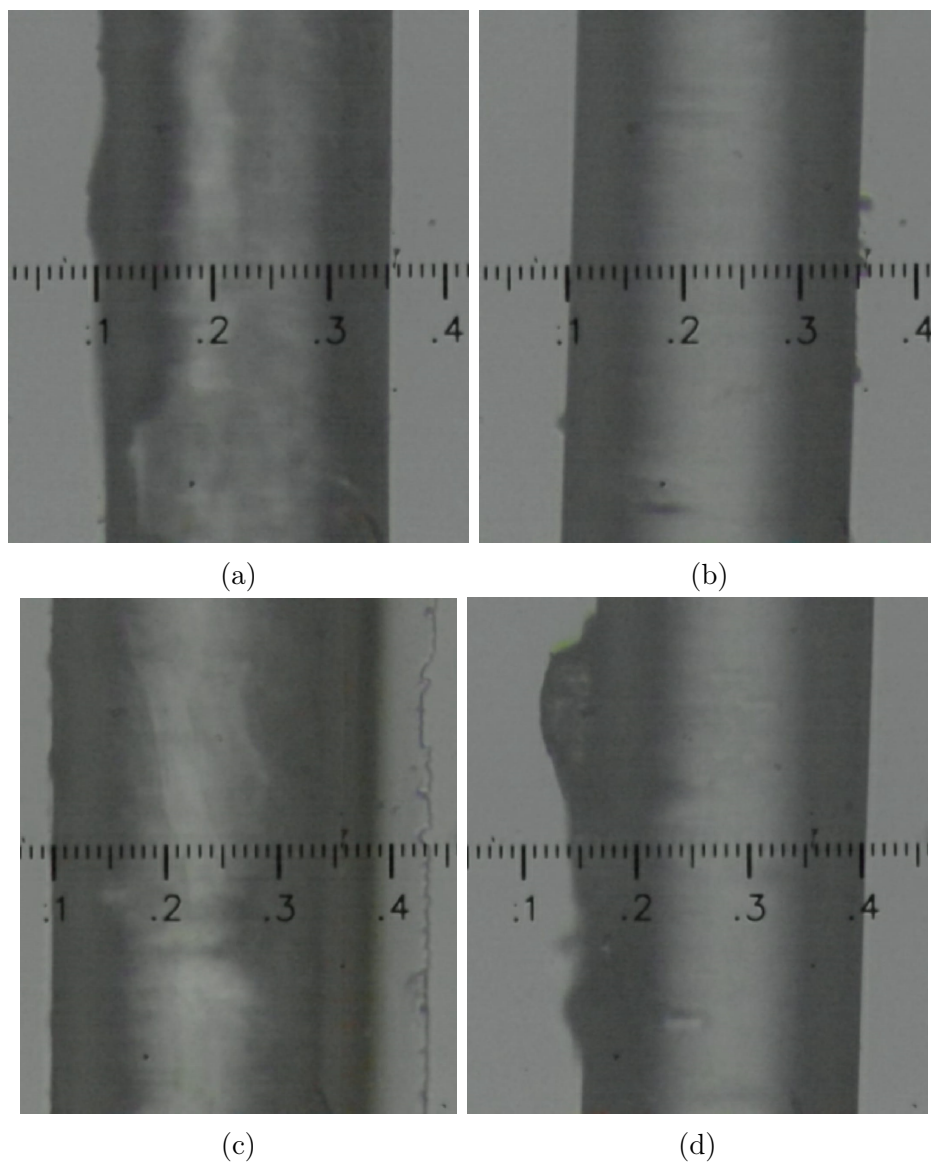


Figura 3.3: Imágenes de microscopía a) Biosensor 5, b) Biosensor 6, c) Biosensor 7, d) Biosensor 8.

La figura 3.3a corresponde al biosensor que interactúa con suero sanguíneo obtenido al tiempo cero de la inducción, en la figura 3.3b se observa la superficie del biosensor que interactuó con Anticuerpo Kisspeptina. En las figuras 3.3c y 3.3d se muestran las superficies de los biosensores que interactuaron con la proteína OPN 5 y con la proteinasa K, respectivamente.

3.2. Espectros de transmisión

Durante cada etapa del autoensamblaje de los biosensores y en la detección se grabaron los datos de salida correspondientes a los espectros de transmisión en intervalos de 5 minutos. Las figuras 3.4 y 3.5 muestran los espectros de salida de transmisión normalizada en cada etapa del protocolo de autoensamblado de los biosensores en el rango de 1275 a 1375 nm. El rango mencionado se eligió ya que es el que presenta mayores cambios espectrales en todas las etapas.

3.2.1. Estándar IL-10 y sueros sanguíneos

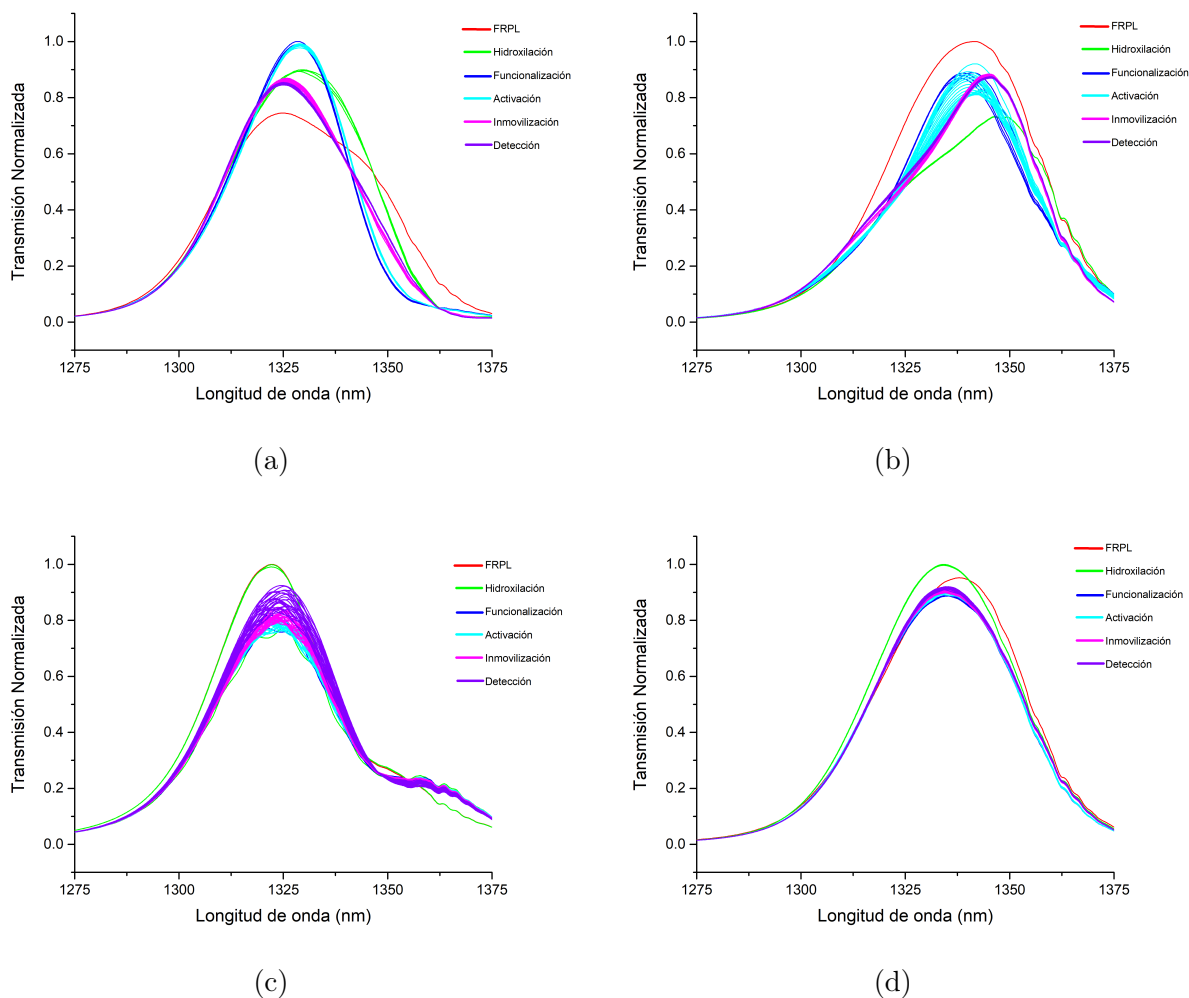


Figura 3.4: Espectros de transmisión a) Biosensor 1, b) Biosensor 2, c) Biosensor 3, d) Biosensor 4.

En la figura 3.4 se observan los espectros de: fibra con rejilla de periodo largo (línea color rojo), hidroxilación de la superficie (línea verde), etapa de funcionalización (en color azul), activación (línea cian), inmovilización (línea color magenta) y la detección (color violeta). En dichos espectros se observa cambios en la amplitud y desplazamientos en la longitud de onda, dichas variaciones pueden interpretarse como consecuencia del cambio o modulación del índice de refracción del medio circundante del biosensor debido a la formación de enlaces covalentes en su superficie durante cada etapa.

En la figura 3.4a, que corresponde al biosensor que interactúa con estándar de IL-10, se observa que los espectros de inmovilización y detección tuvieron corrimientos espectrales en los rangos de 1325 a 1326.4 nm y 1324.6 a 1325.6 nm , respectivamente. Además se tiene una disminución del 1.72 % en la máxima amplitud de los espectros de detección con respecto al valor máximo de la inmovilización.

En la figura 3.4b, se observan desplazamientos espectrales en el rango de 1344.8 a 1345.8 nm para la etapa de inmovilización y de 1345 a 1345.8 nm para la detección. Además, para el biosensor 2 se obtiene una disminución del 1.04 % en la amplitud máxima de la detección con respecto al valor máximo de la inmovilización.

En la figura 3.4c se muestran los espectros de transmisión del biosensor 3, en los cuales hay un corrimiento en longitud de onda en el rango de 1321.8 a 1325.8 nm para la inmovilización y para la detección de 1322.2 a 1326.2 nm . En este caso se tiene un aumento del 9.14 % en el valor máximo de la amplitud de los espectros de detección con respecto a los de inmovilización.

En la figura 3.4d se pueden observar los espectros del biosensor 4, en donde hay desplazamientos en longitud de onda en los rangos de 1333.6 a 1335.6 nm para la inmovilización y de 1334 a 1335.6 nm para la detección. Además existe un aumento del 1.2 % en la máxima amplitud del espectro de detección comparado con el valor máximo de la inmovilización.

