



Benemérita Universidad Autónoma  
de Puebla



Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas

Desarrollo de biosensores en fibra óptica para la determinación  
de isquemia cerebral aguda en etapas tempranas en suero  
sanguíneo de modelo murino

Tesis presentada al

**Posgrado en Física Aplicada**

como requisito parcial para la obtención del grado de

**DOCTORADO EN CIENCIAS (FÍSICA APLICADA)**

por

**Karina González León**

asesorado por

**Dra. Georgina Beltrán Pérez (FCFM-BUAP)**

**Dr. Raúl Delgado Macuil (CIBA-IPN)**

Puebla, Pue.  
Julio 2025



# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>v</b>
<b>Acrónimos</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Teoría</b>	<b>5</b>
2.1. Fibras ópticas . . . . .	5
2.1.1. Ecuaciones de guía de onda para fibras de índice escalonado . . . . .	7
2.2. Fibra óptica adelgazada (TOF) . . . . .	9
2.3. Fibra con rejilla de periodo largo (LPFG) . . . . .	10
2.4. Interferencia de la luz . . . . .	12
2.5. Interferómetro de Mach-Zehnder (MZI) . . . . .	13
2.6. Teoría de Machine Learning: Técnicas No Supervisadas (PCA) y Técnicas Supervisadas (Clasificadores SVM) . . . . .	13
2.6.1. Análisis de componentes principales (PCA) . . . . .	14
2.6.2. Máquina de soporte vectorial (SVM) . . . . .	16
<b>3. Metodología</b>	<b>19</b>
3.1. Materiales . . . . .	19
3.1.1. Material Biológico: Inducción de isquemia cerebral y obtención de muestras . . . . .	19
3.2. Sistema de Transducción . . . . .	21
3.2.1. Fabricación del biosensor basada en TOF . . . . .	21
3.2.2. Fabricación del biosensor basado en LPFG y MZI . . . . .	22
3.3. Hidroxilación . . . . .	23
3.4. Funcionalización . . . . .	23
3.5. Activación . . . . .	23
3.6. Inmovilización . . . . .	24
3.7. Detección . . . . .	24
3.8. Microscopía óptica . . . . .	25
3.9. Espectroscopía de infrarrojo . . . . .	25
3.10. Transmisión . . . . .	27
<b>4. Resultados: Biosensores TOF</b>	<b>29</b>
4.1. Microscopía óptica . . . . .	29
4.2. Transmisión . . . . .	31
4.3. Conclusiones Parciales . . . . .	37

<b>5. Resultados: Biosensores en LPFG</b>	<b>39</b>
5.1. Microscopía óptica . . . . .	39
5.2. Transmisión . . . . .	40
5.3. Espectroscopía de infrarrojo en modo micro . . . . .	46
5.4. Conclusiones Parciales . . . . .	48
<b>6. Resultados: Biosensores en MZI</b>	<b>49</b>
6.1. Transmisión . . . . .	49
6.2. Espectroscopía de infrarrojo en modo micro . . . . .	61
6.2.1. Clasificador SVM . . . . .	64
6.3. Conclusiones Parciales . . . . .	68
<b>7. Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino</b>	<b>69</b>
7.1. Conclusiones Parciales . . . . .	80
<b>8. Conclusiones Generales</b>	<b>81</b>
<b>A. Código fuente en Python</b>	<b>83</b>
A.1. PCA . . . . .	83
A.2. SVM . . . . .	91
A.3. Matriz de confusión . . . . .	93
<b>B. Tablas</b>	<b>97</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>108</b>

# Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de muchos días de trabajo, pero no solo mío, sino también de todas las personas que me brindaron su apoyo a lo largo del camino. En particular, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

- A mis asesores de tesis, la Dra. Georgina Beltrán Pérez y el Dr. Raúl Delgado Macuil, por compartir generosamente su conocimiento, por su paciencia y por el acompañamiento constante durante este proceso. Agradezco profundamente que, como asesores, siempre me exigieran dar lo mejor de mí y me motivaran a superarme; su exigencia fue un impulso que me ayudó a crecer tanto académica como personalmente. Estoy profundamente agradecida, ya que sin su guía y dedicación, esta tesis no habría sido posible. Son para mí un ejemplo a seguir.
- Al Dr. Raúl Delgado Macuil, por facilitar mi traslado al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Muchas gracias por su apoyo.
- A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el apoyo económico brindado a través de la beca de manutención.

También expreso mi agradecimiento al Dr. Omar Montes Narváez por su constante disposición y amabilidad para aclarar mis dudas, así como al Dr. Moisés Zeleny Mora por sus valiosas enseñanzas en programación con Python y por el apoyo brindado para resolver los problemas técnicos que surgieron durante el desarrollo de mis programas.



# Acrónimos

<b>Anti-IL6</b>	Anticuerpo interleucina 6
<b>Anti-IL10</b>	Anticuerpo interleucina 10
<b>ERB</b>	Elemento de Reconocimiento Biológico
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>LPFG</b>	Long Period Fiber Grating (Fibra óptica con rejillas de periodo largo)
<b>MZI</b>	Mach-Zehnder fiber Interferometers (Interferómetro de Mach-Zehnder)
<b>OF</b>	Fibra Óptica
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis (Análisis de componentes principales)
<b>LPG</b>	Long Period Grating (Rejillas de periodo largo)
<b>SVM</b>	Support Vector Machine (Máquina de soporte vectorial)
<b>TOF</b>	Tapered Optical Fiber (Fibra óptica adelgazada)



# Resumen

La isquemia cerebral (IC) es una condición patológica en la que el cerebro sufre de una falta de oxígeno y glucosa en alguna porción (isquemia focal) o en toda la estructura cerebral (isquemia global). Estos episodios pueden ocurrir por una ruptura de los vasos sanguíneos (derrame o hemorragia cerebral) o por una obstrucción de los mismos, lo que se conoce como (infarto cerebral o IC), estos últimos generalmente son ocasionados por émbolos o trombos. Estos eventos desencadenan procesos moleculares y celulares provocando que las células del cerebro comiencen a morir ocasionando daño severo al cerebro, discapacidad motriz o cognitiva e incluso la muerte. En México el accidente cerebro vascular (ACV) representa un problema de salud pública, teniendo un incremento en la tasa de defunción de 25.2 % en el año 2000 a 28.3 % en el 2008. El ACV isquémico es el más común representando un 85 % del total de ACVs, se presenta en 4 de 10 pacientes con edad mayor a 75 años. Durante la IC, se pueden excretar interleuquinas (IL), que son proteínas elaboradas por los leucocitos, estas regulan el crecimiento celular, las respuestas inmunes e inflamatorias. Tal es el caso de la IL-6 que tiene propiedades proinflamatorias y la IL-10 que disminuye los procesos inflamatorios, contrarrestando los efectos nocivos del proceso isquémico.

El método más común para hacer la detección de las IL es por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). También se ha utilizado la técnica histológica el cual consiste en el análisis de fotomicrografías del segmento CA1 del hipocampo, debido a que en esta región se ve más representativo el daño isquémico porque ahí mueren primero las neuronas. Sin embargo, estos métodos requieren de más tiempo para el diagnóstico y además requieren de equipo especializado, por lo que el desarrollo de biosensores que nos permitan determinar la presencia de estas interleucinas en un menor tiempo y más económico son deseables. Por lo que las fibras ópticas han mostrado ser la mejor opción para el desarrollo de estos.

En este trabajo de tesis se desarrollaron biosensores basados en fibra óptica usando diferentes configuraciones tales como: fibras adelgazadas, rejilla de periodo largo grabada en fibra óptica y los interferómetros Mach-Zehnder basados en dos rejillas de periodo largo en cascada. En estas configuraciones se utilizó como elemento de reconocimiento biológico anticuerpos policlonales anti-interleucina 6 y 10 (Anti-IL6 y Anti-IL10). Los biosensores desarrollados permitieron detectar las interleucinas 6 y 10 (IL-6 e IL-10), en suero sanguíneo obtenido del modelo murino al cual se le indujo IC.

Tanto la IL-6 como la IL-10 son biomarcadores clave que reflejan el grado de daño celular asociado a la IC. Por ello, su cuantificación representa una herramienta potencial para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento del paciente. Para esto se realiza un estudio de la respuesta del modelo al fármaco de benzoato de estradiol (EB, por sus siglas en inglés). Este ha mostrado ser un excelente neuroprotector y tiene propiedades antiinflamatorias. Por lo tanto, se administró EB como tratamiento, al modelo murino con una dosis de 4 mg/kg, 30 minutos antes de la inducción de la IC. El EB ayuda a la expresión de la IL-10 y reduce la inflamación (IL-6) post-isquémica. Este estudio nos permitió estudiar la evolución temporal de la respuesta inflamatoria (IL-6) y antiinflamatoria (IL-10) tras la inducción de la IC.

La determinación de la homogeneidad estructural del biosensor, en cada una de las etapas del ensamblaje, se realizó por espectroscopía infrarroja, que permitió determinar la unión química de las moléculas en la superficie de la fibra óptica adelgazada y en la fibra con rejilla de periodo largo; mientras que la homogeneidad morfológica se verificó por medio de por microscopía óptica. La presencia de IL-6 e IL-10 se determinó por análisis de la señal de transmisión a la salida del biosensor.

Se caracterizó la respuesta de los biosensores utilizando la IL-6 y la IL-10 como analito, determinando la presencia de estas en muestras de suero sanguíneo obtenidas del modelo murino con IC con tratamiento (EB) y sin tratamiento inducido. Los espectros obtenidos por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), las variaciones de amplitud y los desplazamientos espectrales en las señales de transmisión a la salida de los biosensores mostraron la inmovilización de IL-6 e IL-10.

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), a partir de estos resultados observamos las tendencias de los espectros medidos usando todo el rango espectral de los datos medidos. También se aplicó un clasificador de máquinas de soporte vectorial (SVM, por sus siglas en inglés) para la clasificación de las muestras con y sin tratamiento en distintos tiempos de incubación. Esta estrategia alcanzó una exactitud superior al 90 %, confirmando la precisión del método. Además, el uso del kernel lineal y gaussiano facilitó la identificación de patrones. La caracterización estructural y microscópica del biosensor mostró que el autoensamblaje fue satisfactorio. En cada etapa del autoensamblaje se obtuvo homogeneidad estructural y morfológica; y fue posible detectar las proteínas (IL-6 e IL-10) de manera eficiente.

Finalmente, el uso de estas herramientas de machine learning tales como PCA y SVM fueron muy eficientes para el análisis y clasificación de las respuestas obtenidas a partir de los biosensores desarrollados, aumentando su potencial en aplicaciones biomédicas para la detección de biomarcadores como la IL6 y IL-10, así como para la monitorización continua en tiempo real y el desarrollo de biosensores inteligentes.

# Capítulo 1

## Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los accidentes cerebro vascular (ACV) suelen ser agudos porque impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro. Los factores de riesgo de los ACV son una combinación del tabaquismo, las dietas malsanas y la obesidad, la inactividad física, el consumo nocivo de alcohol, la hipertensión arterial, la diabetes y la hiperlipidemia [1].

Para reducir los daños de un ACV es muy importante reconocer los siguientes síntomas:

- Dificultad para caminar, coordinar movimientos o hablar
- Visión borrosa o limitada
- Vértigo
- Mareo
- Adormecimiento de la cara
- Piernas o brazos entumecidos o adormecidos

En particular, la isquemia cerebral (IC) es una condición donde el cerebro sufre de una falta de oxígeno en alguna área del cerebro, cuando las arterias se rompen o cuando las arterias se tapan. Esto provoca que haya una disminución de glucosa y se desencadenen procesos que van a terminar en muerte celular en estructuras cerebrales involucradas en las funciones cognitivas. De aquí surge la importancia del estudio de procedimientos de neuroprotección para prevenir o reducir el daño cerebral inducido por la IC [2]. Ante la presencia de una IC se pueden excretar interleuquinas (IL), que son proteínas elaboradas por los leucocitos que regulan el crecimiento celular y las respuestas inmunes e inflamatorias. Tal es el caso de la interleucina-6 (IL-6) que tiene propiedades proinflamatorias y la interleucina-10 (IL-10) que disminuye los procesos inflamatorios [3] [4].

La IL-10 es un biomarcador que nos ayuda a determinar la disminución del daño celular causado por muchas enfermedades como la IC [5, 6] y puede ser una herramienta potencial para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento del paciente. Por otro lado, la detección de IL-6 sería un indicador relevante de inflamación aguda y crónica. Ambas interleucinas representan herramientas potenciales para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes, ya que proporcionan información complementaria sobre el estado y progresión de la enfermedad. Durante una IC, se ha demostrado por estudios clínicos y experimentales la marcada sobreexpresión de IL-6 en el cerebro. En las diferentes etapas de la isquemia la IL-6 desempeña dos funciones distintas. Durante la fase aguda de la IC, la IL-6 funciona principalmente como una citocina inflamatoria y puede contribuir tanto

a la lesión como a la reparación isquémica. Y en la fase subaguda la mayor expresión de IL-6 está asociado con la neuroprotección es decir, la IL-6 posiblemente tiene efectos importantes de reparación y regeneración [7]. Por otro lado, se ha demostrado que el benzoato de estradiol (EB) disminuye las concentraciones de IL-6 y aumenta las concentraciones de IL-10 en modelos murinos inducidos a un evento isquémico, esto debido a que tiene efectos neuroprotectores [8, 9].

El método más usado para la detección de las IL es por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), donde se hace la detección de los anticuerpos específicos de estas IL. También se ha utilizado la técnica histológica en donde se analizan fotomicrografías del segmento CA1 del hipocampo, debido a que en esta región se ve más representativo el daño isquémico porque ahí mueren primero las neuronas. De esta manera es posible observar la reducción de la población neuronal por efecto de la IC y su preservación por efecto del tratamiento con EB [8]. Sin embargo esta técnica molecular es algo tediosa y consume tiempo y recursos. Por lo tanto es importante el estudio de nuevas técnicas de detección de las concentraciones específicas para la IL-6 e IL-10 que son biomarcadores de daño celular.

Por esta razón, en este trabajo proponemos el uso de fibra óptica (OF por sus siglas en inglés) estándar y emplear configuraciones simples como fibra óptica adelgazada (TOF, por sus siglas en inglés) formados con ataque químico, rejillas de periodo largo grabadas en OF (LPFG por sus siglas en inglés) con el método de arco eléctrico e interferómetros de Mach-Zehnder (MZI) utilizando dos LPG en cascada para detectar interleucinas (IL-6 e IL-10). Estos tipos de biosensores han tenido numerosas aplicaciones debido a que la evolución de los espectros de transmisión permiten determinar la respuesta y funcionamiento de los biosensores en función del tiempo [10–15].

Los biosensores son dispositivos que proporcionan información a partir de reacciones bioquímicas específicas por medio de elementos biológicos para detectar compuestos químicos por señales eléctricas, térmicas u ópticas, entre otras [16]. El biosensor está conformado por un sistema de transducción y un elemento de reconocimiento biológico (ERB), de tal manera que al entrar en contacto directo el ERB con el compuesto químico que nos interesa detectar (llamado analito), se generará una reacción físico-química la cual se detectará en el transductor, convirtiendo la interacción en una señal cuantitativa o cualitativa.