3.2.2. Controles

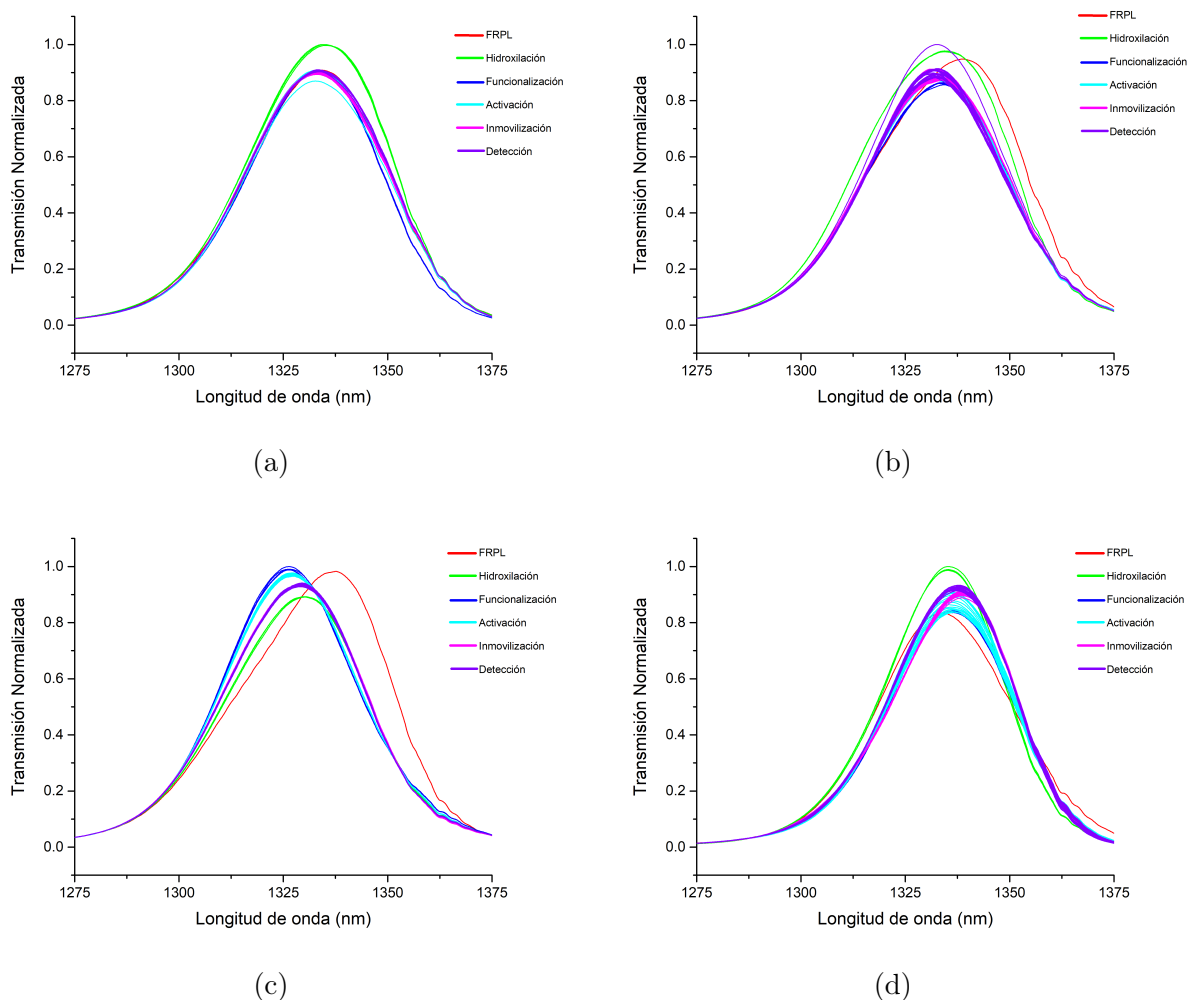


Figura 3.5: Espectros de transmisión a) Biosensor 5, b) Biosensor 6, c) Biosensor 7, d) Biosensor 8.

En la figura 3.5 se observan los espectros de: fibra con rejilla de periodo largo (línea color rojo), hidroxilación de la superficie (línea verde), etapa de funcionalización (en color azul), activación (línea cian), inmovilización (línea color magenta) y la detección (color violeta).

En la figura 3.5a se observan corrimientos espectrales en los rangos de 1332.2 a 1333.8 nm y de 1333 a 1334.4 nm para inmovilización y detección, respectivamente. Además se observa un aumento en la amplitud del 1.06% en los espectros de detección con respecto a la inmovilización. En la figura 3.5b los cambios en longitud de onda se observan en los rangos

de 1332.2 a 1334.2 *nm* para inmovilización y de 1330.6 a 1333.2 *nm* para detección, en este caso la amplitud tiene un aumento del 9.61 %.

Para el biosensor 7 se observan corrimientos espectrales en la inmovilización y en la detección en los rangos de 1328.8 a 1330 *nm* y de 1328 a 1330 *nm*, con un aumento en amplitud del 0.54 %, ver figura 3.5c. Mientras que para el biosensor 8, figura 3.5d, los cambios en longitud de onda ocurren en el rango de 1338 a 1339 *nm* para la inmovilización y de 1336.4 a 1338.2 *nm* para la detección, con un aumento en amplitud del 2.19 %.

Los cambios espectrales mostrados en la figuras 3.4 y 3.5, permiten discriminar las diferentes etapas del proceso de ensamblaje, así como la etapa de detección de los diversos analitos de interés de este proyecto. Sin embargo, ya que en las señales de transmisión solo se logra observar la modulación del índice de refracción debido a las diferentes moléculas ancladas en la superficie de la fibra, es necesario procesar los datos experimentales por medio de una técnica de análisis multivariado.

3.3. Análisis de componentes principales

Como una herramienta para confirmar la detección del analito de interés y poder discriminar de una forma más concreta entre los datos de transmisión de cada una de las etapas del autoensamblado del biosensor se utilizó el análisis por componente principales (PCA por sus siglas en inglés). Este análisis se realizó en el rango de longitud de onda de 1275 a 1375 *nm* para todos los biosensores, el cual se divide en intervalos de medición de 0.2 *nm*.

La tabla 3.2 muestra la varianza total explicada de los tres primeros componentes principales (PC), en donde se nota que se alcanzan valores de ajuste efectivo superiores al 97 % en 3 biosensores y en 5 casos se logra un ajuste mayor al 99 %.

Tabla 3.2: Datos de componentes principales de los 8 biosensores.

Biosensor	PC 1	PC 2	PC 3	Total	Sustancia de interacción
1	82.43 %	15.62 %	1.64 %	99.69 %	STD-IL-10
2	58.60 %	32.05 %	8.34 %	98.99 %	Suero sanguíneo 2hrs-con tratamiento
3	84.15 %	12.67 %	1.54 %	98.36 %	Suero sanguíneo 2hrs-sin tratamiento
4	77.44 %	15.99 %	5.59 %	99.02 %	Suero sanguíneo 6hrs-sin tratamiento
5	80.49 %	15.05 %	4.00 %	99.54 %	Suero sanguíneo T=0 hrs (control)
6	73.99 %	19.99 %	5.21 %	99.19 %	Anticuerpo Kisspeptina (control)
7	81.27 %	16.61 %	1.71 %	99.59 %	Opsina OPN5 (control)
8	48.55 %	42.61 %	6.24 %	97.40 %	Proteínasa K (control)

Los valores del ajuste indican el porcentaje de varianza total que corresponde a cada PC y ya que en todos los biosensores el componente principal 1 tiene el mayor valor, se puede considerar que este componente nos brinda la mayor cantidad de información de nuestro paquete de datos.

Posteriormente los valores de PCA se graficaron para visualizar la forma en la que se

discriminan así como el agrupamiento de cada una de las etapas de los biosensores. En las figuras 3.6 y 3.7 se muestran las etapas de funcionalización (circulo azul), activación (triángulo cian) e inmovilización (rombo magenta) así como la detección (pentágono violeta).

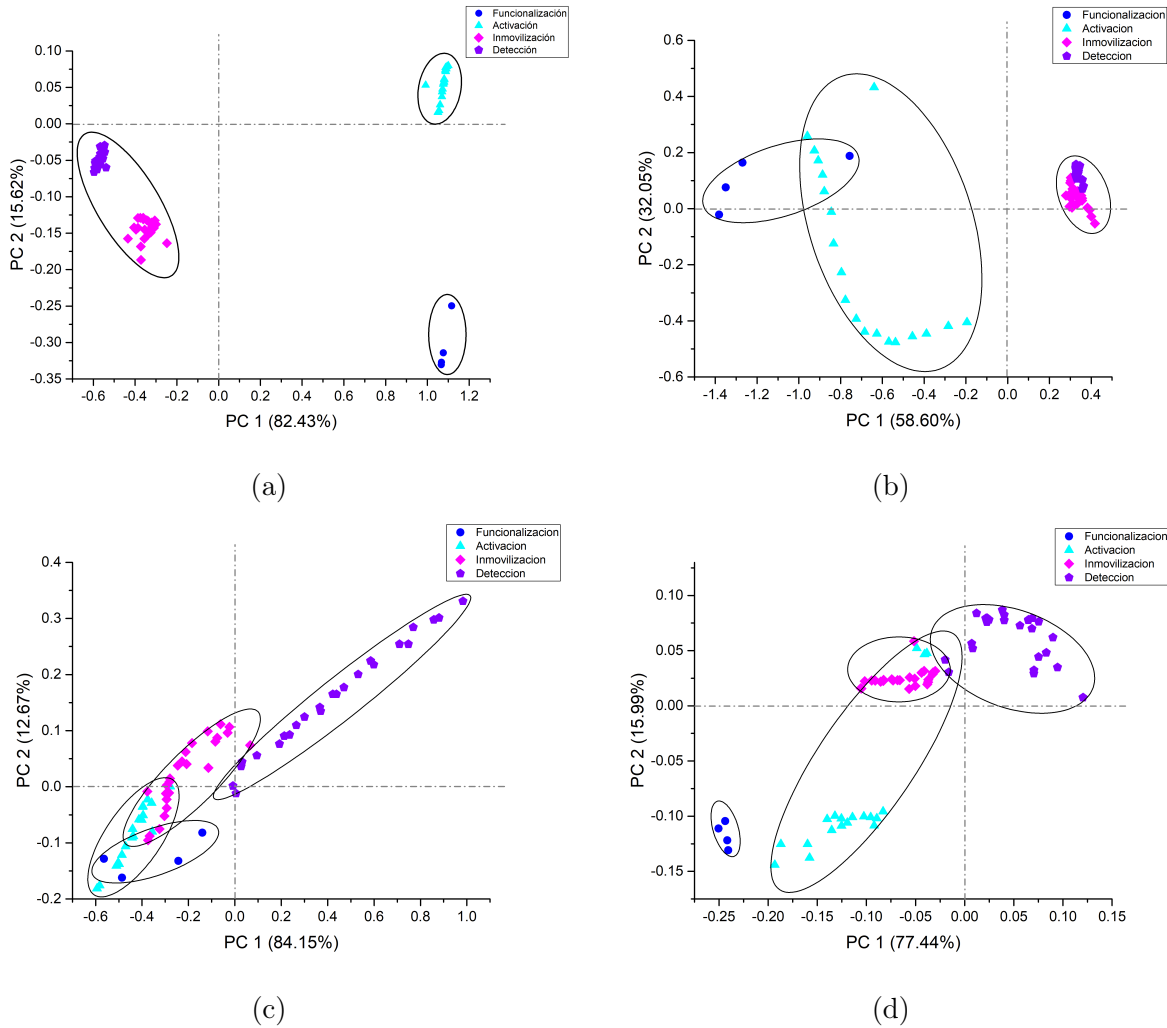


Figura 3.6: PC 1 contra PC 2 de: a) Biosensor 1, b) Biosensor 2, c) Biosensor 3, d) Biosensor 4.

La figura 3.6 muestra las gráficas del PC 1 contra el PC 2 para los biosensores 1, 2, 3 y 4 los cuales corresponden al 98.05 %, 90.65 %, 96.82 % y 93.43 % de la varianza total, respectivamente. En la figura 3.7 se observan las gráficas de PC 1 contra PC 2, los que representan un porcentaje de varianza total de 95.54 %, 93.98 %, 97.88 % y 91.16 % para los biosensores 5, 6, 7 y 8.

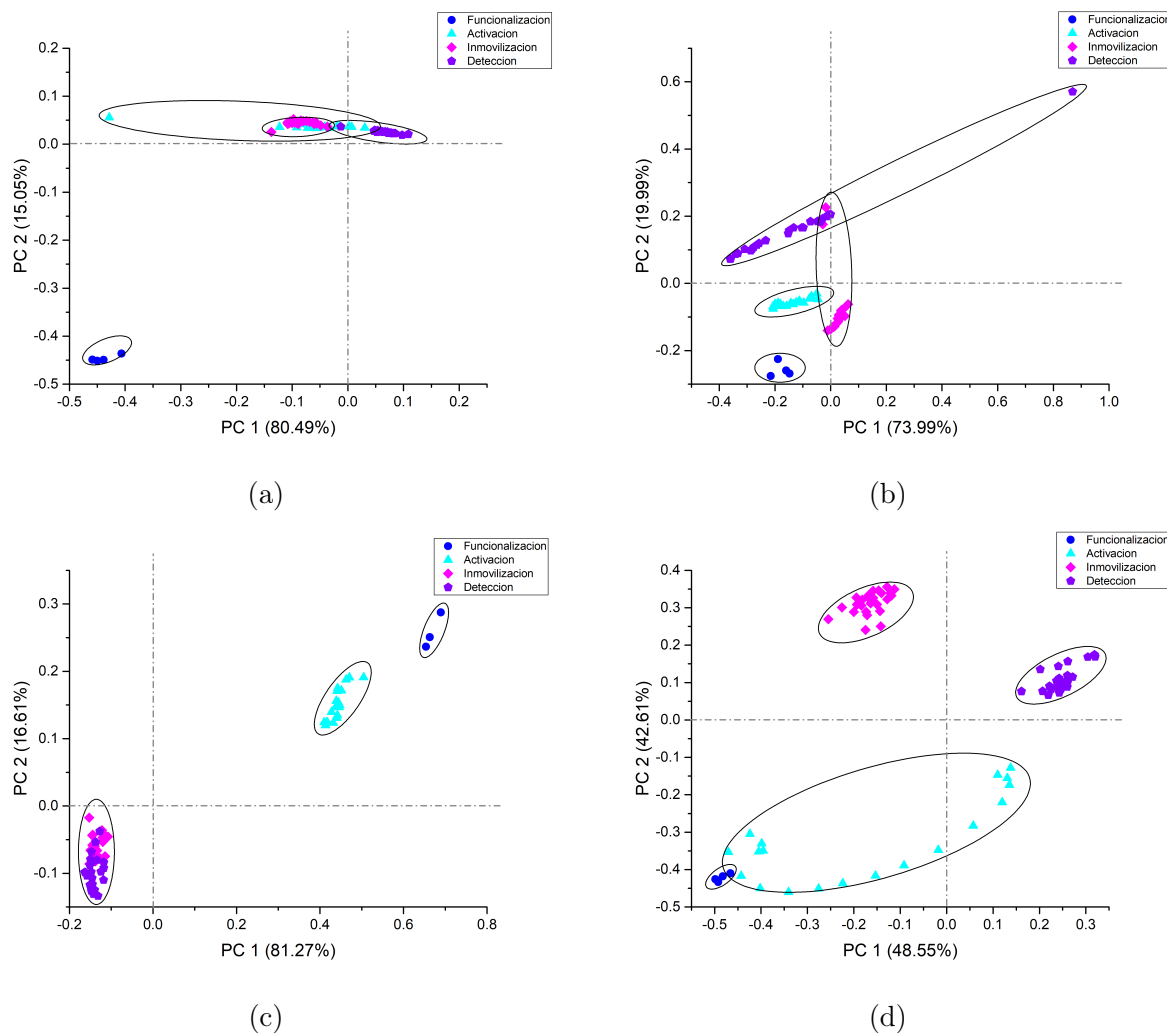


Figura 3.7: PC 1 contra PC 2 de: a) Biosensor 5, b) Biosensor 6, c) Biosensor 7, d) Biosensor 8.

En todas las gráficas se puede notar que tanto la inmovilización como la detección están agrupados en una zona mientras que las otras etapas forman grupos por separado. La tabla permite identificar la forma en la que se ubican los grupos según su valor de PC.

En la sección 4.3 del apéndice, se grafican los PC 1 y PC 2 de cada biosensor, en donde se corrobora que las etapas del autoensamblado (FRPL, hidroxilación, funcionalización, activación, inmovilización) así como la detección, se agrupan y es posible discriminar efectivamente entre ellas.

Tabla 3.3: Signo de agrupamiento del valor de PC para las figuras 3.6 y 3.7.

Etapa	PC	Biosensores							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Funcionalización	PC 1	+	-	-	-	-	-	+	-
	PC 2	-	+, -	-	-	-	-	+	-
	PC 3	-, +	-, +	-, +	+	-, +	-	-	-
Activación	PC 1	+	-	-	-	-	-	+	-
	PC 2	+	+, -	-, +	-	+	-	+	-
	PC 3	+	-, +	+, -	+, -	-, +	-	-, +	-, +
Inmovilización	PC 1	-	+	+, -	-	-	+, -	-	-
	PC 2	-	-	-, +	+	+	-, +	-	+
	PC 3	+, -	+	+, -	-	+	-, +	+	+, -
Detección	PC 1	-	+	+, -	+, -	-, +	-, +	-	+
	PC 2	-	+	-, +	+	+	+	-	+
	PC 3	-	+	+, -	-	-	+	+, -	+, -

La tendencia de agrupamiento de cada grupo de datos graficado en las figuras 3.6 y 3.7, permite discriminar de una mejor manera entre las diferentes etapas del proceso de ensamblaje de los dispositivos, así como la detección. Lo cual puede correlacionarse con los resultados obtenidos por medio de los resultados de transmisión.

3.3.1. Comportamiento en función del tiempo

De manera más específica se graficaron las etapas de inmovilización y detección para cada uno de los biosensores. Se analiza el comportamiento de los datos en función del tiempo, esto facilita identificar el PC que nos permite discriminar más la información de la evolución temporal de las mediciones.

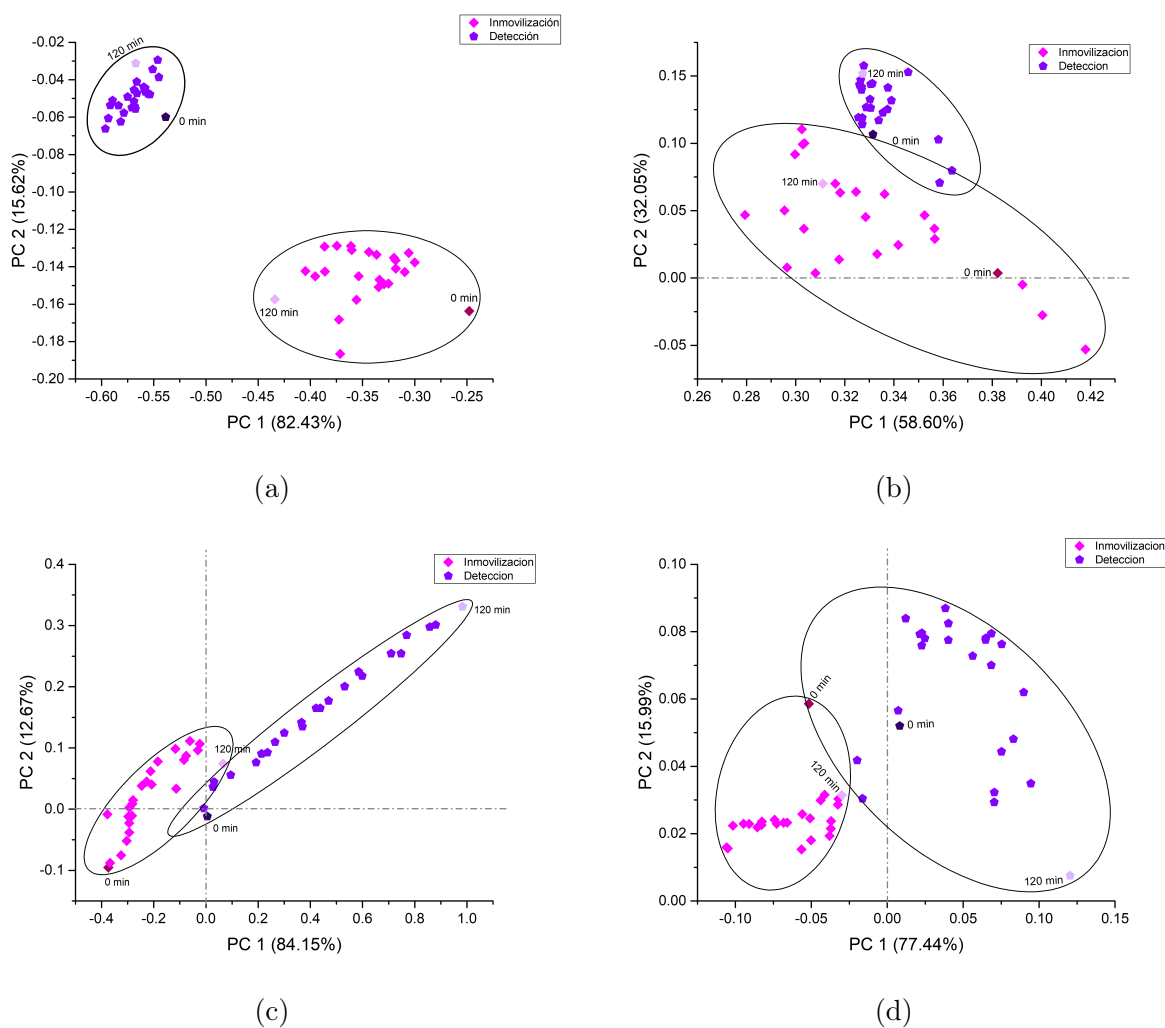


Figura 3.8: PC 1 contra PC 2 de inmovilización y detección de los Biosensores: a) 1, b) 2, c) 3 y d) 4.

En las figuras 3.8 y 3.9 se muestra los datos correspondientes a la inmovilización (rombos en color magenta) y de la detección (pentágonos en color violeta). Se observa que ambas etapas están agrupadas en cuadrantes diferentes lo que nos permite diferenciar la etapa de

inmovilización y el proceso de detección. En todas las gráficas el rombo y el pentágono de color más oscuro corresponde a las mediciones iniciales, a cero minutos, mientras que el rombo o el pentágono de color más claro indica las mediciones finales, a los 120 minutos.

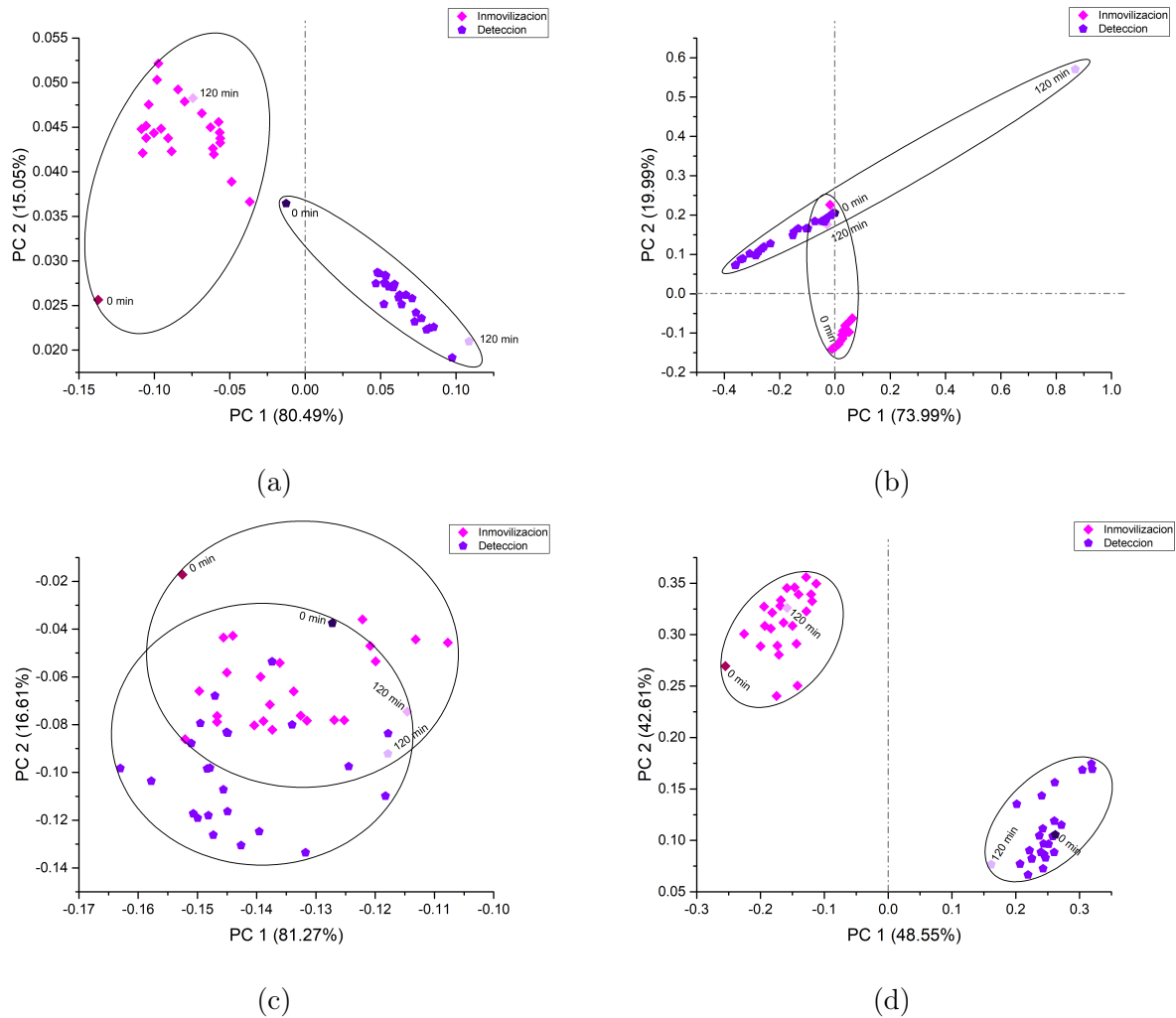


Figura 3.9: PC 1 contra PC 2 de inmovilización y detección de los Biosensores: a) 5, b) 6, c) 7 y d) 8.