Existen diferentes tipos de transductores: óptico, electroquímico, piezoeléctrico, magnético y mecánico, y existen dos tipos de elementos de reconocimiento: catalítico (enzimas, células, tejidos) y afinidad (anticuerpos, proteínas) y dependiendo del tipo de transductor y el ERB que se esté utilizando definirá el tipo de biosensor [16, 17]. Los biosensores de OF son dispositivos en los que la propia fibra actúa como elemento transductor y aprovechan sus propiedades únicas para proporcionar una plataforma versátil y altamente sensible para la detección de sustancias químicas y biológicas [18].

Los biosensores que utilizan como ERB anticuerpos o proteínas, tienen alta afinidad y especificidad para detectar analitos de interés, es decir tienen la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros elementos están presentes [16, 17, 19–22]. Los biosensores basados en OF que utilizan como transductor la OF son denominados biosensores ópticos. Estos permiten relacionar la concentración del analito de interés con los cambios en las características de luz propagada a través de la guía de onda, esto al detectar el cambio en el índice de refracción de una solución, lo que permitiría obtener información en tiempo real [23, 24].

En la actualidad se han desarrollado biosensores ópticos que utilizan diferentes métodos para aumentar la sensibilidad en la zona de la cubierta como los interferómetros de fibra [25, 26], rejillas de Bragg de fibra grabada/inclinada [27], rejillas de periodo largo (LPFG) [28], dispositivos de resonancia de plasmón superficial [29], sensor de rejilla de fibra de periodo largo de doble resonancia [30] y Tapers Ópticos (TOF) [31]. Sin embargo, en muchas de estas configuraciones se utilizan fibras especiales, lo que incrementa los costos de estos biosensores.

En el caso de TOF la onda evanescente puede interactuar con el medio externo [15], mientras que en los biosensores desarrollados en LPFG y MZI se incrementa la sensibilidad debido a que cuando cambia el índice de refracción del medio circundante, también se modifica el índice de refracción efectivo de la cubierta, lo que conduce a un desplazamiento o atenuación en la banda central [12–14].

En este trabajo se desarrollaron tres tipos de biosensores de fibra óptica estándar que utilizan configuraciones sencillas, como la fibra óptica adelgazada (TOF) formado con ataque químico (Bio-TOF), LPFGs grabados con el método de arco eléctrico (Bio-LPFG) e MZI formados con dos LPFGs en cascada (Bio-MZI) para la detección de IL-6 e IL-10. Estos biosensores se inmovilizaron con los anticuerpos policlonales (Anti-IL6 y Anti-IL10) como ERB, esto permitió la detección de IL-6 e IL-10. En todos los casos, la OF actuó como matriz soporte del sistema de transducción, lo que nos ayudó a observar los cambios de amplitud y corrimiento espectral de las señales transmitidas.

Los biosensores desarrollados en este trabajo detectaron la presencia de las IL-6 e IL-10 en el suero sanguíneo obtenido del modelo murino post-isquémico. A un grupo del modelo se le suministró tratamiento de EB y se evaluó la respuesta a este fármaco a diferentes horas post-isquemia. El ERB utilizado para cada IL (IL-6 e IL-10) reconoció al analito directamente en la muestra biológica, así como los estándares de las interleucinas que fueron compradas.

El ensamblaje y caracterización de los biosensores se realizó en el laboratorio de Nanobiotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN, y el análisis del funcionamiento del biosensor basado en OF se realizó en el Laboratorio de optoelectrónica y electrónica de la FCFM BUAP. Y las muestras de suero sanguíneo fueron extraídas de modelos murinos del bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y del CINVESTAV.

Los objetivos de esta tesis son los siguientes:

- **OBJETIVO GENERAL**

- Generar sistemas de biosensores basados en OF (TOF, LPFG y MZI) para determinar metabolitos de interés IL-6 e IL-10 en suero sanguíneo obtenido del modelo murino con isquemia.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y METAS**

- **Objetivo 1.** Desarrollar un protocolo experimental para la clasificación de las interleucinas, IL-6 e IL-10 en isquemia cerebral aguda inducida en modelos murinos mediante el uso de biosensores basados en fibra óptica.
- **Objetivo 2.** Caracterizar las respuestas de los biosensores desarrollados analizando el suero sanguíneo obtenido del modelo murino post-isquemia con tratamiento de EB y sin tratamiento.
- **Objetivo 3.** Analizar los resultados obtenidos por FTIR-ATR, micro infrarrojo por reflectancia y compararlos con los resultados obtenidos por transmitancia.
- **Objetivo 4.** Utilizar las técnicas de Machine Learning tales como PCA y SVM para determinar las respuestas de los biosensores desarrollados.



## Capítulo 2

# Teoría

### 2.1. Fibras ópticas

Una fibra óptica (por sus siglas en inglés, OF) es una guía de onda dieléctrica cilíndrica a través de la cual se propaga la onda de luz. La OF tiene un núcleo central con índice de refracción  $n_1$  y una cubierta cuyo índice de refracción es  $n_2$  menor a  $n_1$  (ver Fig. 2.1). El índice de refracción cuantifica la velocidad de propagación de una onda en un medio en relación a la velocidad de la luz en el vacío.

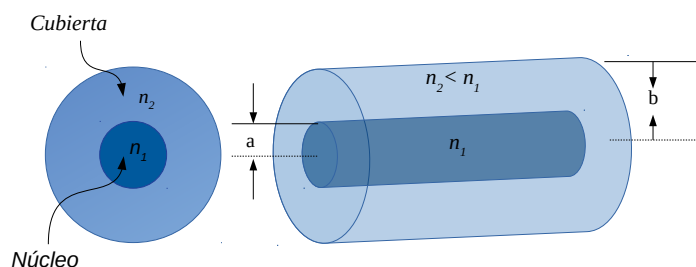


Figura 2.1: Fibra óptica: onda dieléctrica cilíndrica.

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

Un haz de luz al incidir en el núcleo de la fibra desde un medio de índice de refracción  $n_0$  en un ángulo  $\theta_0$  con respecto al eje de la fibra, incide en la interfaz núcleo-cubierta a un ángulo normal  $\phi$ . Los haces de luz que inciden en el límite del revestimiento del núcleo en ángulos mayores que el ángulo crítico se reflejan y son guiados a través del núcleo sin refracción. Los haces de mayor inclinación al eje de la fibra pierden parte de su potencia en la cubierta en cada reflexión y no son guiados, figura 2.2 (b).

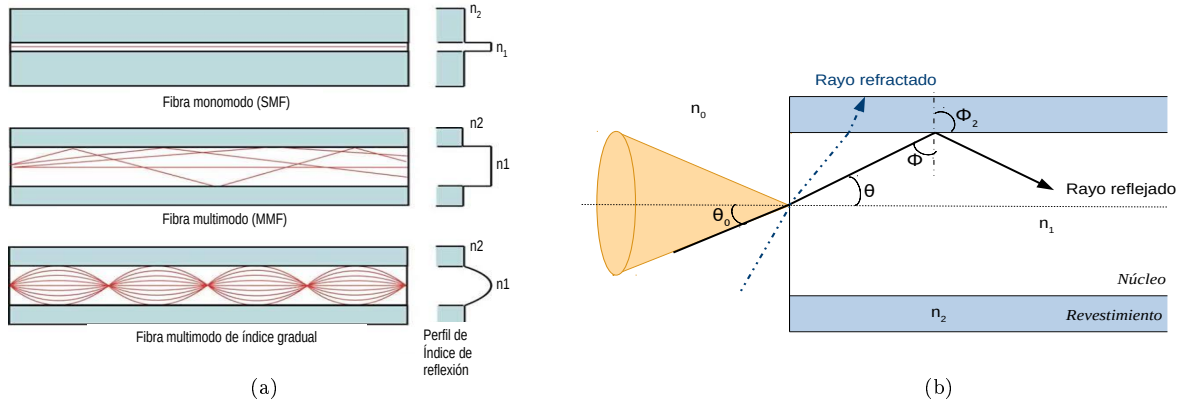


Figura 2.2: (a) Comparación del perfil del índice de refracción de SMF, MMF y de índice grabado. (b) Haz incidente en el núcleo.

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

$$\frac{\sin \phi}{\sin \phi_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.1)$$

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

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

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

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

si aplica la ley de Snell en el límite aire-núcleo, donde  $n_0 = 1$ , el ángulo  $\theta_0$  en el aire correspondiente al ángulo  $\theta$  en el núcleo se obtiene a partir de

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

por lo tanto el ángulo de aceptación de la fibra es

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

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

$$NA = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (2.4)$$

### 2.1.1. Ecuaciones de guía de onda para fibras de índice escalonado

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

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

donde  $U$  representa cualquiera de las componentes cartesianas de los campos eléctricos o magnéticos y  $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ ,  $n = n_1$  en el núcleo ( $r < a$ ) y  $n = n_2$  en el cubierta ( $r > a$ ). Suponemos que el radio  $b$  de la cubierta (ver Fig. 2.2 (b)) es lo suficientemente grande como para asumir con seguridad que es infinito al examinar la luz guiada en el núcleo y cerca del límite del revestimiento del núcleo. Utilizando el laplaciano en coordenadas cilíndricas,

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

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

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

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

Tomando en cuenta que nos interesan las soluciones que toman la forma de onda que viajan en la dirección  $z$  con una constante de propagación  $\beta$ , de modo que la dependencia  $z$  de  $U$  es de la forma  $\exp(-j\beta z)$ . Dado que  $U$  debe ser una función periódica del ángulo  $\phi$  con período  $2\pi$ , se asume que la dependencia de  $\phi$  es armónica  $\exp(-jl\phi)$ , donde  $l$  es un número entero.

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

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

donde

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

al sustituir se tiene,

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

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

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

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

$$\begin{aligned}
\blacksquare k_T^2 &= n_1^2 k_0^2 - \beta^2 \\
\blacksquare \gamma^2 &= \beta^2 - n_2^2 k_0^2
\end{aligned}$$

al sustituir en la ecuación (2.7) se tiene;

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

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

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

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

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

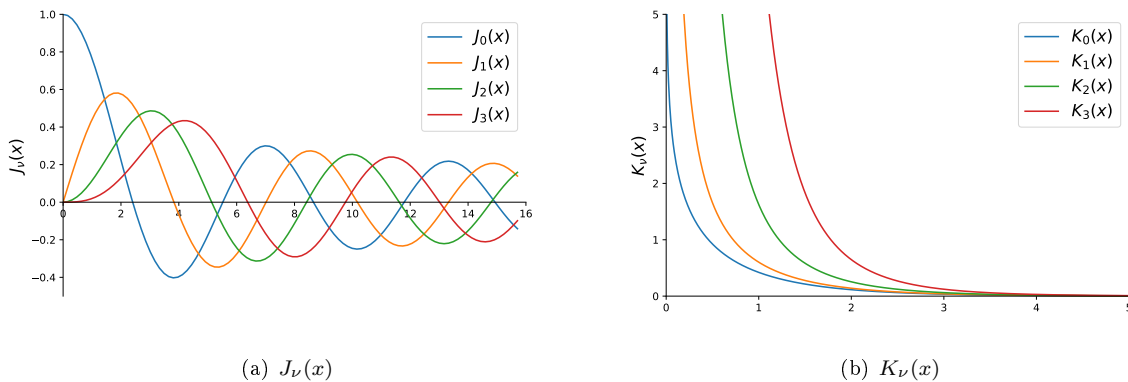


Figura 2.3: Variaciones de la función Bessel  $J_\nu(x)$  y  $K_\nu(x)$  para los cuatro primeros órdenes ( $\nu=0,1,2,3$ ).

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

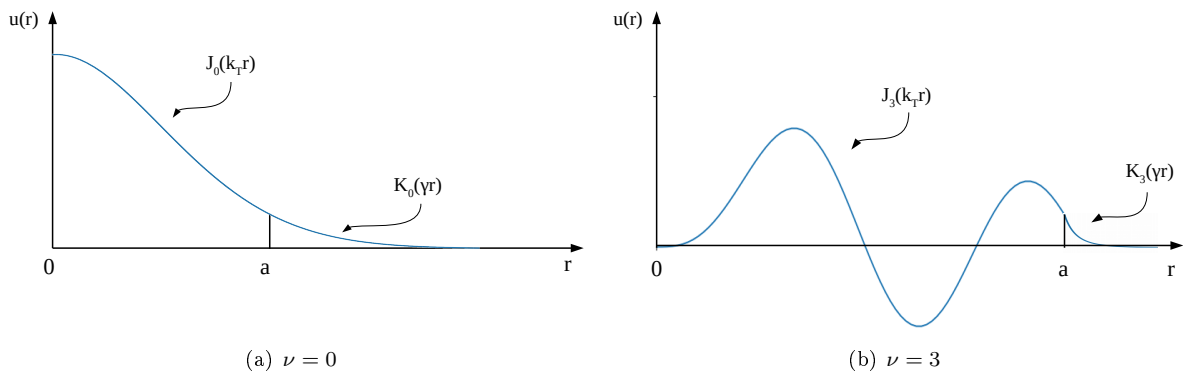


Figura 2.4: Ejemplo de la distribución radial de  $u(r)$  para  $\nu = 0, 3$ .

## 2.2. Fibra óptica adelgazada (TOF)

El funcionamiento de los sensores TOF o de campo evanescente se basa en la interacción directa entre el elemento a medir y los campos evanescentes generados en la interfaz núcleo-cubierta de las fibras ópticas. Generalmente, la profundidad de penetración de los campos evanescentes es menor que el grosor de la cubierta, aunque una forma de acceder a estos campos es reduciendo el diámetro de la fibra. El campo que se propaga en el núcleo y el campo evanescente que se propaga en la cubierta y sus amplitudes vienen dados por la Ec. 2.11 [32].

$$u(r) \propto \begin{cases} J_l(k_T r), & r \leq a \quad (\text{Núcleo}) \\ K_l(\gamma r), & r \geq a \quad (\text{Cubierta}) \end{cases} \quad (2.11)$$

donde  $J_l(x)$  es una función de Bessel de primera clase de orden  $l$  y  $K_l(x)$  es la función de Bessel modificada de segunda clase de orden  $l$ . La función  $J_l(x)$  oscila como la función seno o coseno pero con una amplitud decreciente. Mientras la función  $K_l(x)$  decae exponencialmente a lo largo de  $x$  (ver Fig. 2.5) [33].

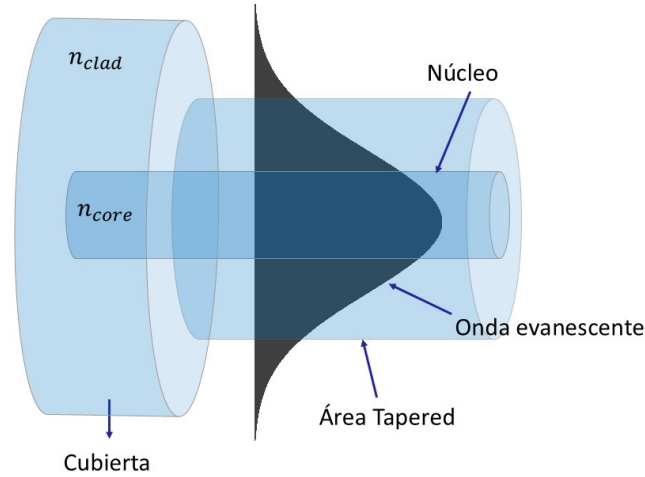


Figura 2.5: Esquema del área adelgazada.