De las gráficas se puede notar que el PC 2 es el componente que brinda una mayor información sobre los cambios con respecto al tiempo de todos los datos del PCA. Para corroborar lo anterior se realiza el PCA de los espectros de transmisión de la detección con suero sanguíneo obtenido 2 horas después de la inducción con y sin tratamiento previo en el intervalo de 1250 a 1450 nm, el cual tiene un porcentaje de varianza de 99.99% con sus dos primeros componentes.

En la figura 3.10 los triángulos de color verde corresponden a suero sanguíneo de 2 horas sin tratamiento y los puntos rojos a 2 horas con tratamiento. El inicio de la flecha indica el tiempo inicial de detección y la punta el tiempo final. De la gráfica se puede inferir que el PC 2 nos da información sobre las variaciones respecto al tiempo, mientras que el PC 1 nos permite discriminar entre suero sanguíneo con o sin tratamiento.

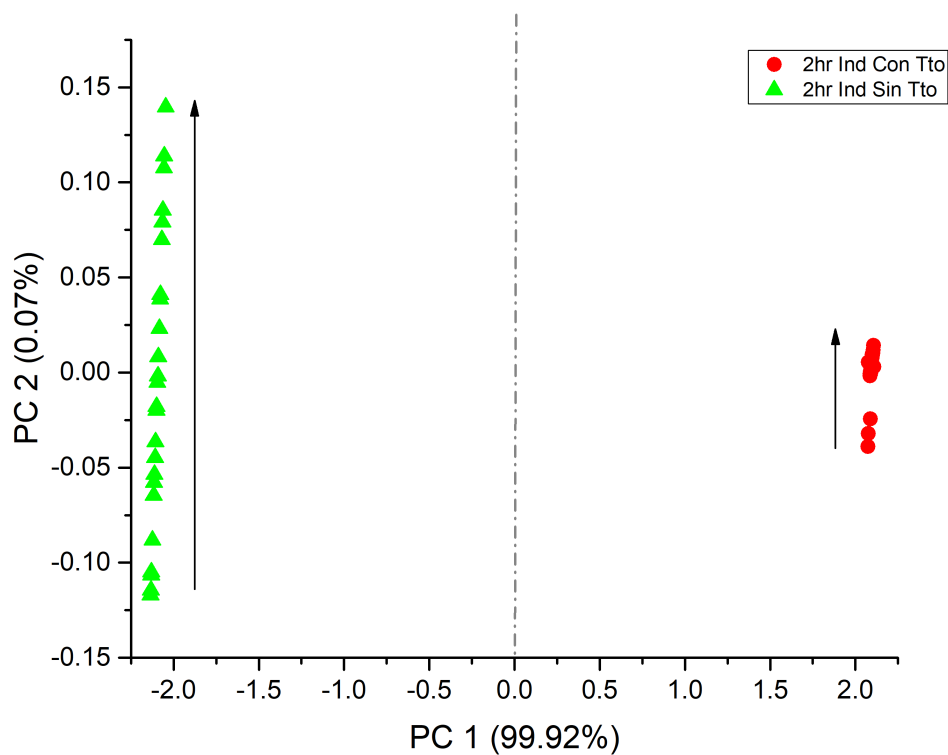


Figura 3.10: PCA detección de biosensor 2 y biosensor 3.

Para este caso en particular, de la figura se puede inferir que cuando no existen cambios respecto al tiempo y los puntos de PC se aglomeran existe una poca o nula detección de IL-10.

3.3.2. Selectividad

Para corroborar la especificidad de los biosensores a la IL-10 se utilizó la detección de estándar de Interleucina IL-10 como *control positivo*, usando la solución de estándar descrita en la metodología. Esta detección se compara mediante PCA con las detecciones en sueros sanguíneos para entender la expresión de IL-10 durante el proceso de ICGA. El análisis de componentes se realiza con los datos de los espectros de transmisión en el intervalo de 1250 a 1450 nm en el cual están comprendidas todas las variaciones de dichos espectros.

En la figura 3.11 se muestra el PCA de la detección de estándar de IL-10 (color negro) y de los sueros sanguíneos: 2 horas con tratamiento (rojo), 2 horas sin tratamiento (azul), 6 horas sin tratamiento (magenta) y a tiempo cero (verde).

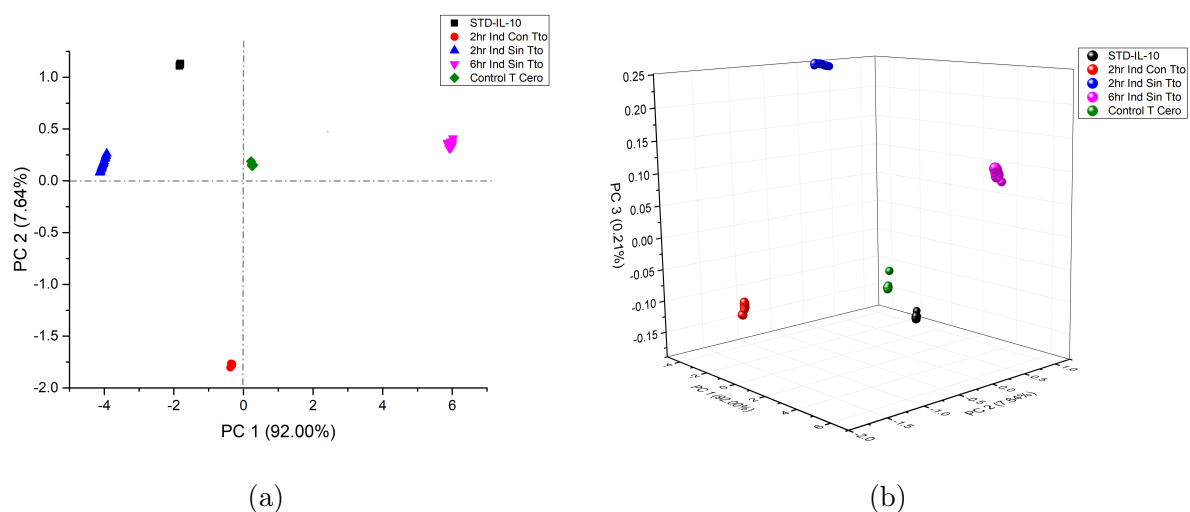


Figura 3.11: PCA de la detección de STD-IL-10 y sueros sanguíneos.

La gráfica 3.11a muestra un porcentaje de varianza del 99.64%, en ella se observa que la detección de todos los sueros sanguíneos se aglomeran en un solo punto. Los puntos del estándar de IL-10 (cuadros negros) y del suero a 2 horas sin tratamiento (triángulos azules) se encuentran en el segundo cuadrante, el control a tiempo cero (pentágonos verdes) se encuentra en el cuadrante I cerca del origen, mientras que el suero a 6 horas sin tratamiento (triángulos invertidos magenta) y a 2 horas con tratamiento (puntos rojos) son los más alejados del STD-IL-10 encontrándose en los cuadrantes I y III.

En la figura 3.11b se grafican los tres componentes principales de los procesos de detección de los sueros sanguíneos con un porcentaje de varianza total del 99.85 %. En dicha gráfica se observa que tanto los sueros de 2 horas con tratamiento, 6 horas sin tratamiento y control tiempo cero se encuentran más cerca de los puntos de detección del estándar de IL-10.

Con la posición de los puntos aglomerados de cada una de las detecciones es posible inferir que el PC 1 y el PC 2 permiten discriminar la expresión de IL-10 en función del tiempo de inducción de la ICGA y del tipo de suero sanguíneo. Se observa que, para el PC 3, los puntos más alejados de la detección del STD-IL-10 podrían indicar una menor concentración de IL-10.

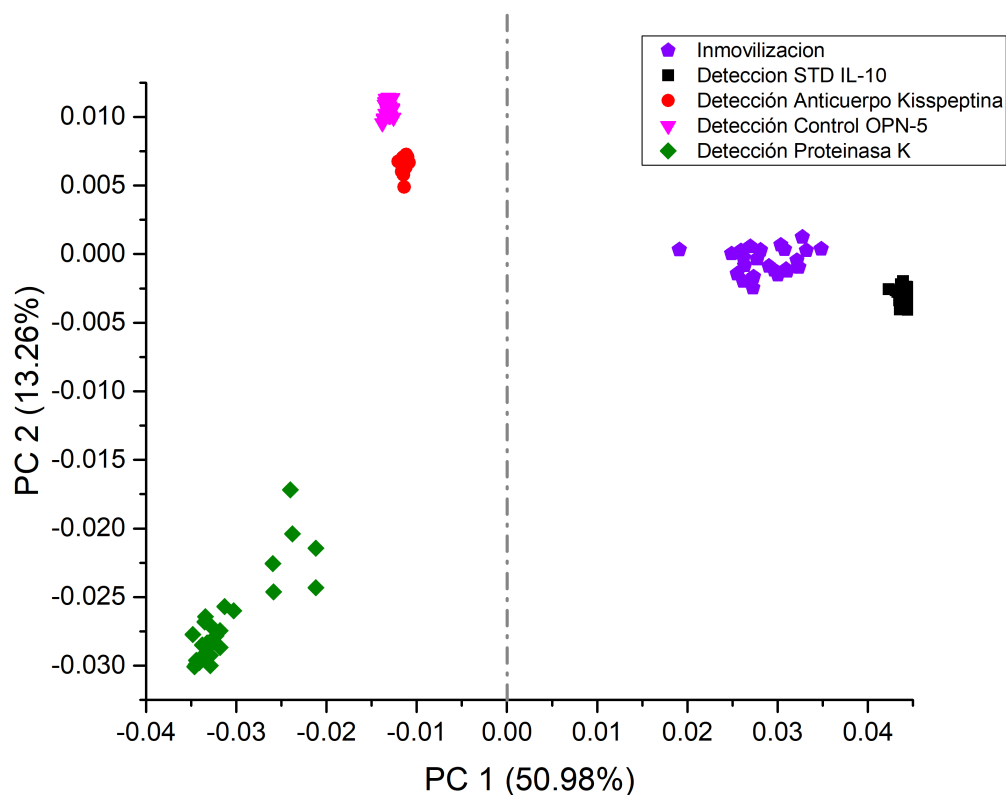


Figura 3.12: PCA de la detección de STD-IL-10 y controles.

En la figura 3.12 se muestran los puntos para la etapa de inmovilización (pentágonos vio-

letas), para la detección de STD-IL-10 (cuadros negros), Anticuerpo Kisspeptina (círculos rojos), Opsina OPN 5 (triángulos invertidos magentas) y la Proteinasa K (rombos verdes). El PCA nos da un porcentaje de varianza del 64.24 % donde los puntos tanto de la etapa de inmovilización como de la detección del STD-IL-10 se encuentran aglomerados en el plano positivo del PC 1, a su vez los puntos de las etapas de detección para las demás muestras están aglomerados en el plano negativo del PC 1, lo que las confirma como controles negativos. Además de lo anterior, se observa que debido a la forma en la que están aglomerados los puntos y su posición en los cuadrantes es posible discriminar entre cada una de las detecciones.

Capítulo 4

Conclusiones Generales

Se implementó el protocolo experimental para la fabricación de los biosensores de fibra óptica (FO) con rejilla de periodo largo (RPL), en los cuales se utilizó el Anticuerpo policlonal IL-10 como elemento de reconocimiento biológico para la detección de Interleucina 10 (IL-10) presente en suero sanguíneo de modelo Murino al que se le indujo la ICGA con diferentes tiempos y tratamientos previos.

Se obtuvieron los espectros de la señal de salida de la transmisión de los biosensores en cada una de las etapas del autoensamblaje y en el proceso de detección. En dichos espectros se observaron variaciones en la amplitud y desplazamientos de la longitud de onda.

El análisis de los espectros obtenidos y las imágenes de microscopía permiten conocer más sobre la estructura y homogeneidad del biosensor construido en fibra óptica SMF-28 (monomodo) con Anti-IL-10 inmovilizada en su superficie mediante el protocolo de autoensamblado.

Las imágenes de microscopía óptica nos permiten observar cambios morfológicos en la superficie de los biosensores derivados de cada una de las etapas del autoensamblado, así como los cambios superficiales originados por la interacción de cada biosensor con los diferentes analitos durante la etapa de detección.

El PCA se realizó con los datos de cada etapa del protocolo de autoensamblado para cada biosensor. Dicho análisis se realizó en el rango de longitud de onda de 1275 a 1375 *nm*, en el que se observaron mayores cambios espectrales. Los valores de PC 1 se encuentran entre 48.55 % y el 84.15 % de la varianza.

El análisis de componentes principales permitió correlacionar los datos obtenidos de las etapas de fabricación del biosensor. En este análisis se observó un agrupamiento en términos de los componentes principales. Este análisis confirmó que el grabado de las rejillas, el autoensamblado del biosensor y la etapa de detección de la proteína IL-10 se realizaron correctamente.

Además, el PCA sirvió como una herramienta importante en la detección y discriminación de suero sanguíneo obtenido a 2 horas de la inducción de la ICGA con y sin tratamiento. De este análisis se puede inferir que el PC1 nos da información sobre la sustancia de interacción (suero con y sin tratamiento) y que el PC 2 nos brinda información sobre la evolución temporal de cada etapa. También, al realizar el PCA de los datos del STD-IL-10 y los controles, se pudo discriminar entre cada una de las detecciones ya que los datos se aglomeran en nubes de puntos con una tendencia de agrupamiento bien definida.

Finalmente, el desarrollo de estos biosensores es de suma importancia ya que su especificidad, tamaño, costos y medición en tiempo real los vuelve candidatos prometedores para el desarrollo de dispositivos de detección de analitos específicos de manera *in vivo* e *in situ* y en el caso particular de la IL-10 poder dar un diagnóstico o tratamiento oportuno para evitar daños severos a las neuronas cerebrales.

Bibliografía

- [1] James Chambers, Bernard Arulanandam, Leann Matta, Alex Weis, and James Valdes. Biosensor recognition elements. *Current issues in molecular biology*, 10:1–12, 01 2008.
- [2] Karina González León. Desarrollo de un biosensor de fibra óptica para aplicaciones en optogenética. Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México, 12 2020.
- [3] Eduardo Torres and Alia Mendez. Biosensores enzimáticos. *Revista Digital Universitaria*, 15(11):1–8, 11 2014.
- [4] María Bosch, Antonio Sánchez, Fuentesanta Rojas, and Catalina Ojeda. Recent development in optical fiber biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 7(6):797–859, 06 2007.
- [5] Marie Pospíšilová, Gabriela Kuncová, and Josef Trögl. Fiber-optic chemical sensors and fiber-optic bio-sensors. *Sensors*, 15(10):25208–25259, 09 2015.
- [6] Luis Armando García de la Rosa. *Rejillas de Periodo Largo en Fibra Óptica: fabricación y caracterización*. PhD thesis, Centro de Investigaciones en Óptica, A.C., León, Guanajuato, México, 2011.
- [7] Raúl Delgado, Karina González, and Georgina Beltrán. Neuropsin (opn5) detection in the brain tissue of a murine model using long period fiber grating (lpfg). *Optics & Laser Technology*, 139:106972, 2021.

- [8] K. González, G. Beltrán, S. Muñoz, V. López, J. Castillo, V. Alatraste, and R. Delgado. Experimental characterization of a biosensor based on a tapered optical fiber for kisspeptin detection. *Applied Optics*, 59(13):D131–D137, 2020.
- [9] Claudio Jiménez and Daniel León. Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae*, 16:144 – 154, 01 2009.
- [10] APF Turner and JD Newman. An introduction to biosensors. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 167:13–27, 1998.
- [11] Jesús Álvarez, Jhonattan Córdoba, and Ferney Amaya. Biosensores Ópticos para aplicaciones lab-on-a-chip. *Encuentro Internacional De Educación En Ingeniería*, 08 2019.
- [12] Bai-Ou Guan and Yunyun Huang. Interface sensitized optical microfiber biosensors. *J. Lightwave Technol.*, 37(11):2616–2622, 06 2019.
- [13] Secretaria de Salud del Gobierno de México. En México se registran alrededor de 170 mil infartos cerebrales. Comunicado digital, 10 2018.
- [14] C Arango-Dávila, M Escobar-Betancourt, GP Cardona-Gómez, and H Pimienta-Jiménez. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*, 39(2):156–65, 2004.
- [15] A Lasek-Bal, H Jedrzejowska-Szypulka, S Student, A Warsz-Wianecka, K Zareba, P Puz, W Bal, K Pawletko, and J Lewin-Kowalik. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *J Physiol Pharmacol*, 70(2):209–217, 2019.
- [16] M Mendioroz Iriarte, E Cuadrado Godia, and J Montaner Villalonga. Biomarcadores plasmáticos en la enfermedad vascular cerebral isquémica. *Hipertensión y riesgo vascular*, 26(6):266–274, 2009.
- [17] Chu-Huai Chi, Yuan-Yuan Huang, Su-Zhen Ye, Meng-Meng Shao, Ming-Xia Jiang, Meng-Yao Yang, Qian Wu, Bei Shao, and Xian-Mei Li. Interleukin-10 level is associated with post-stroke depression in acute ischaemic stroke patients. *Journal of Affective Disorders*, 293:254–260, 2021.

- [18] Yifei Zhu, Haiqing Yang, Zengyan Diao, Yi Li, and Chuanzhu Yan. Reduced serum level of interleukin-10 is associated with cerebral infarction: a case-control and meta-analysis study. *Molecular Neurobiology*, 53:2698–2704, 2016.
- [19] Bahaa Saleh and Malvin Carl Teich. Guided-waves optics. In *Fundamentals of Photonics*, Wiley Series, chapter 9, pages 353–389. John Wiley & Sons, Inc., 3rd edition, 2019.
- [20] Bahaa Saleh and Malvin Carl Teich. Fiber optics. In *Fundamentals of Photonics*, Wiley Series, chapter 10, pages 391–430. John Wiley & Sons, Inc., 3rd edition, 2019.
- [21] 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.
- [22] Bandyopadhyay Sankhyabrata, Biswas Palas, Chiavaioli Francesco, Kumar Dey Tanoy, Basumallick Nandini, Trono Cosimo, Giannetti Ambra, Tombelli Sara, Baldini Francesco, and Bandyopadhyay Somnath. Long-period fiber grating: a specific design for biosensing applications. *Appl. Opt.*, 56(35):9846–9853, 12 2017.
- [23] Sergei A Vasil’ev, Oleg Igorevich Medvedkov, Ivan Gennad’evich Korolev, Andrei Sergeevich Bozhkov, Andrei S Kurkov, and Evgenii M Dianov. Fibre gratings and their applications. *Quantum electronics*, 35(12):1085, 2005.
- [24] Ashish M Vengsarkar, Paul J Lemaire, Justin B Judkins, Vikram Bhatia, Turan Erdogan, and John E Sipe. Long-period fiber gratings as band-rejection filters. *Journal of lightwave technology*, 14(1):58–65, 1996.
- [25] L Zhang, Y Liu, L Everall, JAR Williams, and I Bennion. Design and realization of long-period grating devices in conventional and high birefringence fibers and their novel applications as fiber-optic load sensors. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 5(5):1373–1378, 1999.

- [26] DD Davis, TK Gaylord, EN Glytsis, SG Kosinski, SC Mettler, and AM Vengsarkar. Long-period fibre grating fabrication with focused co2 laser pulses. *Electronics Letters*, 34(3):302–303, 1998.
- [27] VI Karpov, MV Grekov, EM Dianov, KM Golant, SA Vasiliev, OI Medvedkov, and RR Khrapko. Mode-field converters and long-period gratings fabricated by thermo-diffusion in nitrogen-doped silica-core fibers. In *OFC'98. Optical Fiber Communication Conference and Exhibit. Technical Digest. Conference Edition. 1998 OSA Technical Digest Series Vol. 2 (IEEE Cat. No. 98CH36177)*, pages 279–280. IEEE, 1998.
- [28] Sandra G Kosinski and Ashish M Vengsarkar. Splicer-based long-period fiber gratings. In *OFC'98. Optical Fiber Communication Conference and Exhibit. Technical Digest. Conference Edition. 1998 OSA Technical Digest Series Vol. 2 (IEEE Cat. No. 98CH36177)*, pages 278–279. IEEE, 1998.
- [29] Stephen W James and Ralph P Tatam. Optical fibre long-period grating sensors: characteristics and application. *Measurement science and technology*, 14(5):R49, 2003.
- [30] Francesco Chiavaioli, Francesco Baldini, Sara Tombelli, Cosimo Trono, and Ambra Giannetti. Biosensing with optical fiber gratings. *Nanophotonics*, 6(4):663–679, 2017.
- [31] Xianfeng Chen, Lin Zhang, Kaiming Zhou, Edward Davies, Kate Sugden, Ian Bennion, Marcus Hughes, and Anna Hine. Real-time detection of dna interactions with long-period fiber-grating-based biosensor. *Opt. Lett.*, 32(17):2541–2543, Sep 2007.
- [32] Flavio Esposito, Anubhav Srivastava, Lucia Sansone, Michele Giordano, Stefania Campopiano, and Agostino Iadicicco. Label-free biosensors based on long period fiber gratings: A review. *IEEE Sensors Journal*, 21(11):12692–12705, 2020.
- [33] William A Pulsinelli and JAMES B Brierley. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10(3):267–272, 1979.
- [34] WA Pulsinelli and AM Buchan. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, 19(7):913–914, 1988.

- [35] Helen R Kirby, Janet J Maguire, William H Colledge, and Anthony P Davenport. International union of basic and clinical pharmacology. lxxvii. kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(4):565–578, 2010.
- [36] Sadao Shiosaka and Yasuyuki Ishikawa. Neuropsin—a possible modulator of synaptic plasticity. *Journal of chemical neuroanatomy*, 42(1):24–29, 2011.
- [37] 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.
- [38] Wolfgang Ebeling, Norbert Hennrich, Michael Klockow, Harald Metz, Hans Dieter Orth, and Hermann Lang. Proteinase k from tritirachium album limber. *European Journal of Biochemistry*, 47(1):91–97, 1974.
- [39] Jonathon Shlens. A tutorial on principal component analysis. *arXiv preprint arXiv:1404.1100*, 2014.
- [40] Noemí Montoya Fraga. Evaluación morfológica y funcional de los efectos neuroprotectores del estradiol contra el daño cerebral inducido por hipoperfusión cerebral crónica, en ratas. Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México, 07 2016.
- [41] Renata Rusa, Nabil J Alkayed, Barbara J Crain, Richard J Traystman, Alane S Kimes, Edythe D London, Judy A Klaus, and Patricia D Hurn. 17β -estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke*, 30(8):1665–1670, 1999.

Apéndice

4.1. Benzoato de Estradiol y su efecto neuroprotector.

Montoya (2016) describe diversas alteraciones progresivas en el funcionamiento cerebral cuando hay una disminución significativa del flujo sanguíneo (hipoperfusión), las cuales incluyen reducción de la cantidad de neuronas piramidales del CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, gliosis (generación de cicatrices en el cerebro), deterioro de funciones cognitivas de aprendizaje y pérdida de memoria espacial y de trabajo, entre otras [40].

Además los resultados de muchos estudios experimentales han mostrado que el benzoato de estradiol ejerce efectos neuroprotectores en modelos de isquemias cerebrales tanto focal como global inducida en animales de modelo Murino. En ratas hembras estas lesiones se relacionan directamente con la deficiencia de estrógeno por padecimientos ováricos [41].

El estradiol previene el daño o promueve la recuperación de las funciones cognitivas, del aprendizaje y de la memoria. El pre-tratamiento con estradiol reduce la lesión al hipocampo y preserva la integridad funcional, disminuyendo las pérdidas de neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo [40].

En la figura 4.1 el grupo SHAM es la referencia tomando como 100 % la media de su población de neuronas, los grupos E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10 fueron tratados con estradiol conservando un 95 %, 88 % y 95 % de las neuronas después de la hipoperfusión. El grupo HCC-VEH no fue tratado con estradiol disminuyendo su población en un 30 % con respecto a la media de la referencia.