Los parámetros  $k_T$  y  $\gamma$  determinan la tasa de cambio del campo  $u(r)$  en el núcleo y en el revestimiento, respectivamente. El parámetro  $\gamma$  está definido como:

$$\gamma = \sqrt{\beta^2 - n_s^2 k_0^2} \quad (2.12)$$

donde  $\beta$  es la constante de propagación del modo y se define como  $\beta = n_{\text{eff}} k_0$ ;  $n_s$  es el índice de refracción de la película sensora o de la cubierta;  $n_{\text{eff}}$  es el índice de refracción efectivo del modo propagante; y  $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$  es el número de onda en el vacío, con  $\lambda_0$  siendo la longitud de onda de la luz en el espacio libre.

La profundidad de penetración ( $d_p$ ) del campo evanescente está relacionada con  $\gamma$  como se muestra en la Ec. 2.13 [32, 34].

$$d_p = \frac{1}{\gamma} = \frac{1}{k_0 \sqrt{n_{\text{eff}}^2 - n_s^2}} \quad (2.13)$$

### 2.3. Fibra con rejilla de periodo largo (LPFG)

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

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

Una LPFG es una modulación periódica del índice de refracción a lo largo del eje longitudinal de la OF, provocando cambios del valor del índice de refracción del núcleo y de la cubierta de una OF. El periodo de la modulación se designa comúnmente con la letra griega  $\Lambda$ , ver figura 2.6. Normalmente, el periodo de modulación  $\Lambda$  del índice de refracción en una LPFG tiene un periodo entre 100 y 1000  $\mu\text{m}$ . Los métodos más populares para el grabado de las LPFG son las siguientes: fabricación por radiación UV, láser de  $\text{CO}_2$ , arco eléctrico y métodos mecánicos.

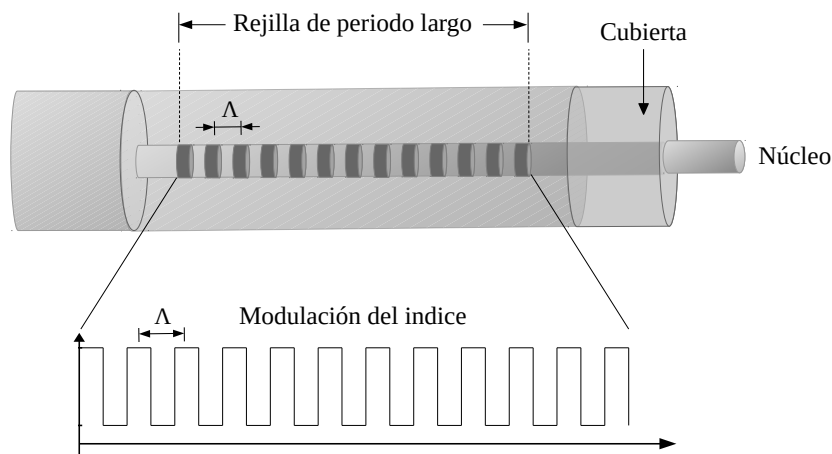


Figura 2.6: Fibra con rejilla de periodo largo (LPFG).

Cuando cambia el índice de refracción del medio circundante, también se modifica el índice de refracción efectivo de la cubierta, lo que conduce a un desplazamiento o atenuación en la banda central del espectro de transmisión. Por el contrario, las interacciones biomoleculares que tienen lugar alrededor de la superficie de un transductor permanecen confinadas dentro de las capas de espesor finito. Por tanto, una LPFG juega un papel importante en la detección física, química y biológica [35,36].

Además, la LPFG tiene la capacidad de acoplar los modos ópticos desde el núcleo de la fibra a la cubierta y de producir una o más bandas de atenuación en la transmisión de la fibra [37] centradas en las longitudes de onda  $\lambda_m$  (Figura 2.7), descritas por la siguiente ecuación,

$$\lambda_m = [n_{core} - n_{clad}^m] * \Lambda \quad (2.14)$$

donde  $\lambda_m$  es el pico de longitud de onda que está acoplado en los modos de la cubierta,  $n_{core}$  y  $n_{clad}^m$  son los índices de refracción del núcleo y la cubierta, respectivamente, y  $\Lambda$  es el periodo de rejilla. Esta función se puede utilizar para diseñar una LPFG basado en biosensores, ya que este dispositivo es más sensible a los cambios en el índice de refracción externo, que está relacionado con un material de recubrimiento externo.

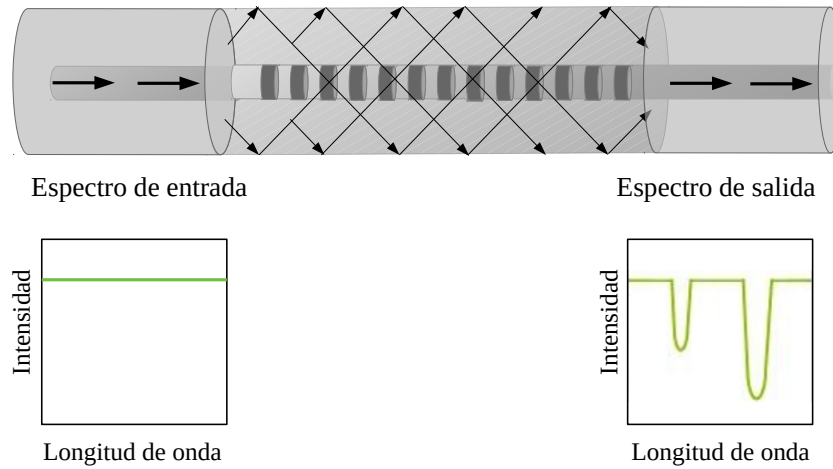


Figura 2.7: Esquema general de los espectros de entrada y salida de LPFG ( $\lambda = 450 \mu m$ ).

## 2.4. Interferencia de la luz

La irradiancia puede definirse como la cantidad de luz que incide sobre una superficie o la cantidad de energía en un área por unidad de tiempo. La interferometría es el fenómeno que resulta de la interferencia entre dos o más ondas de luz, produciendo una irradiancia resultante que difiere de la suma de las irradiancias individuales. Cuando dos ondas separadas llegan al mismo punto y se superponen, simplemente se suman o restan algebraicamente en cada punto de la zona de superposición. Después de pasar por esta zona, cada onda continúa su camino sin alteraciones [38]. En el análisis de este fenómeno, el campo eléctrico total de la interferencia de dos ondas en un punto P en el espacio está dado por la suma de los campos eléctricos de cada onda, dado por la Ec. 2.15,

$$E(t) = E_1(t) + E_2(t) = E_{01}\cos(\omega t) + E_{02}\cos(\omega t + \Delta\phi) \quad (2.15)$$

La irradiancia es proporcional al promedio temporal de la magnitud de la intensidad de campo eléctrico,

$$I = \vec{E} \cdot \vec{E} \quad (2.16)$$

donde el producto punto  $\vec{E} \cdot \vec{E}$  representa el cuadrado de la magnitud del campo eléctrico, es decir,  $|\vec{E}|^2$ . Sustituyendo la expresión del campo eléctrico de la Ec. 2.15 en la Ec. 2.16, se obtiene una expresión general para la irradiancia,

$$I \propto \langle E(t)^2 \rangle = \frac{1}{2}E_{01}^2 + \frac{1}{2}E_{02}^2 + E_{01}E_{02}\cos(\Delta\phi) \quad (2.17)$$

recordando que la irradiancia es proporcional al cuadrado de la amplitud, obtenemos la ecuación matemática para la condición de interferencia de dos haces;

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}\cos(\Delta\phi) \quad (2.18)$$

que se deduce del análisis de la interferencia de dos ondas coherentes. Aquí  $I$ , es la intensidad resultante de la superposición de las dos ondas,  $I_1$  y  $I_2$  son las intensidades de las dos ondas individuales, y  $\Delta\phi$  es la diferencia de fase entre las dos ondas.

Los sensores de fase o interferométricos usan la interferencia de dos o más haces de luz coherentes que se propagan por diferentes caminos ópticos en donde uno de ellos es el camino de referencia

y el otro es el camino del sensor provocando un desfase entre las señales de acuerdo con el parámetro medido. Estos sensores pueden estar contruidos por interferómetros como: Fabry-Perot, Mach-Zehnder, Sagnac, Michelson, etc. En este trabajo de tesis se utilizó un interferometro tipo Mach-Zehnder.

## 2.5. Interferómetro de Mach-Zehnder (MZI)

El MZI puede ser formado por un par de LPFGs (LPFG1 y LPFG2) separados por una distancia  $L$ , véase la Fig. 2.8. Parte de la luz incidente que se propaga en el modo fundamental del núcleo de la fibra se acopla a un modo del revestimiento por LPFG1, mientras que la energía restante continúa viajando por el núcleo de la fibra hasta LPFG2, la luz del revestimiento viaja simultáneamente hasta LPFG2. Cuando la energía del revestimiento se vuelve a acoplar al modo fundamental del núcleo, se produce una interferencia con la luz que aún se propaga en el núcleo, creando así un patrón de interferencia dentro del perfil de transmisión característico de las rejillas, que se observa como variación de potencia y desplazamientos espectrales [39]. Esto último se debe a las diferencias en el camino óptico en el MZI, descrito por la Ec. 2.19.

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} (n_{\text{core}} - n_{\text{clad}}^i) L \quad (2.19)$$

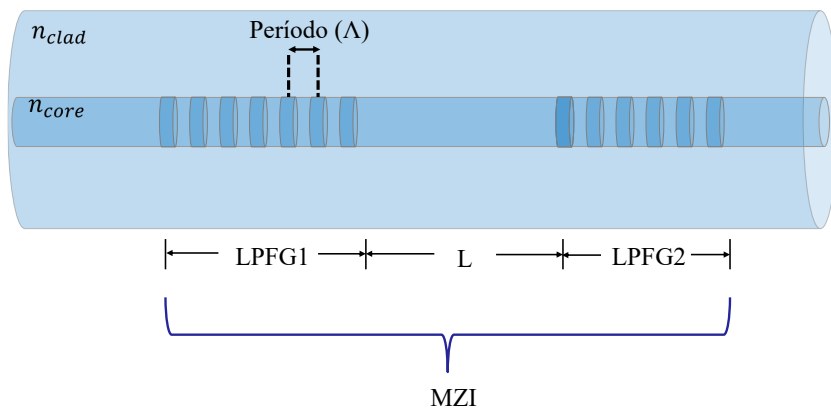


Figura 2.8: Esquema general de los espectros de entrada y salida de LPFG ( $\lambda = 450 \mu\text{m}$ ).

## 2.6. Teoría de Machine Learning: Técnicas No Supervisadas (PCA) y Técnicas Supervisadas (Clasificadores SVM)

La mayoría de los trabajos publicados basados en LPFGs se basa en el metodo tradicional de modulación, este conciste en fijarse en la variación de la amplitud o corrimiento espectral de un solo pico del espectro medido. Dada la naturaleza de los espectros de transmisión obtenidos a partir de estas configuraciones es decir, el conciderar un solo punto de todo el rango espectral medido puede darnos respuestas erroneas de los biosensores. Nuestros espectros de transmisión obtenidos a la salida de nuestros biosensores son señales multivariables las cuales concisten en múltiples variables (longitudes de onda) las cuales se pueden reducir en un espacio de componentes principales de dos o tres dimensiones lo que nos permitirá extraer la información de las  $m$  dimensiones que se obtienen a partir de los espectros medidos. Por lo que en este trabajo se utilizan estas técnicas de análisis de multivariables o Machine Learning

para determinar la respuesta de los biosensores desarrollados, las cuales se describen en las siguientes secciones.

### 2.6.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales en inglés *Principal Components Analysis (PCA)*, permite transformar un conjunto de variables originales a un nuevo conjunto de variables denominadas *componentes principales* es decir, permite visualizar un conjunto de datos que comprende de  $p$  variables en un espacio de dimensión  $k(k < p)$ , al reducir el número de variables permite visualizar relaciones entre las variables y facilita la interpretación de los datos [40], [41].

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

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

#### Deducción de las componentes principales

Consideramos un conjunto de variables  $(x_1, x_2, \dots, x_p)$ , cada variable es un vector columna de  $n$  componentes (muestras), es decir

$$x_i = \begin{bmatrix} x_{1i} \\ x_{2i} \\ \dots \\ x_{ni} \end{bmatrix}$$

donde  $i = 1 \dots n$ , es el número de casos y para cada  $n$ -ésimo caso están asociados  $p$  valores, por lo tanto  $x_{ij}$  son los datos u observaciones. En forma matricial lo podemos representar de la siguiente manera:

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

La matriz  $\mathbb{X}$  constituye el 100% de la información. Al aplicar este análisis se asume que los datos tienen una distribución gaussiana o normal, y para tener todos los valores en las mismas escalas y centralizarlos, los datos es estandarizan de tal manera que para cada columna la media sea 0 y la varianza 1.

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

$$S = \begin{bmatrix} s_{11}^2 & s_{12}^2 & \dots & s_{1p}^2 \\ s_{21}^2 & s_{22}^2 & \dots & s_{2p}^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ s_{p1}^2 & s_{p2}^2 & \dots & s_p^2 \end{bmatrix} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})'$$

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

$$\mathbb{S}\mathbf{v} = \lambda\mathbf{v} \quad (2.20)$$

si se cumple que  $\mathbf{v} \neq 0$  y  $\lambda$  satisface (2.20), entonces  $\lambda$  se denomina un *valor propio* de  $\mathbb{S}$  y  $\mathbf{v}$  un vector propio de  $\mathbb{S}$  correspondiente al valor propio  $\lambda$ , [42]. El procedimiento para calcular los valores y vectores propios es el siguiente:

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

El número de valores y vectores obtenidos será igual a  $p$ , el número de variables originales. Para reducir la dimensión del número de variables originales, primero ordenamos en forma descendiente los valores propios;  $\lambda_{max}, \dots, \lambda_{min}$ , donde los valores altos aportan la mayor parte de la información y los más bajos son los que menos información aportan. Una vez ordenados los valores propios es posible decidir cuál es el menor número de componentes principales (vectores propios) con el que podemos expresar la información contenida en las variables originales. Para ello se utilizan herramientas como el *gráfico de sedimentación* y la *varianza explicada*, los cuales muestran visualmente la contribución relativa de cada componente. Cada componente principal es una combinación lineal de las variables originales, y puede expresarse mediante la siguiente relación:

$$Z_j = a_{j1}x_1 + a_{j2}x_2 + \dots + a_{jp}x_p, \quad \text{para } j = 1, 2, \dots, p$$

donde  $Z_j$  es la  $j$ -ésima componente principal,  $x_1, x_2, \dots, x_p$  son las variables originales estandarizadas, y  $a_{j1}, a_{j2}, \dots, a_{jp}$  son los coeficientes (cargas) asociados al vector propio correspondiente a  $Z_j$ . Estos coeficientes determinan el peso o la contribución de cada variable original en la nueva componente principal.

Posteriormente, se calcula la proporción de varianza explicada por cada componente principal. Esta se define como:

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

este valor permite conocer el porcentaje que corresponde a cada componente principal. La suma de la varianza explicada de todas las componentes principales corresponde al 100% de la varianza total, lo cual da lugar a la denominada varianza explicada acumulada.