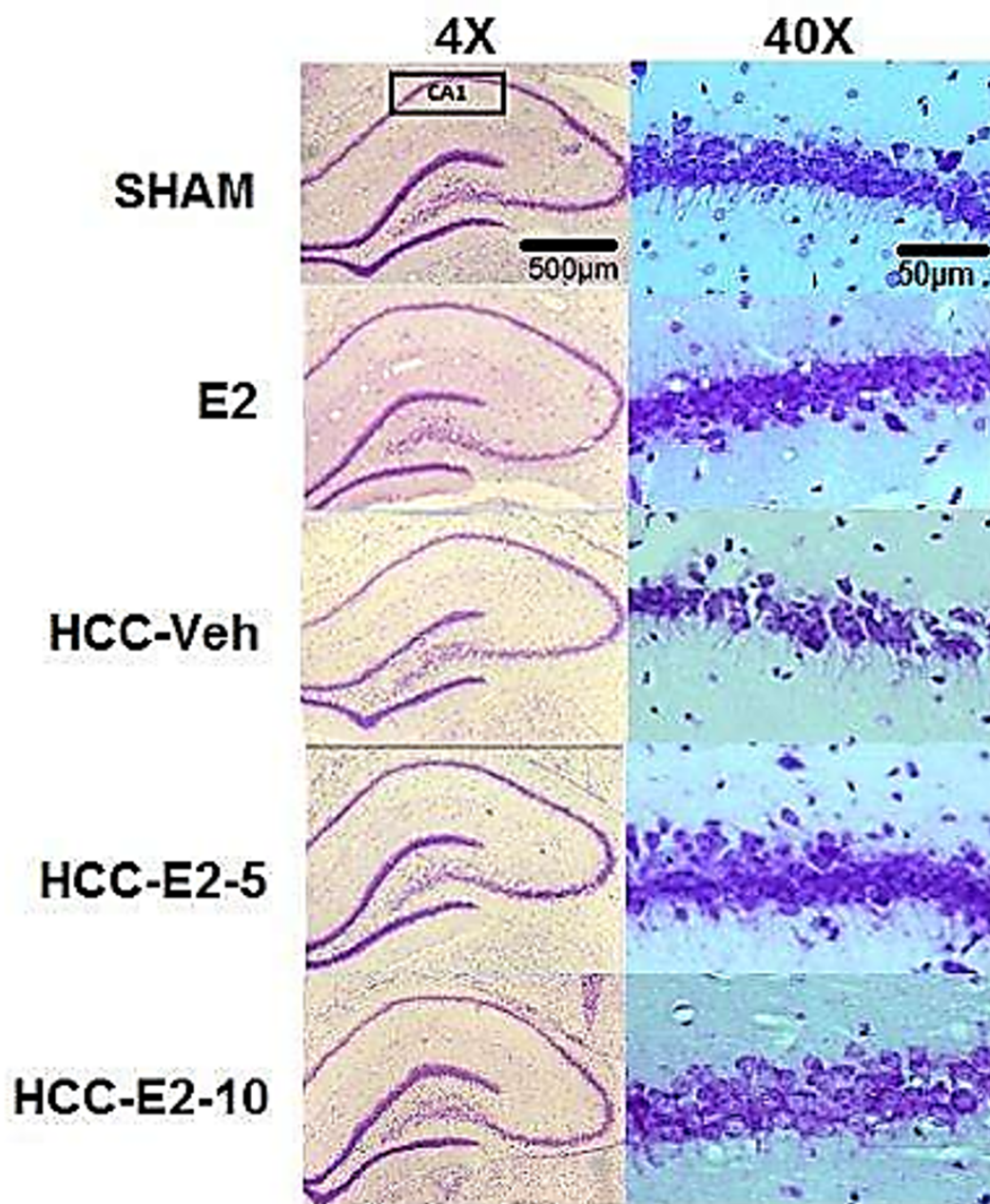


Figura 4.1: Fotomicrografías de la población neuronal del segmento CA1 del hipocampo[40].

4.2. Espectros de Transmisión

A continuación se brinda una vista aumentada de los espectros de transmisión normalizada de cada uno de los biosensores, presentados en la sección 3.2. En los espectros se denota: fibra con rejilla de periodo largo (línea en color rojo), hidroxilación de la superficie (línea en color verde), etapa de funcionalización (línea en color azul), activación (línea cian), inmovilización (línea en color magenta) y la detección (línea en color violeta).

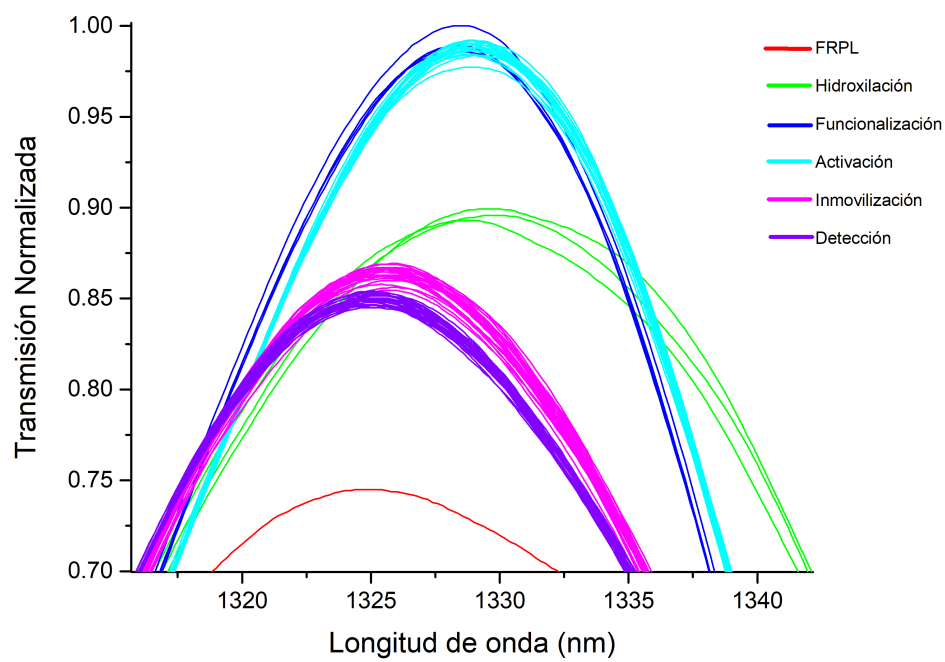


Figura 4.2: Transmisión Normalizada de Biosensor 1, estándar de IL-10.

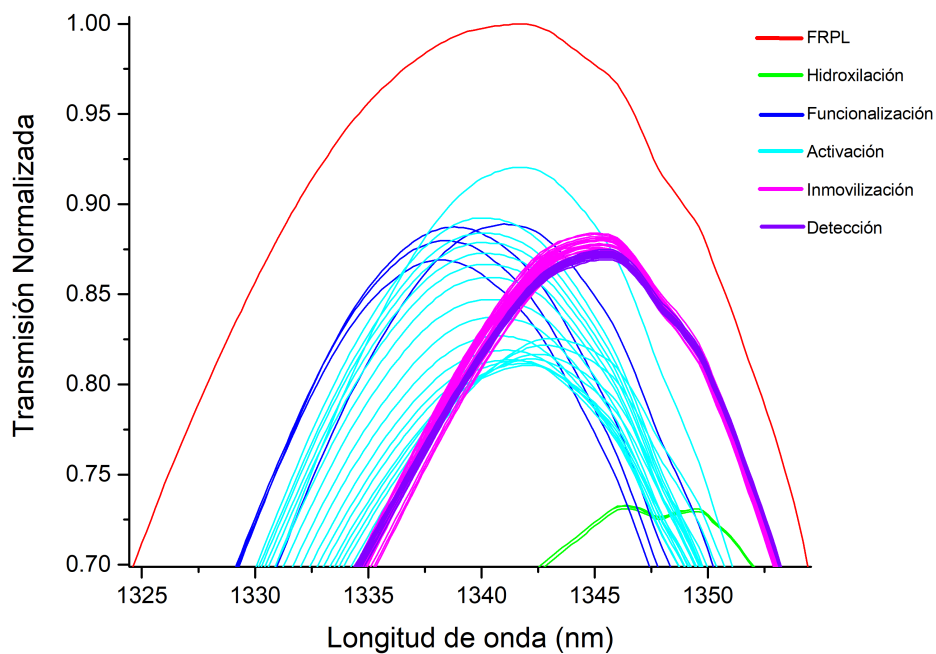


Figura 4.3: Transmisión Normalizada de Biosensor 2, suero de 2 hrs con tratamiento.

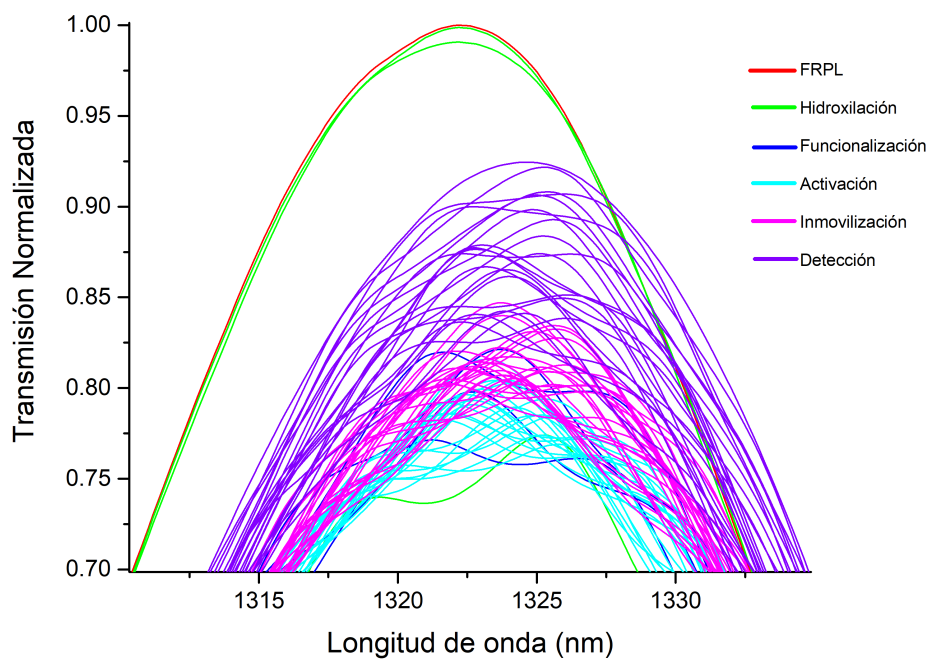


Figura 4.4: Transmisión Normalizada de Biosensor 3, suero de 2 hrs sin tratamiento.

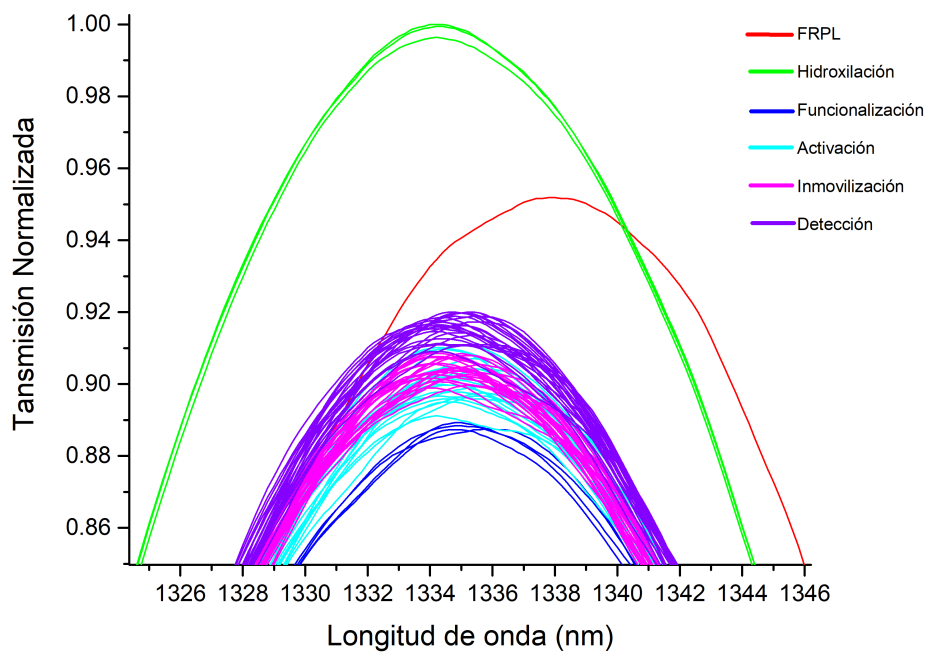


Figura 4.5: Transmisión Normalizada de Biosensor 4, suero de 6 hrs sin tratamiento.

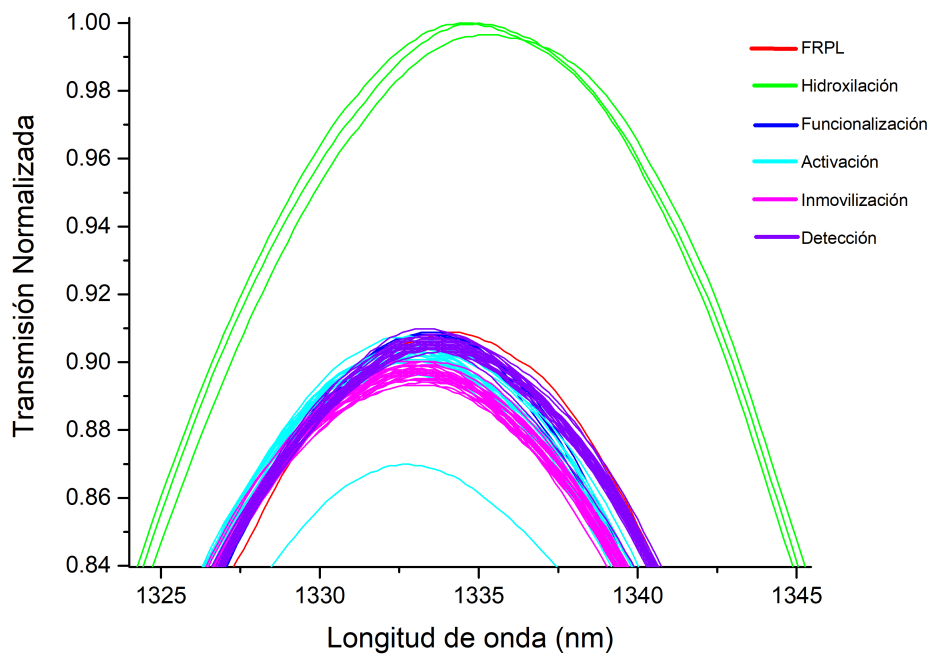


Figura 4.6: Transmisión Normalizada de Biosensor 5, suero $T=0$ hrs.

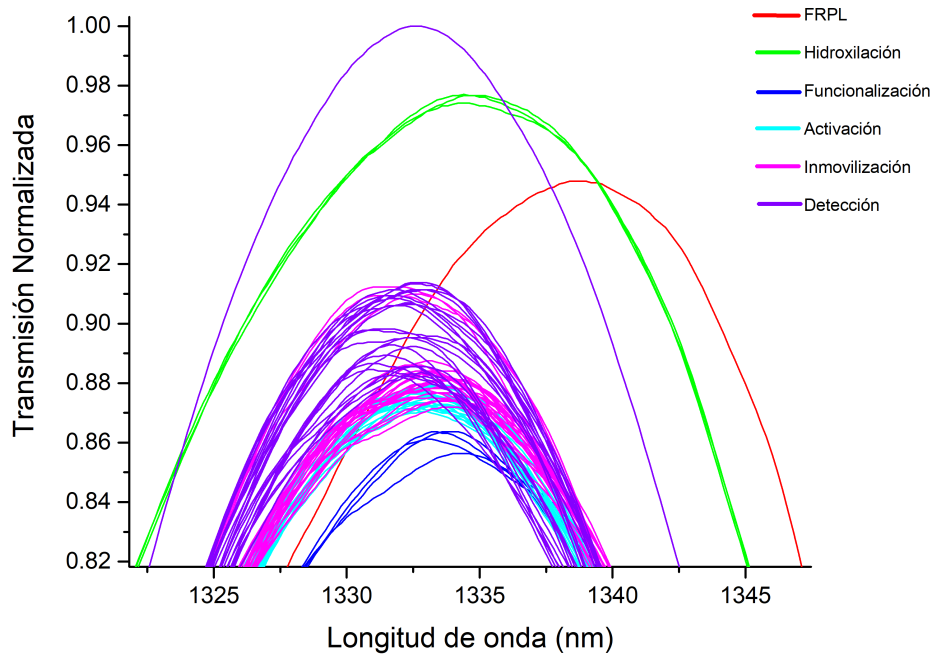


Figura 4.7: Transmisión Normalizada de Biosensor 6, Anticuerpo Kisspeptina.

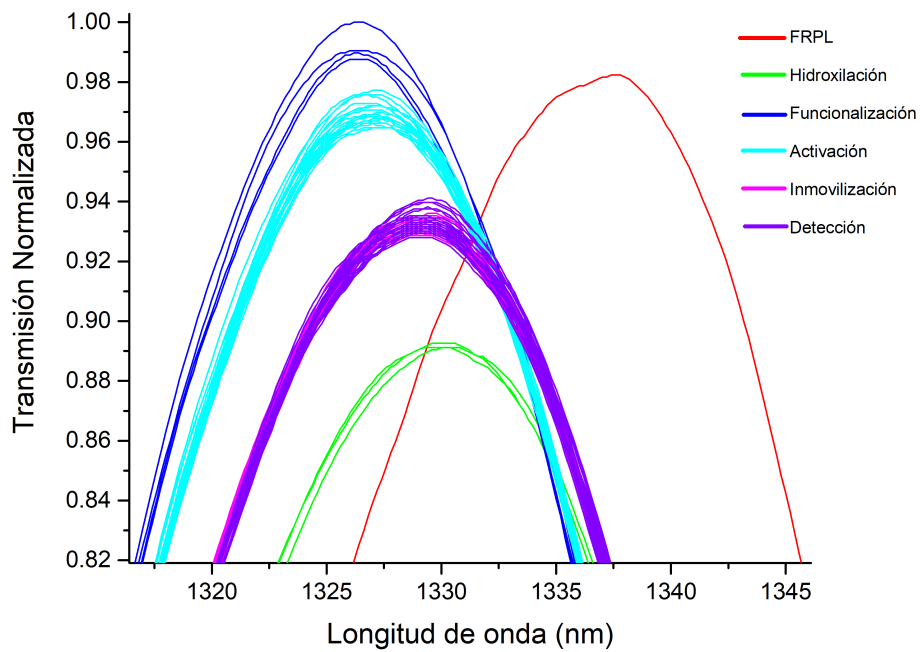


Figura 4.8: Transmisión Normalizada de Biosensor 7, Opsina OPN5.

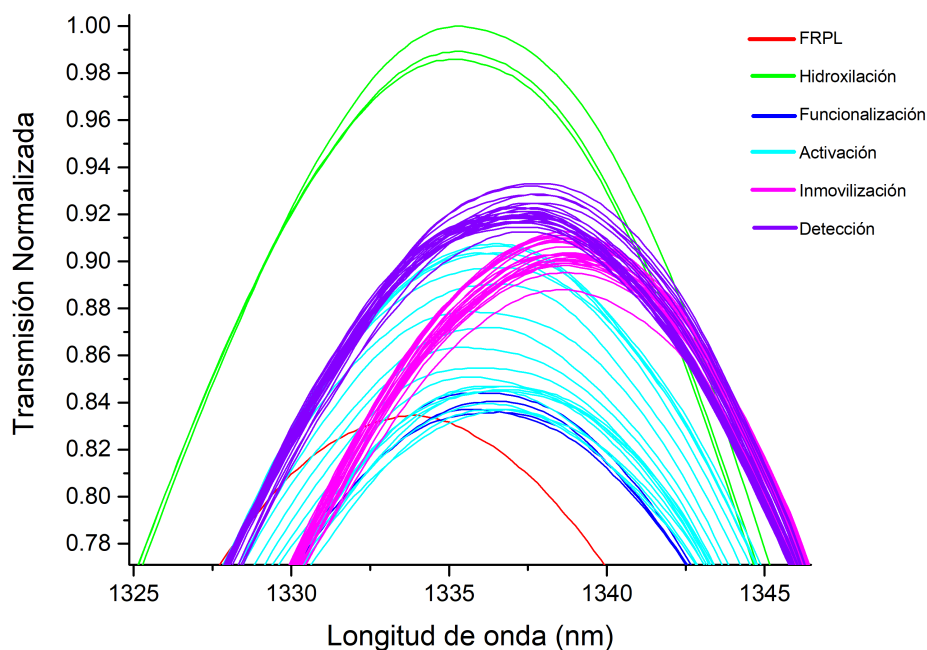


Figura 4.9: Transmisión Normalizada de Biosensor 8, Proteínasa K.

4.3. Análisis de componentes principales

A continuación se presentan las gráficas de PCA para cada uno de los biosensores. Para cada biosensor la gráfica *a)* muestra todas las etapas descritas en la metodología: hidroxilación (cuadros verdes), funcionalización (círculos azules), activación (triángulos cian), inmovilización (rombos magenta) y detección (pentágono violeta).

Para todos los biosensores, su gráfica *b)* muestra los tres componentes principales tanto de la inmovilización como de la detección. Se observa que hay un cambio debido al tiempo y se señala la dirección en la que sucede dicho cambio. El inicio de la flecha corresponde al tiempo cero minutos y la punta a los 120 minutos.

Como se puede apreciar, las gráficas nos muestran una clara discriminación entre etapas además de visualizar cómo se comportan las mediciones respecto al tiempo.

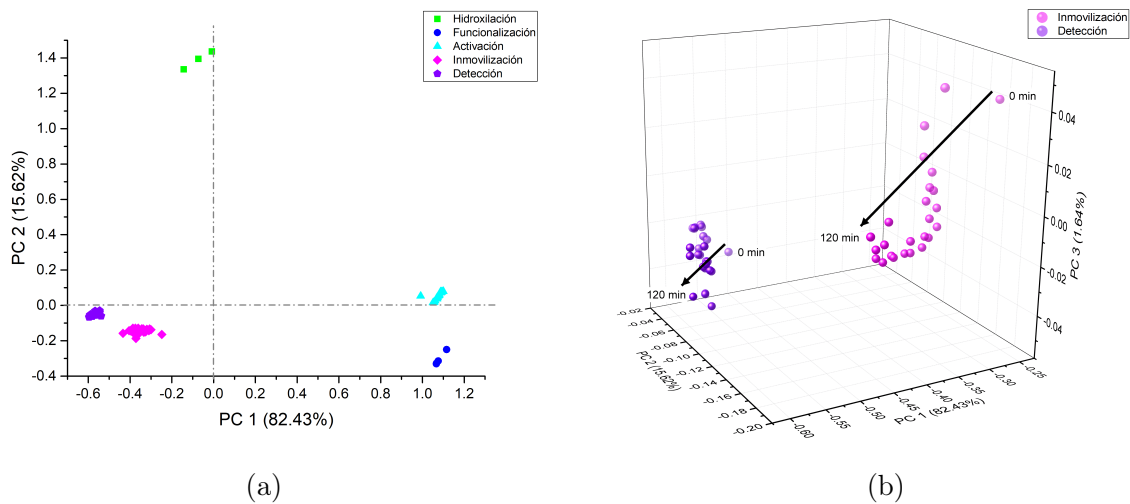


Figura 4.10: CPA para biosensor 1, STD-IL-10.