### 2.6.2. Máquina de soporte vectorial (SVM)

SVM es un algoritmo perteneciente a la técnica de aprendizaje supervisado que analiza datos y reconoce patrones o límites de decisión dentro del conjunto de datos y se utiliza principalmente para análisis de clasificación y regresión. Un algoritmo de aprendizaje supervisado analiza el conjunto de datos de entrenamiento y lo mapea en una función que se utiliza posteriormente para mapear nuevos ejemplos. La clasificación es el proceso mediante el cual un algoritmo analiza el límite de decisión con la ayuda de los datos de entrenamiento que contienen observaciones conocidas [43].

Los algoritmos SVM construyen hiperplanos en un espacio multidimensional que separa diferentes límites de clase y el número de dimensiones se denomina vector de características del conjunto de datos. SVM tiene la capacidad de manejar múltiples variables continuas y categóricas [44]. El objetivo de SVM es separar los tipos en clases basadas en características. Los nuevos puntos situados en el hiperplano se denominan vectores de soporte.

#### Kernel

Las funciones de kernel transforman los datos de entrada en un espacio de mayor dimensión. Esta transformación puede facilitar la separación de clases simplificando el límite de decisión no lineal complejo a un límite lineal en el espacio de características resultante de mayor dimensión. En este proceso, comúnmente conocido como truco del kernel. Entre las funciones de kernel para datos no lineales se incluyen función de base radial (gaussiana), polinómica y perceptrón multicapa o sigmoide.

#### Hiperplano

Los algoritmos crean un espacio separado generando dos líneas paralelas en un espacio de alta dimensión utilizando la mayoría de sus atributos, lo que se denomina un hiperplano. Crea hiperplanos que tienen el mayor margen en el espacio de alta dimensión, separando así los datos dados en clases y creando márgenes. El margen representa la distancia máxima entre los puntos de datos más cercanos entre clases. Cuanto mayor sea el margen, menor será el error de generalización del clasificador.

#### Sobreajuste

El sobreajuste es uno de los principales problemas de la dimensionalidad. Si el número de características es mucho mayor que el número de muestras de datos de entrenamiento, la función de regularización introduce un sesgo tan grande que el modelo de datos de entrenamiento tiene un rendimiento significativamente inferior, lo que conduce al sobreajuste [45]. Sin embargo, puede evitarse ajustando cuidadosamente el parámetro de regularización y seleccionando el kernel apropiado y afinándolo cuidadosamente.

Hay dos tipos de clasificadores utilizados para SVM como lineal y no lineal. En este trabajo, se utilizaron SVM lineal y gaussiano. En la Fig. 2.9 se muestra un ejemplo de un clasificador SVM lineal, donde se observa el hiperplano de separación, los vectores de soporte y los márgenes que definen la separación entre clases.

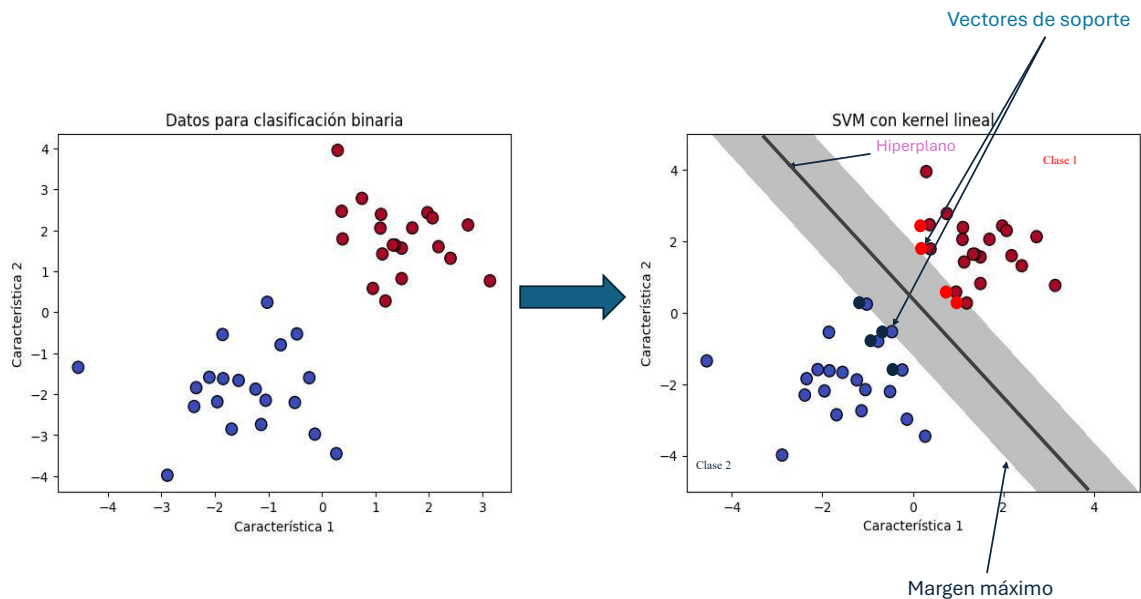


Figura 2.9: Representación del hiperplano generado por una SVM lineal, utilizado para clasificar datos mediante la maximización del margen entre clases.

## Matriz de confusión y sus métricas

Una de las herramientas más utilizadas para evaluar el desempeño de modelos de clasificación supervisada, como el clasificador *SVM*, es la *matriz de confusión*. Esta matriz permite representar de forma clara y estructurada el rendimiento del modelo al comparar las clases predichas con las clases reales de las muestras, lo que facilita el análisis detallado de los aciertos y errores de clasificación.

Para un problema de clasificación binaria, la matriz de confusión se representa generalmente como una tabla  $2 \times 2$  (ver Fig. 2.10), que contiene las siguientes cantidades:

- **VP (Verdaderos Positivos)**: número de instancias que pertenecen a la clase positiva y fueron correctamente clasificadas como positivas.
- **FP (Falsos Positivos)**: número de instancias que pertenecen a la clase negativa, pero fueron incorrectamente clasificadas como positivas.
- **FN (Falsos Negativos)**: número de instancias que pertenecen a la clase positiva, pero fueron clasificadas incorrectamente como negativas.
- **VN (Verdaderos Negativos)**: número de instancias que pertenecen a la clase negativa y fueron correctamente clasificadas como negativas.

Clase verdadera	Positivos	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
	Negativos	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)
		Positivos	Negativos
		Clase predicha	

Figura 2.10: Descripción de Matriz de Confusión.

Con base en estos valores, se pueden calcular las siguientes métricas que cuantifican el desempeño del modelo:

- **Exactitud (Accuracy):** proporción de predicciones correctas dividido entre el número total de casos examinados.

$$\text{Accuracy} = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} \quad (2.21)$$

- **Precisión (Precision):** proporción de verdaderos positivos dividido entre todos los casos positivos (tanto verdaderos positivos, como falsos positivos).

$$\text{Precision} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (2.22)$$

- **Sensibilidad (Recall):** proporción de casos positivos que fueron correctamente identificados por el modelo.

$$\text{Recall} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (2.23)$$

- **F1-Score:** Este valor combina la precisión (qué tan precisas son las predicciones positivas) y el recall (cuántas muestras positivas se detectan correctamente) en una sola métrica. Es útil para balancear ambas métricas especialmente en contextos de clases desbalanceadas.

$$F_1 = 2 \cdot \frac{\text{Precision} \cdot \text{Recall}}{\text{Precision} + \text{Recall}} = \frac{2 \cdot VP}{2 \cdot VP + FP + FN} \quad (2.24)$$

El valor del F1-score varía entre 0 y 1, donde un valor de 0 indica que no se clasificó correctamente ningún caso positivo (es decir, VP es cero), y un valor de 1 corresponde a una clasificación perfecta, donde tanto la precisión como la sensibilidad alcanzan su valor máximo. Por lo tanto, en este trabajo, el valor de F1-score será de suma importancia porque permite evaluar qué tan eficiente funciona el clasificador.

Para calcular la matriz de confusión en este trabajo de tesis, se desarrolló un programa en Python, el cual se muestra en el apéndice A.3. A partir de este programa se obtuvieron matrices de confusión, como la que se muestra en el ejemplo de la Fig. A.3.

# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Materiales

Para el desarrollo de los biosensores se utilizó OF SMF-28 con 10  $\mu m$  de diámetro del núcleo y 120  $\mu m$  de diámetro de la cubierta con lo cual se ensambló el biosensor. Los reactivos químicos necesarios para el ensamblado de los biosensores son: ácido fluorhídrico (HF) al 30 %, hidróxido de potasio (KOH) a una concentración de 85 % , 3-aminopropiltrimetoxisilano (3-AMPTS) al 97 %, N-hidroxisuccinimida (NHS), Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), tolueno al 99.8% y metanol al 99.9% adquiridos en Sigma-Aldrich Co.

Estos materiales se utilizaron para la limpieza del soporte, hidroxilación, funcionalización y activación. Debido a que los compuestos químicos y las reacciones químicas que se llevaran a cabo en este trabajo son altamente peligrosas, la limpieza del soporte, hidroxilación y funcionalización se llevarán a cabo en una campana química de extracción.

También se adquirió en Sigma-Aldrich Co la Anti-IL6 (No. Serie 121535) y Anti-IL10 (No. Serie 121635) para la detección de la IL-6 e IL-10 en suero sanguíneo inducido con IC en modelo murino, respectivamente. Y finalmente se adquirió la IL-6 Human (No. Serie 483335) y IL-10 Human (No. Serie 359795) para realizar una comparación de la respuesta de los biosensores con las IL estándar y con las muestras obtenidas del modelo que los biosensores desarrollados detectan estas proteínas.

#### 3.1.1. Material Biológico: Inducción de isquemia cerebral y obtención de muestras

Se caracterizó la respuesta de los biosensores utilizando como analito la IL-6 y la IL-10 la cual fue determinada a través del suero sanguíneo del modelo murino inducido; por lo tanto el elemento de reconocimiento biológico Anti-IL6 y Anti-IL10 reconoció al analito directamente en la muestra [17,22]. El suero sanguíneo fue extraído de modelos murinos del bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y del CINVESTAV.

Para la extracción del suero sanguíneo se utilizaron Ratas Macho Sprague Dawley, entre 3.5 y 4 meses con un peso aproximado de 350 g. El diseño experimental que se realizó para la expresión de las IL-6 e IL-10 en la inducción de IC aguda consistió de las siguientes etapas; electrocauterización de arterias vertebrales, exposición de arterias carótidas, proceso Isquémico y finalmente la extracción del suero sanguíneo, ver Figura 3.1.

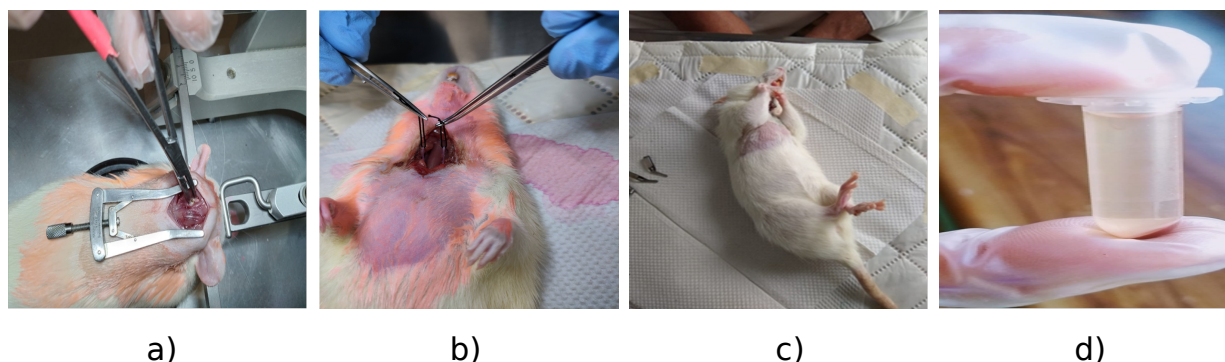


Figura 3.1: Diseño experimental de la inducción de IC; a) Electrocauterización de arterias vertebrales, b) Exposición de arterias carótidas, c) Proceso Isquémico y d) finalmente la extracción del suero sanguíneo

- a) Electrocauterización de arterias vertebrales: En esta primera cirugía se realiza la oclusión por electrocauterización de las arterias vertebrales bajo anestesia, las cuales se proyectan en la primera vertebra llamada Atlas. Con un lápiz de electrocauterio se realiza la electrocauterización de las dos arterias vertebrales derecho e izquierdo. Después de esto se sutura y pasada una semana de recuperación se realizó la segunda cirugía.
- b) Exposición de arterias carótidas: En la segunda cirugía se realiza la exposición de arterias carótidas que consiste en separar el nervio vago y la arteria carótida. También en esta cirugía se anuda la arteria carótida con un hilo de sutura (que no sea absorbible) para que al momento de hacer el proceso isquémico sea más fácil su localización, esto se hace del lado derecho e izquierdo y finalmente se sutura.
- c) Proceso Isquémico: Después al tercer día de la segunda cirugía se realiza el proceso isquémico donde se introduce al animal a una cámara anestésica, ya anestesiado se retira y se coloca en un colchón térmico. En seguida se retira la sutura de la segunda cirugía y se exponen las arterias y con ayuda de unos clips quirúrgicos se realiza la oclusión de las arterias. Esta oclusión se realiza por 15 minutos.
- Pasado los 15 minutos se retiran los clips quirúrgicos y en los primeros 20 minutos el animal no debe de recuperar el reflejo de enderezamiento, también se debe observar; mala simetría, contracción de los miembros torácicos, torsión de la columna, rigidez entre otras acciones. Estos síntomas se presentan mientras se recuperan de la isquemia.
- d) Extracción del suero sanguíneo: Una vez que los animales cumplan con el requisito básico de la isquemia, serán sacrificados por decapitación a diferentes tiempos 2, 4, 6, 12 y 24 horas post isquemia e inmediatamente se obtendrá el líquido sanguíneo; primero se deja coagular, se extrae el sobrenadante y se centrifuga a 3000 revoluciones por minuto para obtener el suero sanguíneo y se mantendrá en congelación.