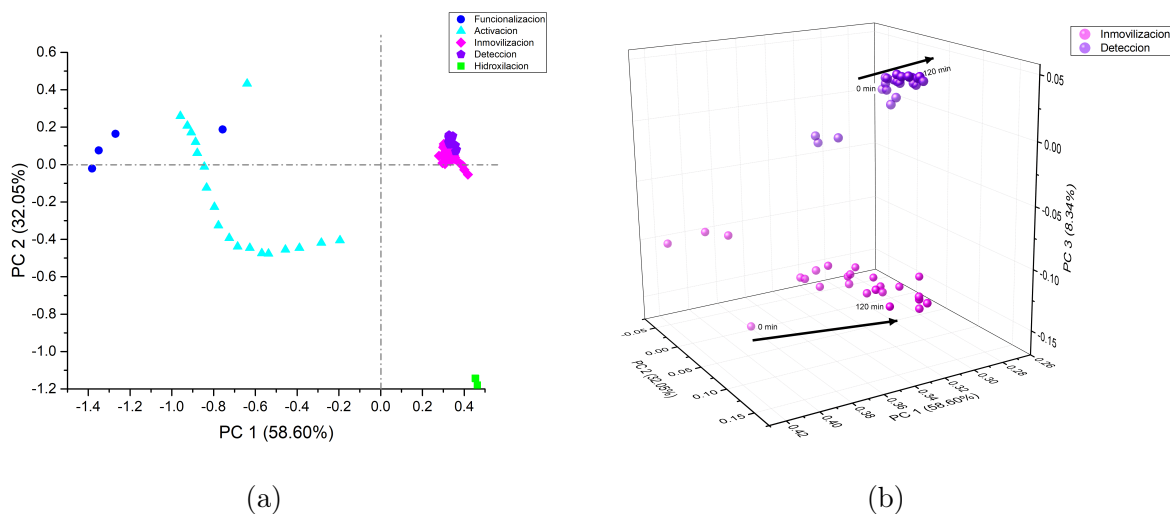
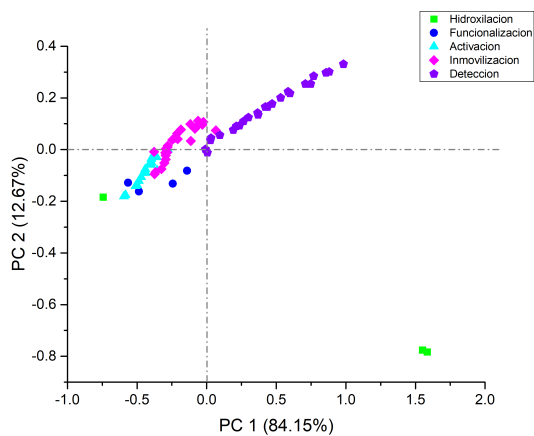
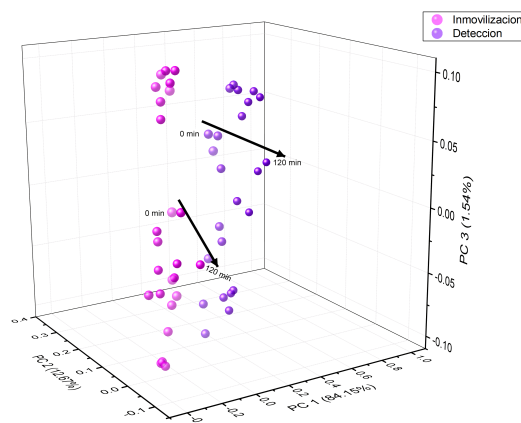


Figura 4.11: CPA para biosensor 2, suero de 2 hrs con tratamiento.

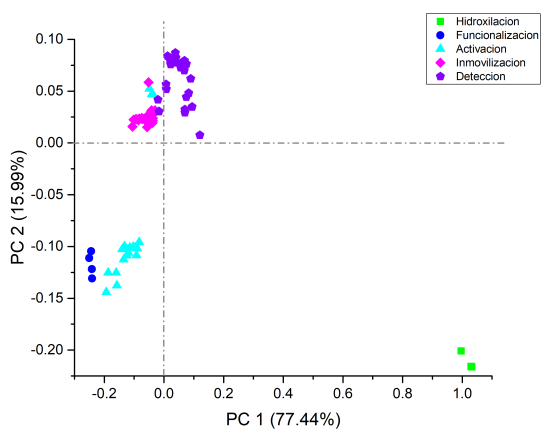


(a)

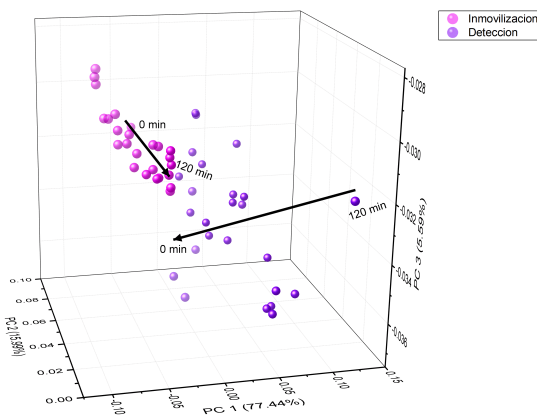


(b)

Figura 4.12: CPA para biosensor 3, suero de 2 hrs sin tratamiento.

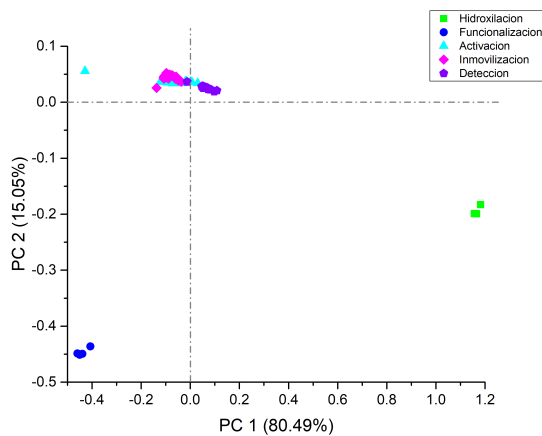


(a)

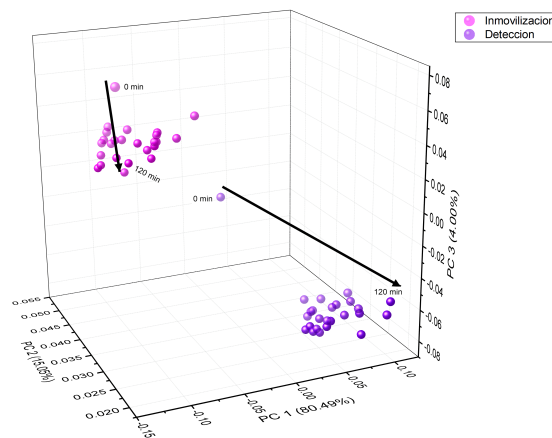


(b)

Figura 4.13: CPA para biosensor 4, suero de 6 hrs sin tratamiento.

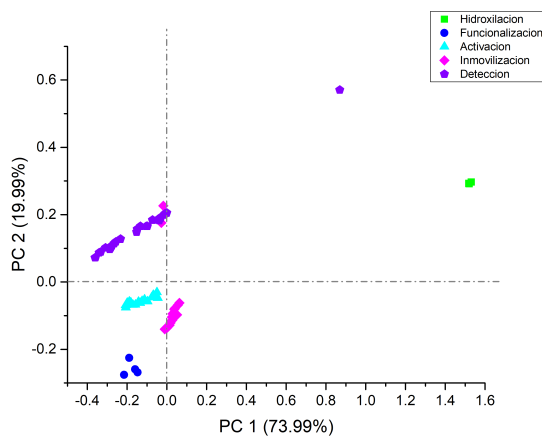


(a)

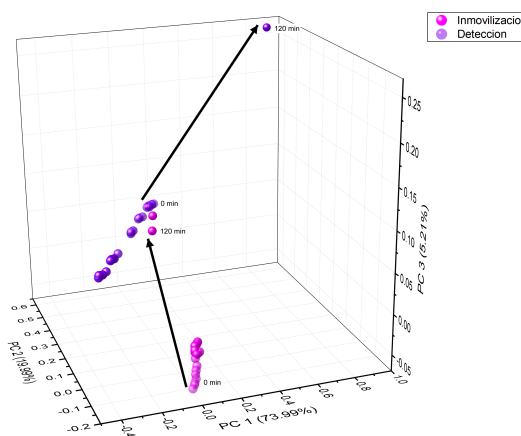


(b)

Figura 4.14: CPA para biosensor 5, suero de $T=0$.



(a)



(b)

Figura 4.15: CPA para biosensor 6, Anticuerpo Kisspeptina.

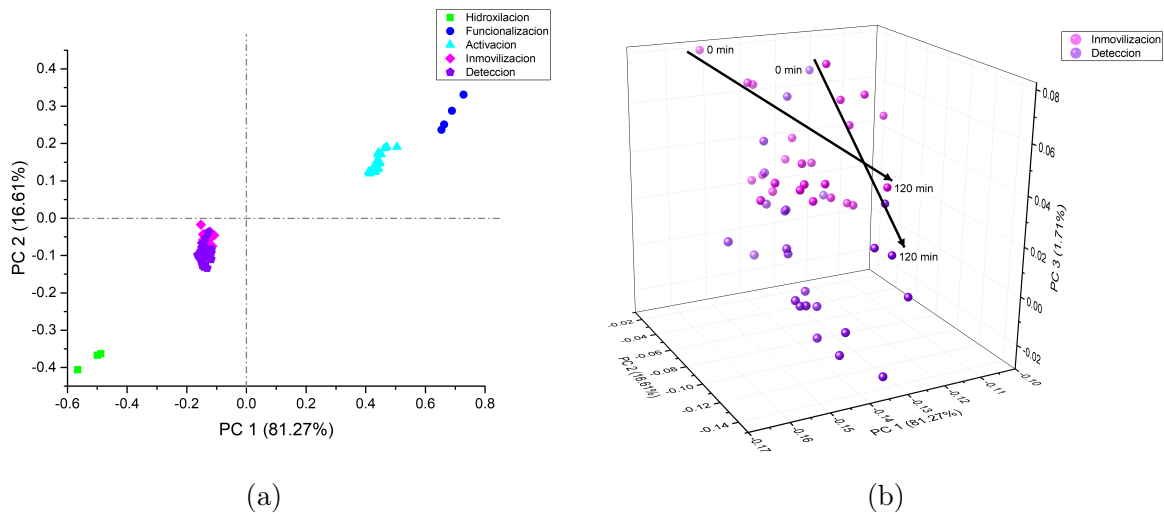


Figura 4.16: CPA para biosensor 7, Opsina OPN 5.

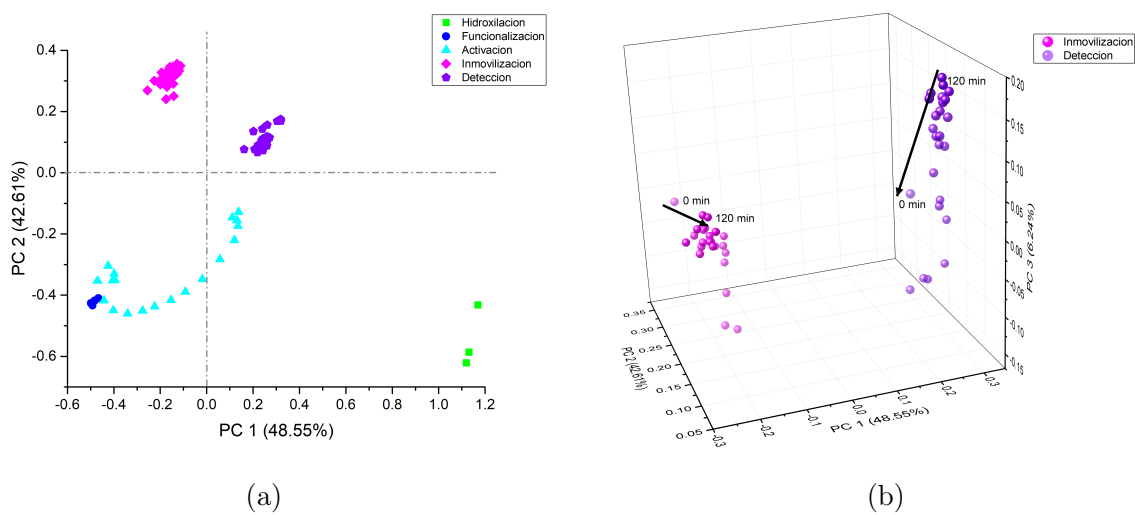


Figura 4.17: CPA para biosensor 8, Proteinas K.

4.4. Costos de cada etapa de fabricación

En la tabla se muestran el costo total para desarrollar un solo biosensor. Dicho costo fue calculado por cada etapa de fabricación de los biosensores que incluyen el costo de los reactivos y materiales usados.

Tabla 4.1: Costos de cada etapa para un biosensor.

FRPL	
Etapa	Costo (Pesos)
FO	2.1
Preparación de la matriz soporte	0
Hidroxilación	10.97
Funcionalización	57.1
Activación	5.7
Inmovilización	200
Total	275.87