En los sueros sanguíneos con isquemia cerebral inducida (ISC por sus siglas en inglés), se observó la expresión de la IL-6 como parte de la respuesta inflamatoria. Para inducir una respuesta antiinflamatoria y promover la expresión de la proteína IL-10, se administró a los animales un tratamiento con EB a una dosis de 4 mg/kg, 30 minutos antes del proceso isquémico, mediante inyección intraperitoneal. A los sueros sanguíneos con ISC tratados con EB se les denominó ISC+EB. Las muestras obtenidas se presentan en la siguiente tabla:

*Tabla 3.1: Controles para la detección de IL-6 e IL-10.*

Proceso isquémico	ISC	ISC+EB
Control 1	0 hr	0 hr
Control 2	2 hr	2 hr
Control 3	4 hr	4 hr
Control 4	6 hr	6 hr
Control 5	12 hr	12 hr
Control 6	24 hr	24 hr

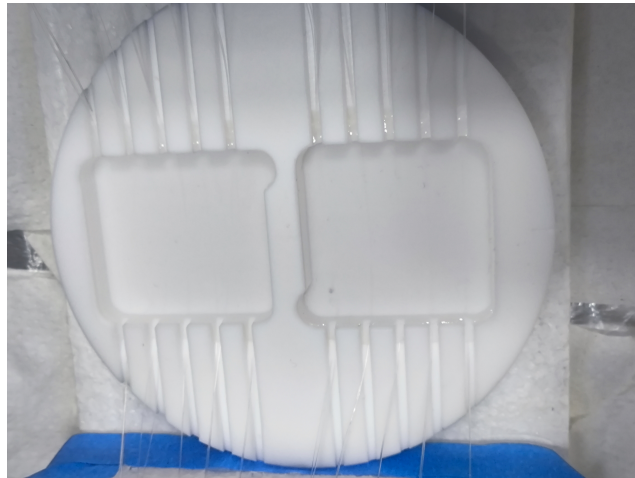
## 3.2. Sistema de Transducción

### 3.2.1. Fabricación del biosensor basada en TOF

La metodología del ensamblado de los biosensores basado en fibra óptica adelgazada (Bio-TOF), se realizó en tramos de 70 cm de largo, en donde por la mitad de la fibra se eliminó el revestimiento a lo largo de 1 cm, utilizando como ERB un anticuerpo policlonal Anti-IL6 y Anti-IL10. El diagrama del ensamblado se representa en la Figura 3.6.

#### Limpieza de la matriz soporte

Para la limpieza de la matriz soporte se utilizó HF, añadiendo 4.5 ml de HF y 10.5 ml de agua desionizada (dH<sub>2</sub>O). Utilizando un molde de teflón se colocaron 20 fibras sin revestimiento y se añadió la solución. La región sin revestimiento de la OF estuvieron en contacto con la solución, ver Figura 3.2.



*Figura 3.2: Molde de teflón para colocar las fibras.*

El tiempo de interacción con la solución depende del diámetro deseado a trabajar. La Figura 3.3 muestra la respuesta del adelgazamiento en función del tiempo en la cual se puede observar que alrededor de las 6 horas se tiene una reducción del 73 % en el diámetro de la cubierta.

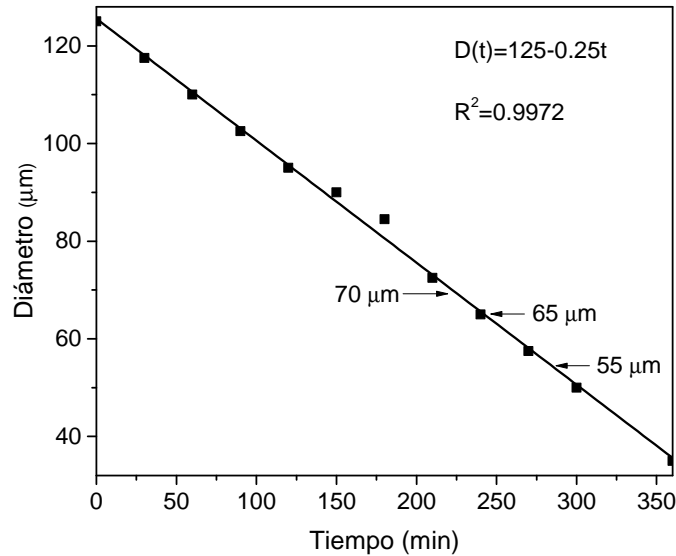


Figura 3.3: Tiempo de respuesta del adelgazamiento de la OF, usando HF al 30%.

A partir de estos resultados se decidió ensamblar el biosensor a un diámetro de  $55\mu\text{m}$ , es decir el tiempo de interacción fue de cuatro horas y cuarenta minutos de inmersión de la fibra en HF. Esta concentración de HF permitió tener un control en la homogeneidad en la superficie de la fibra, es decir la fibra fue adelgazada uniformemente. Posteriormente las OF se retiran del molde y se enjuagan con abundante agua desionizada, para remover los residuos en la superficie. El diámetro de la OF se midió por medio de un microscopio óptico con una magnificación de 50X.

En nuestro Bio-TOF las variaciones del índice de refracción son provocadas por la interacción de las variaciones en las concentraciones de IL-10 en el suero sanguíneo del modelo murino, que afectan a la potencia transmitida y pueden ser medidas a través de las variaciones del espectro de transmisión.

### 3.2.2. Fabricación del biosensor basado en LPFG y MZI

La metodología del ensamblado de los biosensores basados en LPFG, se realizó en tramos de 80 cm de largo, en donde por la mitad de la fibra se eliminó el revestimiento a lo largo de 1.5 cm para biosensores basados en LPFG y 4.5 cm para biosensores basados en MZI. También se utilizó como ERB el anticuerpo policlonal Anti-IL10, el diagrama del ensamblado se presenta en la figura 3.6 [12].

#### Preparación de la matriz soporte

Se realizó el grabado de LPFG mediante la técnica punto a punto con la ayuda de una máquina de empalme por fusión, utilizando el método de arco eléctrico. La fibra fue expuesta a descargas del arco eléctrico emitido por los electrodos de una empalmadora.

Para crear las LPFG se utilizó un actuador lineal. El actuador movió la fibra para aplicar los arcos eléctricos a determinadas distancias, según el período de la rejilla deseado. Basado en la experiencia se usó un número menor de puntos para producir la rejilla de periodo largo, debido a que en los procesos de hidroxilación y funcionalización la fibra se rompe fácilmente.

Por lo tanto, se realizaron 20 descargas del arco eléctrico en la OF, debido a que es más fácil el

trasladado. Para los biosensores en LPFG el período de modulación fue de  $\Lambda=620 \mu\text{m}$ , debido a la experiencia previa del laboratorio. Y para los biosensores en MZI se realizaron dos LPFG con un período de modulación de  $\Lambda=550 \mu\text{m}$ , a una separación de  $10,000 \mu\text{m}$ .

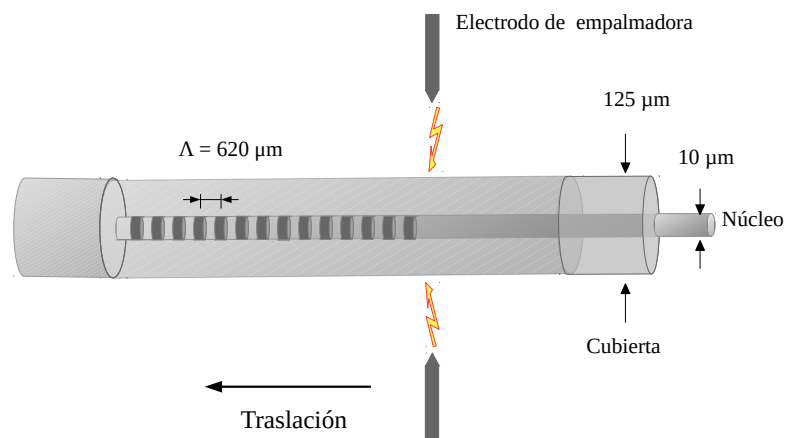


Figura 3.4: Grabado de la LPFG utilizando el método de arco eléctrico.

Una vez realizado esto, la fibra pasa un proceso de hidroxilación, funcionalización, activación y posteriormente a un proceso de inmovilización del anticuerpo policlonal Anti-IL6 o Anti-IL10 que actúa como ERB y finalmente la detección de la IL-6 o la IL-10.

### 3.3. Hidroxilación

Para la hidroxilación de la superficie de la OF se usó KOH, el cual eliminó metales y contaminación orgánica, agregando grupos OH en la superficie de la OF. La solución fue generada disolviendo 841 mg de KOH en 7.5 ml de agua desionizada y añadiendo 7.5 ml de metanol, esta se añadió a las fibras cubriendo completamente la zona donde se desarrolló el biosensor y se dejó actuar por un período de tres horas y media [12, 15]. Como resultado, se dejaron los sitios activos de Si-O, Si-Si y Si-O<sub>2</sub>-Si. Posteriormente la OF se enjuagó en metanol por 10 minutos, para eliminar cualquier residuo de la solución en la superficie, para finalmente secar con nitrógeno durante un minuto.

### 3.4. Funcionalización

Para la funcionalización se colocó en la superficie 3-AMPTS al 2 % en tolueno. Utilizando una parrilla se calentó 10 ml de tolueno en un vaso de precipitado Kimax hasta los 90 °C. Al llegar a esa temperatura se le agregó 200  $\mu\text{l}$  de 3-AMPTS y se retiró de la parrilla. Al bajar la temperatura a los 30 °C, se añadió la solución a una caja coplin de vidrio donde previamente se colocaron las fibra hidroxiladas. La solución actuó durante 60 minutos (basado en resultados previos) dejando como resultado los sitios activos del grupo funcional NH. Al término del tiempo se retiraron las fibras ópticas de la caja y se enjuagaron con abundante tolueno para retirar los residuos que pudieran impedir la inmovilización del anticuerpo.

### 3.5. Activación

Posterior a la funcionalización se realizó la activación de la superficie de la OF. La solución fue generada de la siguiente manera: primero se mezcló 5 mg de NHS y 1 ml de buffer de fosfatos (PBS,

por sus siglas en inglés), luego se mezcló 5 mg de EDC y 1 ml de PBS. Posteriormente se mezclaron ambas soluciones y se colocó la solución final en la superficie de la OF funcionalizada, la cual ya estaba colocada en un agitador a 1.66 Hz y se dejó actuar por 90 minutos. Transcurrido el tiempo se enjuagó 3 veces con PBS. Este procedimiento se realizó para eliminar la posibilidad de que se generen puentes de hidrógeno, y así obtener enlaces amino y carboxilo.

### 3.6. Inmovilización

Se utilizó el anticuerpo policlonal Anti-IL6 y Anti-IL10 como ERB para determinar la IL-6 e IL-10, respectivamente. El anticuerpo se colocó en PBS cuya función es mantener su pH y presión osmótica lo más parecido al ambiente biológico natural, por lo tanto ayudó a conservar el anticuerpo. Utilizando una caja petri cuadrada de plástico se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de Anti-IL6 o Anti-IL10 y 190  $\mu\text{l}$  de PBS, encima de una OF activada.

La caja de petri se colocó en un agitador orbital a una frecuencia de 1.66 Hz, para asegurar que el ensamblado del anticuerpo sea uniforme en la superficie evitando la precipitación del anticuerpo y se dejó actuar 120 minutos, ver Figura 3.5. Una vez que se han ocupado todos los sitios activos, donde el anticuerpo se puede anclar o unir a través de enlaces C-H, quedo libre el grupo amino terminal (-NH<sub>2</sub>) del anticuerpo para detectar las proteína IL-6 e IL-10. Una vez finalizada la inmovilización del anticuerpo en las diferentes configuraciones de OF, estas fueron denominadas como Bio-TOF, Bio-LPFG y Bio-MZI.

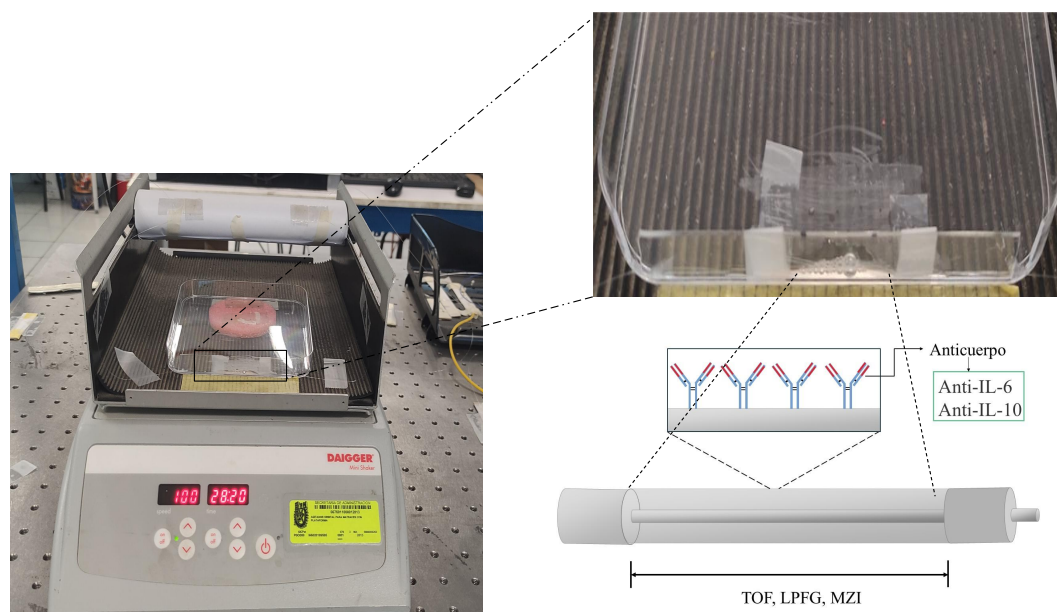


Figura 3.5: Anticuerpo policlonal ensamblado en la superficie de la OF activada.

### 3.7. Detección

Después de la inmovilización del anticuerpo policlonal se realizó la detección de la IL-6 e IL-10. Se colocaron 200  $\mu\text{l}$  del suero sanguíneo encima del biosensor y se dejó actuar por 120 minutos. La detección se detuvo hasta que se dejaron ver cambios en la señal de transmitancia.

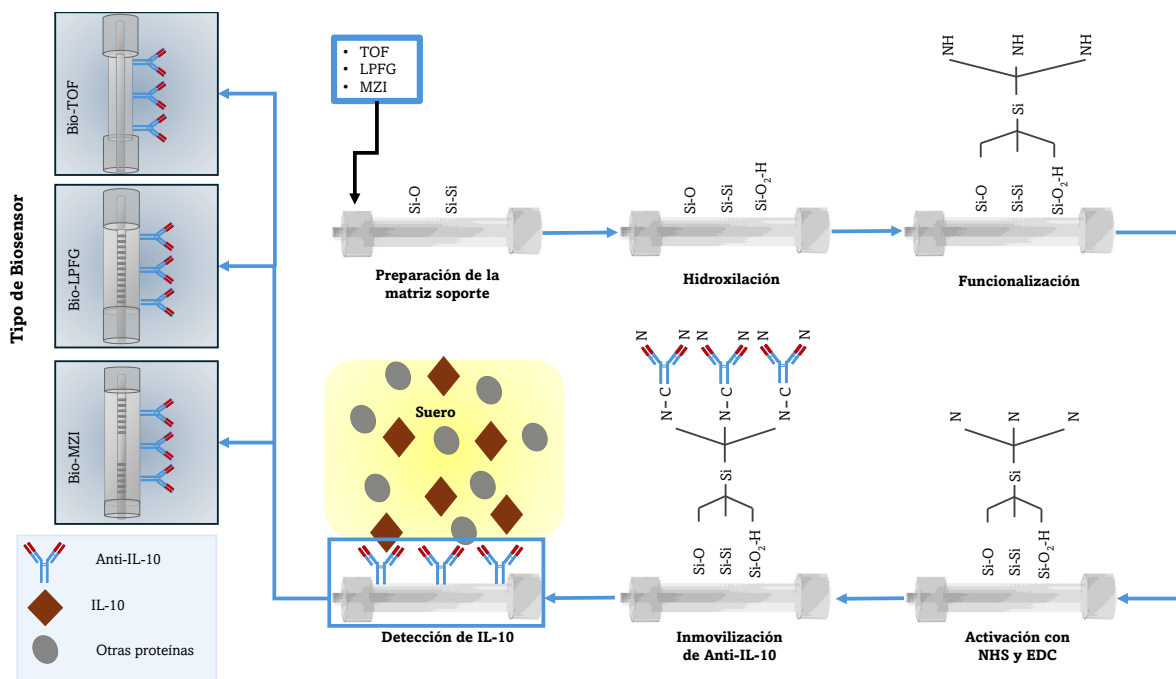


Figura 3.6: Diagrama de ensamblado en cada etapa de los biosensores TOF, LPFG y MZI.

### 3.8. Microscopía óptica

Se utilizó un microscopio óptico marca Olympus Modelo PME3 con un objetivo de 50X, el cual permitió ver la morfología de la superficie en cada etapa del ensamblado del biosensor mediante el Software StCamSWare.

### 3.9. Espectroscopía de infrarrojo

**Macro**

La caracterización espectroscopica se realizó mediante un equipo de espectroscopía vibracional de infrarrojo por transformada de Fourier marca Bruker Vertex 70 en la región del mediano infrarrojo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Se realizaron 60 muestreos para la línea base y 120 muestreos para cada una de las muestras, en el modo de medición de reflectancia total atenuada ATR con un cristal Diamante-SeZn de una sola reflexión; se utilizó como línea base el cristal de ATR, la fibra se partió en 3 partes para asegurar el contacto de la OF con el cristal de ATR, ver Figura 3.7 (a).

**Micro**

La caracterización espectroscópica se realizó mediante un equipo de espectroscopía vibracional de infrarrojo por transformada de Fourier marca Bruker Vertex 70. Se utilizó el microscopio Hyperyon 2000 con un objetivo de 20X, en modo de transmitancia en la región del mediano infrarrojo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Debe de enfriarse el detector con nitrógeno líquido antes de usarse el equipo. Se utilizó como línea base un espejo de oro, perteneciente a la platina propia del Hyperyon 2000. Se analizaron 6 diferentes puntos en la zona donde se ensambló el biosensor, ver Figura 3.7 (b), con 32 mediciones por cada punto de la matriz. Y los espectros crudos serán procesados mediante el software Origin pro 8.

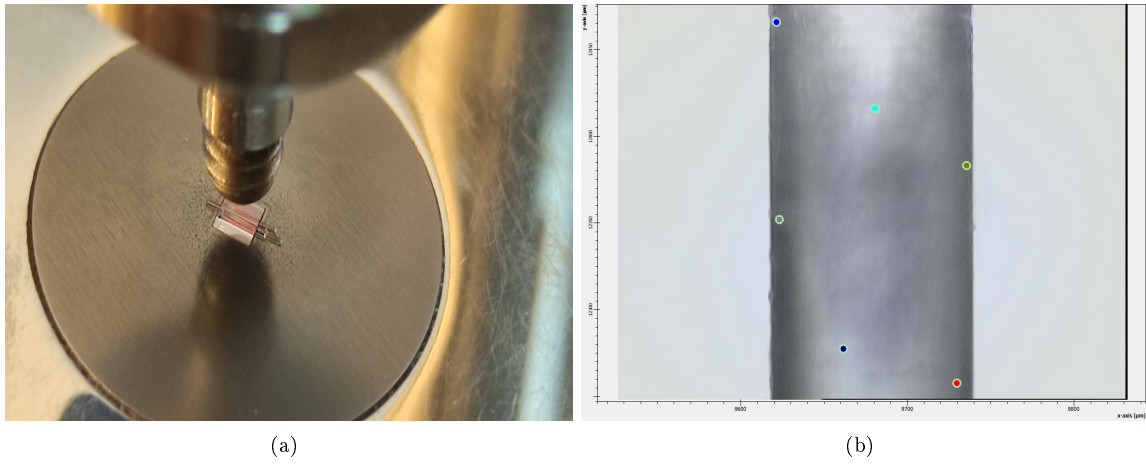


Figura 3.7: Espectroscopía de infrarrojo (a) Micro y (b) Macro.

### 3.10. Transmisión

Finalmente, se caracterizó cada etapa del ensamblado del biosensor, así como el proceso de detección, mediante mediciones del espectro de transmisión a la salida del biosensor. Para ello, se utilizaron diferentes configuraciones dependiendo del tipo de biosensor.

En el caso de los biosensores Bio-TOF y Bio-LPFG, se utilizó un diodo superluminescente (SLD) centrado en 1330 nm, junto con un analizador de espectros ópticos para analizar el espectro de transmisión en la región de 1250–1450 nm, con intervalos de medición de 0.2 nm. Por otro lado, para el Bio-MZI, se utilizó un SLD centrado en 1450 nm, y el espectro de transmisión se analizó en la región de 1375–1575 nm, también con intervalos de 0.2 nm.

Estas mediciones permitieron identificar variaciones en la amplitud y/o corrimientos espectrales en cada etapa del ensamblado. Los espectros de transmisión se registraron cada 5 minutos hasta que no se observaron más cambios en la señal transmitida. Finalmente, los datos obtenidos fueron almacenados en un ordenador personal para su análisis posterior, ver Fig. 3.8.

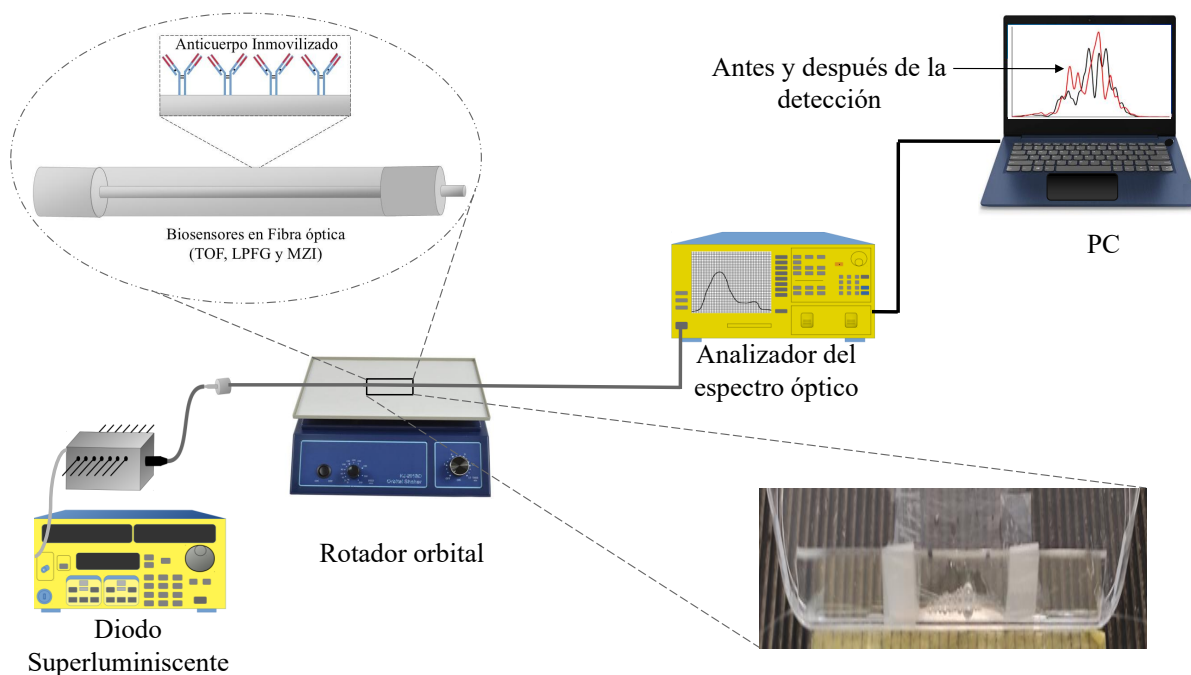


Figura 3.8: Arreglo experimental implementado para la caracterización del biosensor.

Se realizó PCA a los datos obtenidos en los espectros de transmisión, utilizando un programa desarrollado en python, ver pendice A. El programa es una versión inicial, y sirve para un conjunto de datos en particular. En este programa se realizó una función la cual solicita la dirección de los archivos que se les implementará el PCA y la longitud de onda inicial y final que se desea analizar.

Como ejemplo se utilizaron los datos del Biosensor 1 con ERB la Anti-IL10, Fig. 7.1 (e) en la región de longitud de onda de 1375 a 1575 nm. En el apéndice A, la figura A.1 muestra las gráficas al compilar el programa. En la figura A.1(a) se gráfica la componente principal con su respectivo valor propio, ordenados desde el más grande al más pequeño llamado gráfico de sedimentación. La gráfica A.1(b) muestra la varianza explicada, en donde la primera componente corresponde al 99.233 % de la

varianza, la segunda componente corresponde al 0.699%, la tercera corresponde al 0.036% y la cuarta componente es cercana a cero. En A.1(c) se grafican los vectores propios correspondientes a la primera componente principal (PC1) versus la segunda componente principal (PC2) y en A.1(d) se grafican los vectores propios correspondiente a PC2 versus PC3. Y finalmente en A.1(e) se grafican los vectores propios correspondientes a PC1 versus PC2 versus PC3.

## Capítulo 4

# Resultados: Biosensores TOF

Se realizaron 16 biosensores en total, 8 biosensores con ERB Anti-IL6 y 8 biosensores con ERB Anti-IL10. Las Tablas B.1 y B.2 del apéndice B muestra la descripción de cada biosensor para detectar la proteína IL-6 e IL-10.

### 4.1. Microscopía óptica

La caracterización morfológica en cada etapa se llevó a cabo mediante imágenes obtenidas con un microscopio óptico. Esta técnica permitió observar, que en cada etapa del ensamblado la homogeneidad superficial es parcialmente uniforme. Primero en la Fig. 4.1 (a), se observa la TOF con un diámetro de  $55\ \mu\text{m}$ , al hidroxilar la superficie se redujo a  $50\ \mu\text{m}$  su diámetro, ver Fig. 4.1 (b), la fibra se adelgaza debido a que el KOH remueve los enlaces Silicio (Si) de la superficie de la OF. Posteriormente al funcionalizar el diámetro aumentó  $5\ \mu\text{m}$ , ver Fig. 4.1 (c), el diámetro aumenta debido a la inmovilización del 3-AMPTS en la OF. Y finalmente la Fig. 4.1 (d) y (e) muestra la fibra después de inmovilizar el Anti-IL6 y Anti-IL10, respectivamente. Donde se puede observar que el diámetro es el mismo debido a que fueron ocupados todos los enlaces disponibles del 3-AMPTS. Por lo tanto el diámetro final fue de  $55\ \mu\text{m}$ .

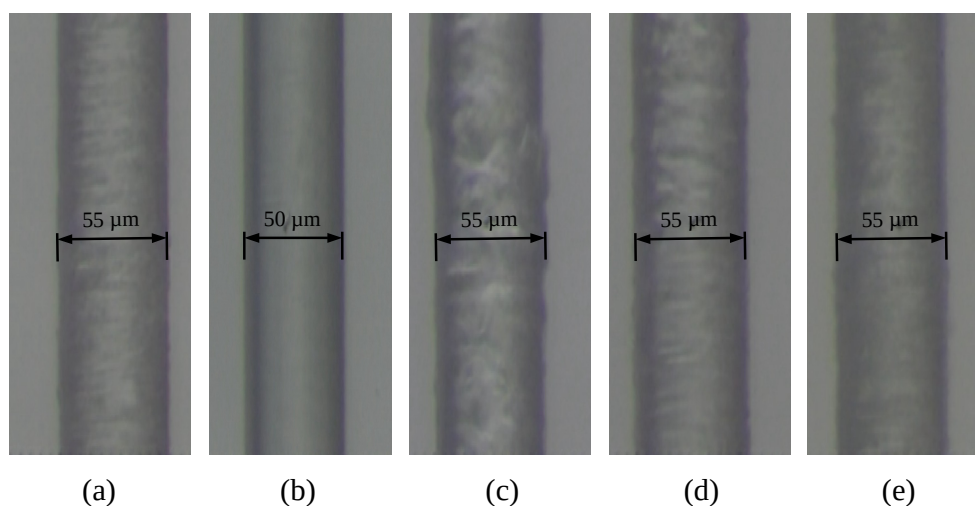


Figura 4.1: Imágenes ópticas obtenidas en la a) TOF, b) Hidroxilación, c) Funcionalización, d) Inmovilización y e) detección del analito.

La Fig. 4.2 muestra imágenes de microscopía óptica de algunos Bio-TOF tras el proceso de detección. En las Fig. 4.2 (a) y (e) se observan algunas manchas, aunque en menor cantidad en comparación con la Fig. 4.2 (d). Esto podría deberse a una menor inmovilización de IL-6 en el suero sanguíneo a 2h ISC. La Fig. 4.2 (b) corresponde a la detección en Sham, cuya superficie es similar a la observada en la Fig. 4.1 (c), que corresponde a la detección de IL-6 STD, donde se aprecia una acumulación que podría corresponder a IL-6. Por su parte, la Fig. 4.2 (d) presenta una mayor cantidad de protuberancias en la superficie, lo que sugiere una mayor inmovilización de IL-6 en el suero sanguíneo a 6h ISC. Finalmente, en las Fig. 4.2 (f), (g) y (h), las superficies se observan lisas y sin manchas, como era de esperarse, dado que el anticuerpo no presenta afinidad con Anti-KiSS, OPN5 ni Proteínasa K.

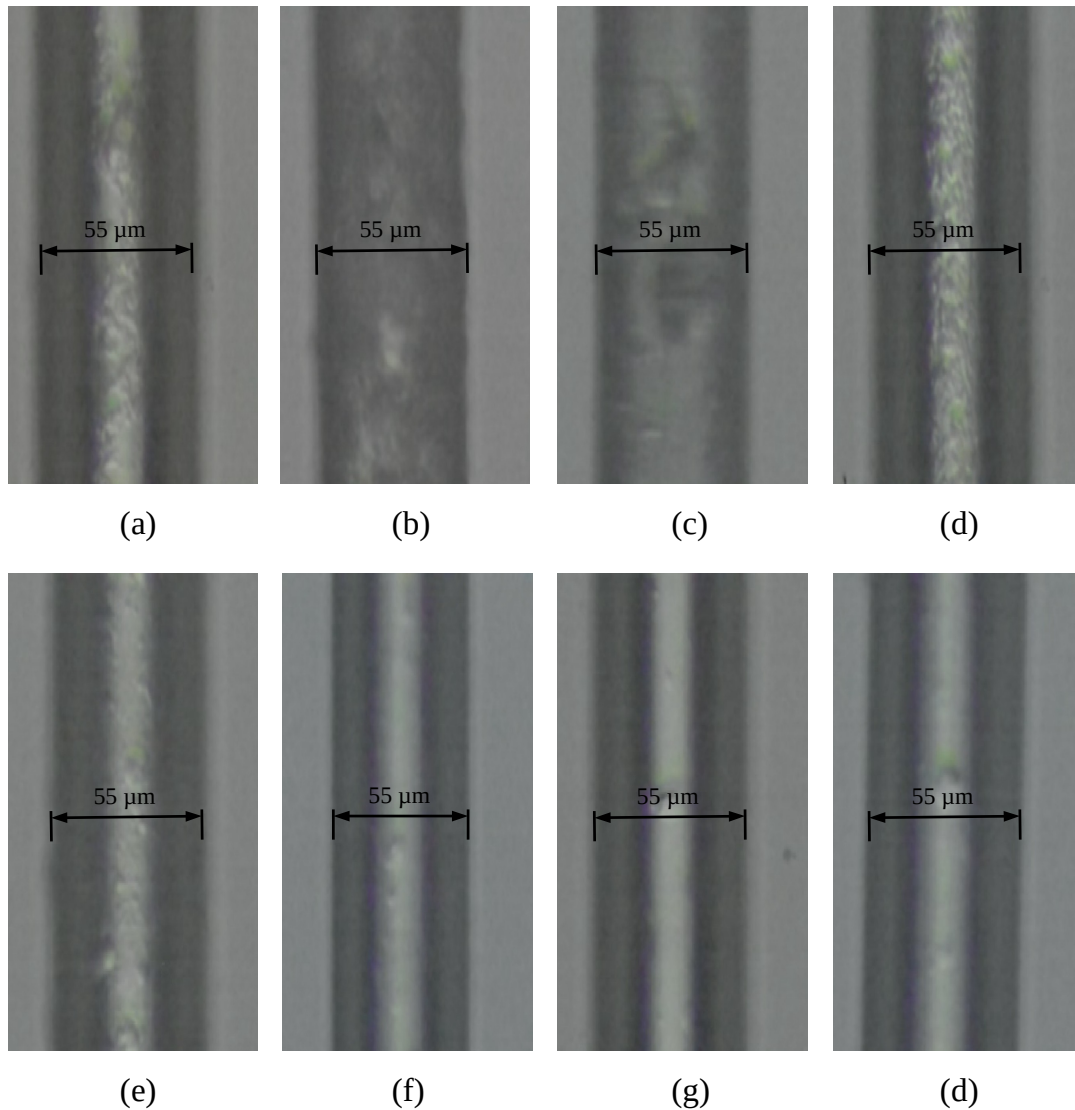


Figura 4.2: Imágenes ópticas obtenidas del Bio-TOF para detectar IL-6: (a) 2h ISC, (b) Sham, (c) IL-6 STD, (d) 6h ISC, (e) 2h ISC+EB, (f) Anti-KiSS, (g) OPN5 y (h) Proteínasa K.

## 4.2. Transmisión

Los espectros de transmisión se midieron cada 5 minutos hasta que no se observaron más cambios en la señal transmitida. Para asegurar la detección de la proteína IL-6 e IL-10 en suero sanguíneo, los espectros de salida se obtuvieron en cada etapa del autoensamblaje del Bio-TOF. Los espectros de transmisión medidos en cada etapa del ensamblado del biosensor se midieron en un rango de 1250 nm a 1450 nm.

En la Fig. 4.3 se muestra el espectro de salida del Bio-TOF. Se observa que, para apreciar con mayor claridad las diferencias entre los espectros, es necesario realizar un acercamiento. Debido a que las variaciones de amplitud y los desplazamientos de los espectros de transmisión pueden interpretarse como el cambio del índice de refracción debido a los enlaces covalentes que están presentes en cada etapa. Por lo tanto necesitamos encontrar el rango espectral donde se observen mayores cambios espectrales.

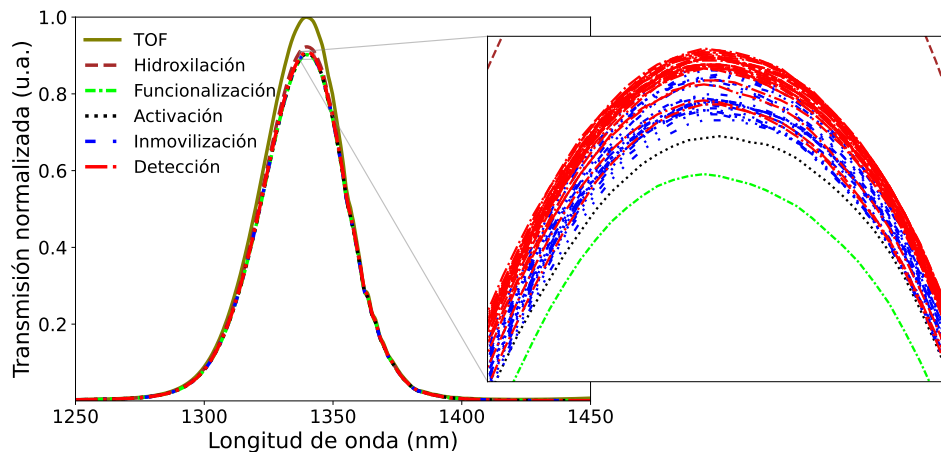


Figura 4.3: Espectro de salida en cada etapa del ensamblado del Bio-TOF (IL-10 STD).

Dado que las variaciones en la Fig. 4.3 no son fáciles de observar, se propuso identificar la región espectral con mayores cambios. Después de obtener los espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los biosensores, el siguiente objetivo fue encontrar la región donde se presentaron las mayores variaciones de amplitud y desplazamientos de los espectros de transmisión. Por ejemplo, la Fig. 4.4 (a) muestra los espectros de salida completo en cada etapa del ensamblado del Bio-TOF para la detección de IL-10. Luego en la Fig. 4.4 (b) se graficó la diferencia de la transmisión la cual consiste en restar el espectro de salida de la detección y su promedio, de esta figura se puede observar que para el rango espectral que va de 1270 a 1400 nm existe la mayor variación en la señal de transmisión. Dentro de este rango espectral podemos encontrar otras subsecciones que vamos analizar por medio de PCA, estas están en las siguientes regiones: 1270-1350 nm, 1300-1350 nm y 1350-1400 nm.

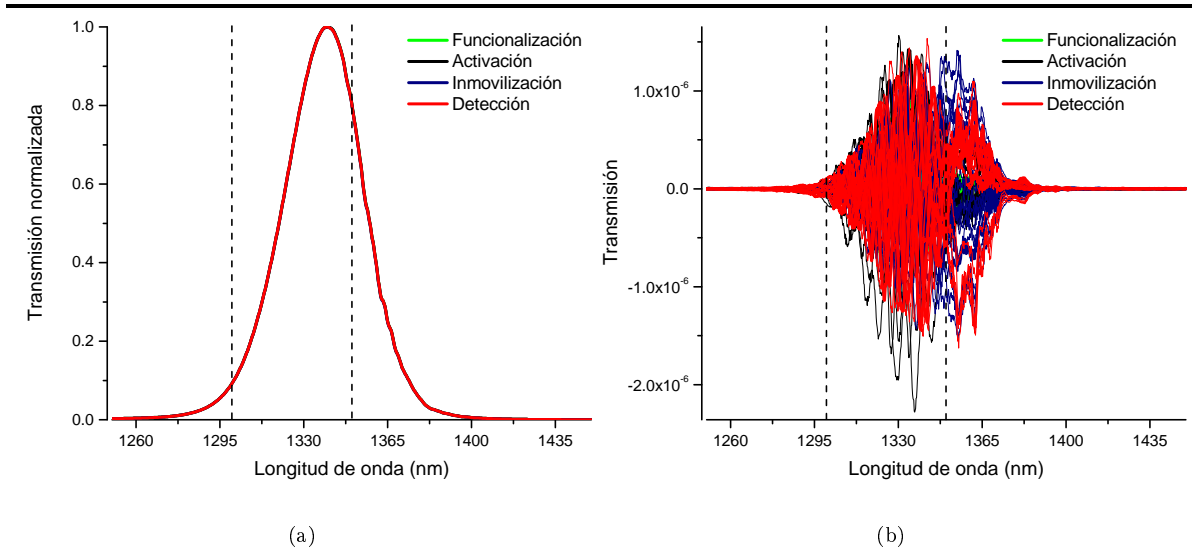


Figura 4.4: Espectros de salida en cada etapa del ensamblado de Bio-TOF; funcionalización (verde), activación (negro), inmovilización de la Anti-IL10 (azul), y detección de IL-10 (rojo).

Por otro lado, para los Bio-TOF que detectaron IL-6 con ERB Anti-IL6, su respuesta se comporta de manera similar, por lo que los siguientes rangos espectrales fueron analizados mediante PCA: 1270-1400 nm, 1290-1380 nm, 1300-1360 nm y 1300-1350 nm. Para llevar a cabo este análisis, se organizó en una matriz las mediciones correspondientes a las etapas de funcionalización, activación, inmovilización y detección. En dicha matriz, las columnas representaban las mediciones y las filas los valores de absorbancia en distintas longitudes de onda. Posteriormente, se aplicó la transpuesta de la matriz para poder realizar el PCA.

En las Tablas B.6 y B.7 del Apéndice B se presentan los valores de las tres primeras componentes principales obtenidas para cada biosensor. Como se puede observar, en el rango de 1300 a 1350 nm, para los Bio-TOF que detectan IL-6 el valor de la primera componente principal se encuentra entre 87.074 % y 99.909 % en la mayoría de los casos y para los Bio-TOF que detectan IL-10, este valor oscila entre 95.89 % y 99.31 %. Por lo tanto, se seleccionó el rango de 1300 a 1350 nm como el más óptimo para analizar los espectros de transmisión mediante PCA, ya que la suma de la primera y segunda componente principal supera el 99 % de la varianza total del sistema lineal. Esto indica que las primeras componentes contienen prácticamente toda la información relevante de los espectros de transmisión.

Las Fig. 4.5 y 4.6 muestran el PCA en el rango espectral de 1300 a 1350 nm del 1 al 5 (ver Tablas B.6 y B.7) del Bio-TOF, los cuales detectaron IL6 e IL10, respectivamente. De estos resultados se puede observar la respuesta de cada una de las etapas del ensamblado así como de la detección en función del tiempo (0 a 120 min), funcionalización (círculos verde), activación (círculos negros), inmovilización (círculos azules) y detección (círculos rojos). Como se observa en las figuras cada una de estas se discrimina perfectamente, es decir no existen aglomeraciones entre ellas. Se identificó la medición al tiempo cero de la inmovilización (triángulo azul) y en la detección (triángulo rojo), y también se identificó la medición en el tiempo de 120 min de la inmovilización (cuadrado azul) y en la detección (cuadrado rojo). De estos resultados podemos observar que la etapa de inmovilización va seguida de la etapa de la detección en la mayoría de los casos como es de esperarse ya que la inmovilización nos representa la variación del índice de refracción debido a la presencia de los anticuerpos (Anti-IL6 o Anti-IL10) mientras que la detección nos representa el enlace covalente de las proteínas IL-6 o IL-10 que están presentes en el suero sanguíneo obtenido del modelo murino, con los Anti-IL6 y Anti-IL10 llenando los sitios activos de estos en función del tiempo.

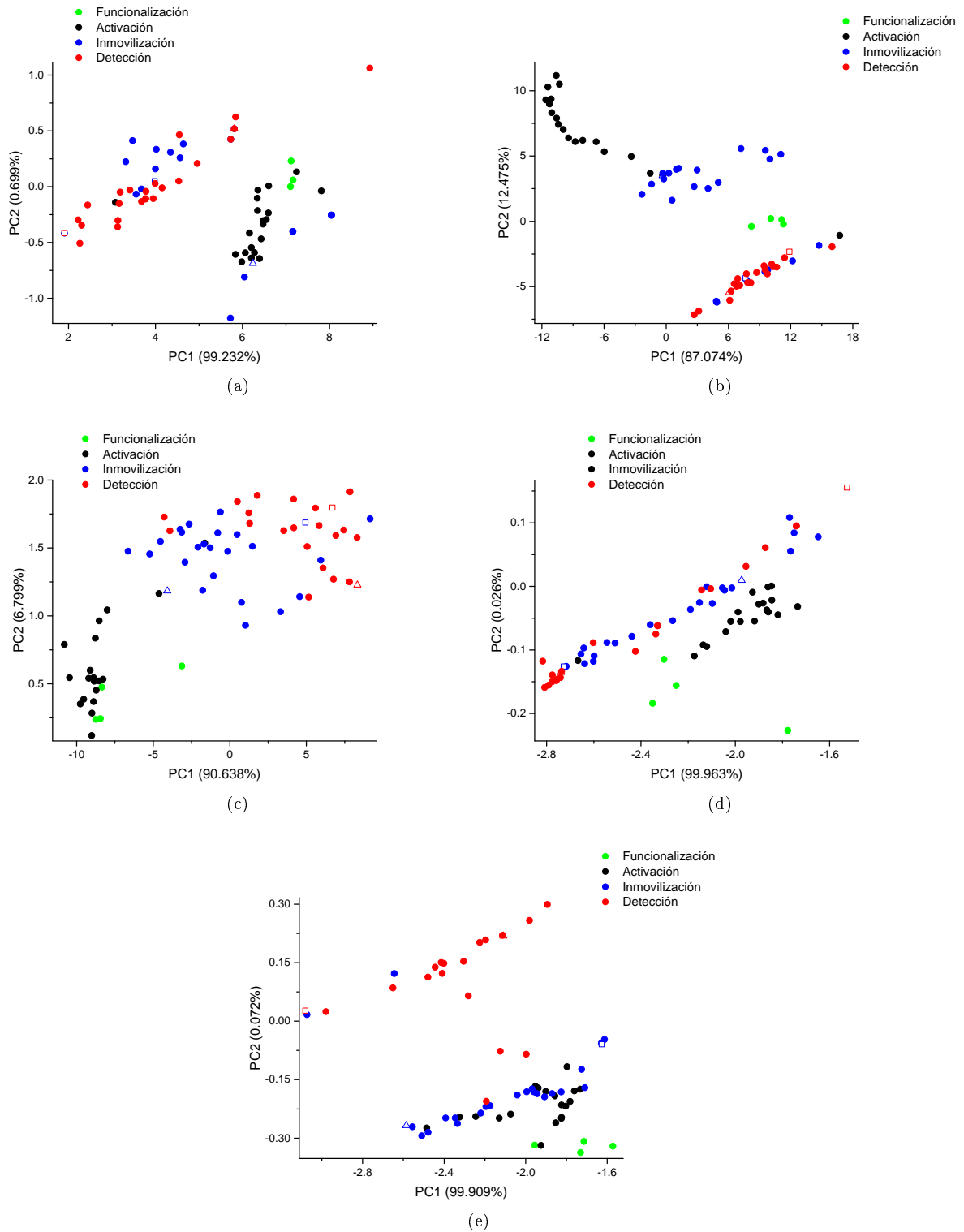


Figura 4.5: PCA de los Bio-TOF para detectar IL6: (a) biosensor 1, (b) biosensor 2, (c) biosensor 3, (d) biosensor 4 y (e) biosensor 5.

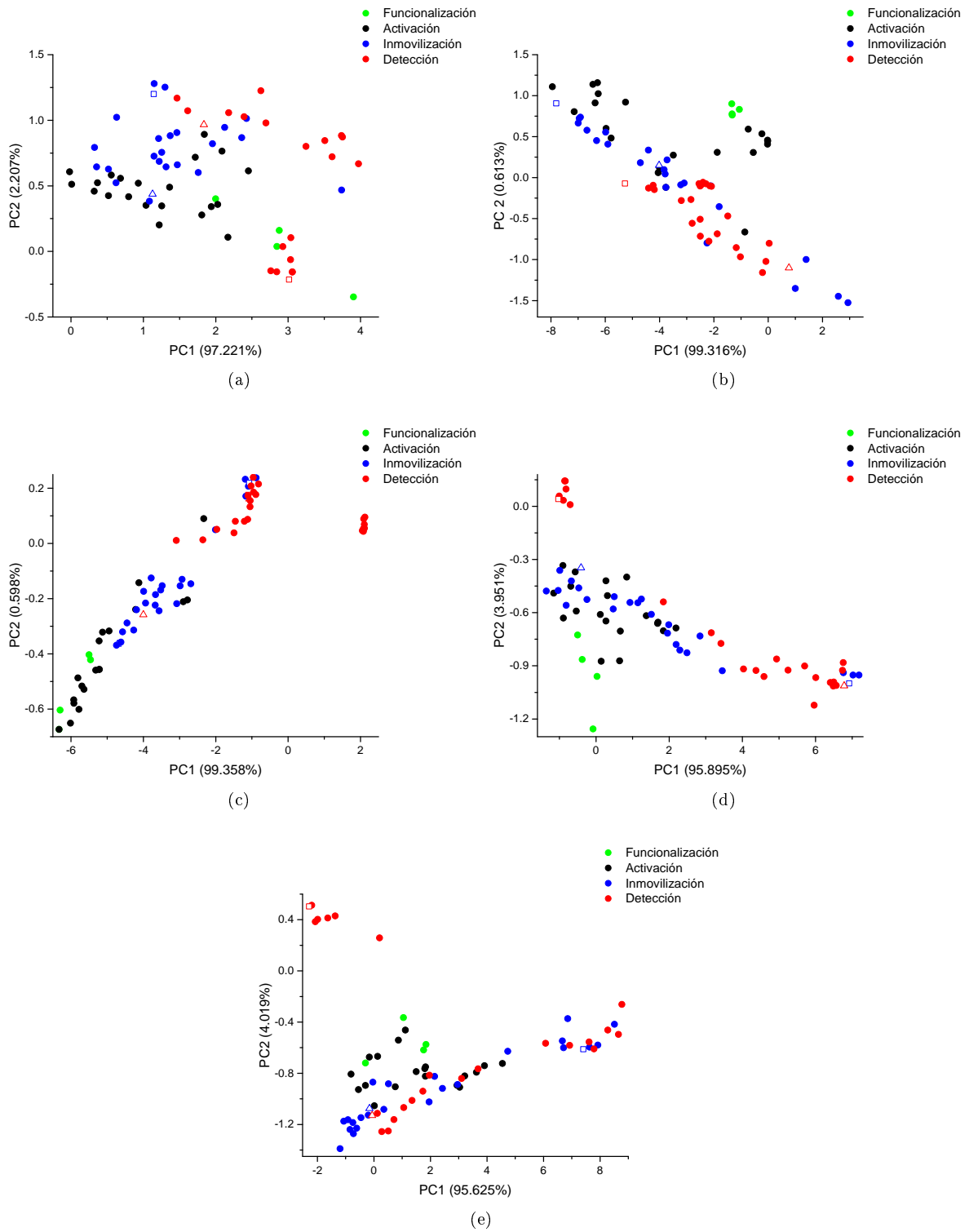


Figura 4.6: PCA de los Bio-TOF para detectar IL10: (a) biosensor 1 , (b) biosensor 2, (c) biosensor 3, (d) biosensor 4 y (e) biosensor 5.

En la Fig. 4.7 se muestra el PCA de los controles positivos (IL-6 e IL-10) y negativos (OPN5, Anti-KiSS y Proteinasas K) de los Bio-TOF que detectaron IL-6 e IL-10; IL-6 STD o IL-10 STD (círculos cían) comparandolos con los tres controles negativos utilizados en este trabajo, Anti-KiSS (estrellas moradas), Opn5 (estrellas verde oliva) y Proteinasas K (estrellas naranjas).

En la Fig. 4.7 (a) se realizó PCA usando los controles positivo (IL-6 STD) y negativos (Anti-KiSS, OPN5 y proteinasas K). Donde la PC1 tiene 96.778 % de la varianza, PC2 tiene el 2.807 % y PC3 tiene 0.373 % lo que corresponde a una varianza total del 99.959 % a la suma de las tres primeras componentes, lo que implica obtener casi toda la información de los datos medidos. Por otra parte, se observa que la detección de IL-6 STD (cuadro cían) se encuentra del lado negativo de PC1, PC2 y PC3, mientras que las respuestas de los controles negativos Anti-KiSS (estrellas moradas), Opn5 (estrellas verde oliva) y Proteinasas K (estrellas naranjas) se encuentran en el lado positivo de PC1 mientras que sus respuestas para en el plano PC2 y PC3 van del negativo al positivo. De la figura es posible observar que existe una separación bien marcada de la respuesta del Bio-TOF para el control positivo y los controles negativos.

Y en la Fig. 4.7 (b) se realizó PCA usando los controles positivo (IL-10 STD) y negativos (Anti-KiSS, OPN5 y proteinasas K). Donde PC1 tiene 99.954 % de la varianza, PC2 tiene el 0.039 % y PC3 tiene 0.005 % lo que corresponde a una varianza total del 99.999 % a la suma de las tres primeras componentes, lo que implica obtener casi toda la información de los datos medidos. Se observa que la detección de los datos del control positivo IL-10 STD (cuadro cían) y Proteinasas K (control negativo) se encuentran en el mismo plano es decir del lado negativo de PC1 y PC2 y lado positivo de PC3. Este resultado posiblemente se deba a la Proteinasas K es útil para eliminar proteínas contaminantes durante el proceso de purificación de algunas proteínas mientras que la IL-10 STD es una proteína neuroprotectora por lo cual intuimos que tienen funciones similares. Por otra parte, las respuestas de los controles negativos con Anti-KiSS (estrellas moradas), Opn5 (estrellas verde oliva) y Proteinasas K (estrellas naranjas) se encuentran en el lado positivo de PC1 mientras que para PC2 y PC3 van de negativo a positivo. De la figura es posible observar la discriminación de las proteínas IL-10 STD (Control positivo), OPN5 y Anti-KiSS (Controles negativos) debido a la existe una clara separación de estos en el plano PCA.

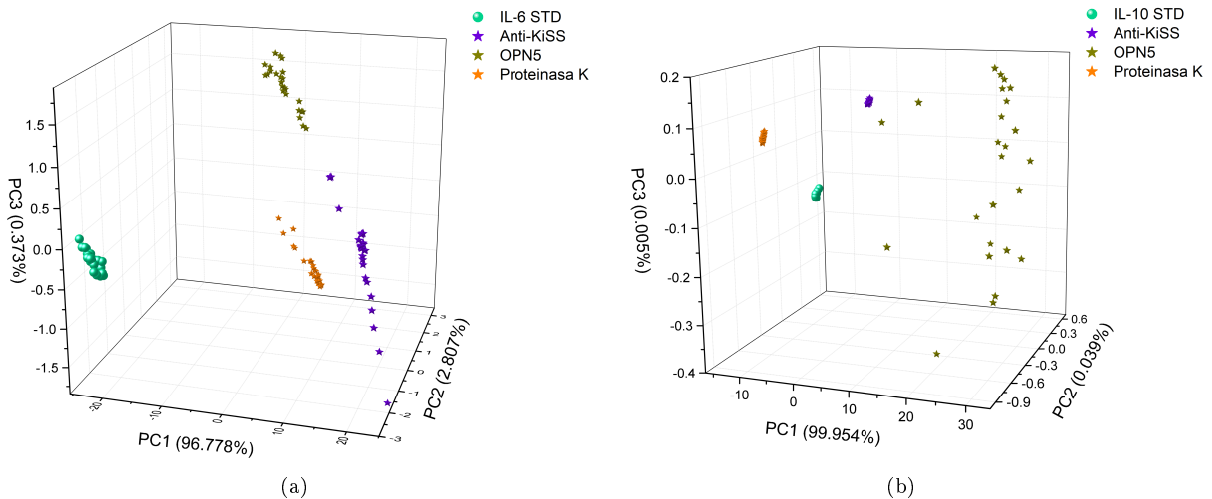


Figura 4.7: PCA de los controles (positivo y negativos) de los Bio-TOF que detectaron (a) IL-6 y (b) IL-10

En la Fig. 4.8 se muestra el PCA del Biosensor 1 al 5 (ver Tablas B.6 y B.7) del Apéndice B de los Bio-TOF los cuales detectaron IL-6 del suero sanguíneo obtenido del modelo murino a 2 y 6 horas post IC (2h ISC y 6h ISC, cuadrados (beige y café)), a 2 horas post IC con tratamiento EB (2h ISC+EB, cuadrados azules) y el suero sanguíneo sin IC al tiempo  $t=0$  (Sham, círculos verdes) y por último la IL-6 STD (círculos cian) (ver Fig. 4.8 (a)) e IL-10 (ver Fig. 4.8 (b)); Sham (círculos verdes), IL-6 STD o IL-10 STD (cuadro cian), 2h ISC+EB (cuadrados azules), 2h ISC (cuadrados beige) y 6h ISC (cuadrados cafés). El rango espectral utilizado para la obtención de estos resultados fue de 1300 a 1350 nm. En este intervalo, las primeras tres componentes principales explicaron una varianza total mayor del 99%.

En la Fig. 4.8 (a) se analizó la detección del Biosensor 1 al 5 (ver Tabla B.6), donde el Bio-TOF detectó IL-6 en los sueros sanguíneos y en el control positivo (IL-6 STD). Se observa que las muestras de Sham, 2h ISC, y 6h ISC se agrupan del lado positivo de PC2, mientras que la muestra de 2h ISC+EB se ubica en el lado negativo de esta misma componente. Este resultado es consistente con lo esperado, ya que el tratamiento con benzoato de estradiol (EB) en la muestra 2h ISC+EB reduce los niveles de IL-6 en comparación con las demás muestras. Por lo tanto, PC2 permite diferenciar entre muestras con y sin tratamiento, y permite identificar las muestras con mayor concentración de IL-6.

Finalmente, en la Fig. 4.8 (b) se analizó la detección del Biosensor 1 al 5 (ver Tabla B.7), donde el Bio-TOF detectó IL-6 en los sueros sanguíneos y en el control positivo (IL-10 STD). En este caso, las muestras de IL-10 STD y 2h ISC+EB se encuentran del lado negativo de PC2, mientras que las demás (Sham, 2h ISC y 6h ISC) se ubican del lado positivo. Este comportamiento también es coherente con lo esperado, ya que el tratamiento con EB ayuda la expresión de IL-10, y por ende, la muestra 2h ISC+EB presenta concentraciones más altas que las restantes, por lo tanto PC2 permite distinguir entre muestras con o sin tratamiento EB.

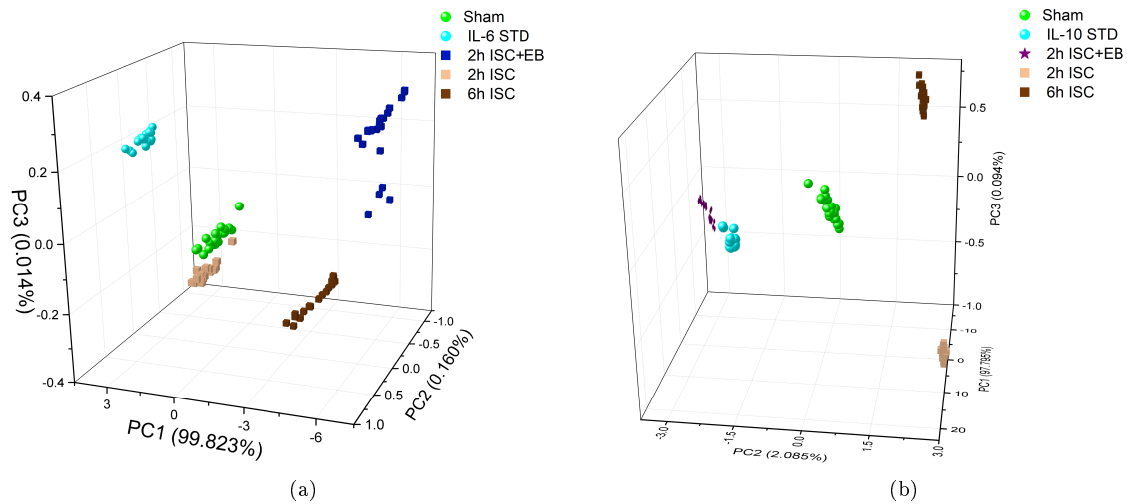


Figura 4.8: PCA de la detección en el control positivo y muestras obtenidas del modelo utilizando los Bio-TOF que detectaron (a) IL-6 y (b) IL-10.

### 4.3. Conclusiones Parciales

En esta primera parte del trabajo de tesis se desarrollaron biosensores en fibras ópticas de tipo Tapered, 8 con ERB Anti-IL6 y 8 con ERB Anti-IL10 para detectar IL-6 e IL-10 en suero sanguíneo del modelo murino inducido con IC en diferentes etapas. Donde las técnicas espectrales y morfológicas permitieron determinar la estructura y homogeneidad del biosensor construido mediante la inmovilización del Anti-IL6 y Anti-IL10 en TOF a través del ensamblado del biosensor.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica permitieron obtener una visión general de las superficiales en cada etapa del ensamblado del biosensor. La señal de salida de la transmisión permitió ver variaciones de amplitud y corrimientos, los cuales están asociados a la inmovilización del Anti-IL6 y Anti-IL10, y a la detección de la IL-6 e IL-10, presente en suero sanguíneo del modelo murino inducido con IC.

El PCA permitió analizar los datos de transmitancia, lo que nos ayudó a diferenciar las diferentes etapas del ensamblado del biosensor, así como la detección de la IL-6 e IL-10. Al realizar PCA utilizando los controles positivos y controles negativos, se observó que hay una separación clara del control positivo (IL-6 STD) con los controles negativos (Anti-KiSS, OPN5 y Proteinasa k) esto en los Bio-TOF que detectan IL-6. De igual manera, se identificó una separación entre el control positivo (IL-10 STD) y los mismos controles negativos en los Bio-TOF que detectan IL-10. Estos resultados confirman la capacidad discriminativa del Bio-TOF y del análisis PCA para distinguir entre la presencia o ausencia de IL-6 e IL-10.



## Capítulo 5

# Resultados: Biosensores en LPFG

Se realizaron 15 biosensores en LPFG, todos utilizaron como ERB la Anti-IL10. Cada biosensor interactuó con suero sanguíneo en diferentes tiempos post IC, proteína Human IL-10 Standard y otras proteínas que no son afines al Anti-IL10. En la Tabla B.3 del apéndice B, hay una mejor descripción de la solución a la que tuvo interacción cada biosensor.

### 5.1. Microscopía óptica

La caracterización morfológica en cada etapa se realizó mediante microscopía óptica, lo que ayudo a determinar que la superficie presenta una homogeneidad parcial. Primero en la Figura 5.1 (a), se observa la LPFG con un diámetro de  $125 \mu m$ , al hidroxilar la superficie se redujo a  $120 \mu m$  su diámetro, ver Figura 5.1 (b), la fibra se adelgaza debido a que el KOH remueve los enlaces Silicio (Si) de la superficie de la FO. Posteriormente al funcionalizar el diámetro aumentó  $5 \mu m$ , ver Figura 5.1 (c), el diámetro aumenta debido a la inmovilización del 3-AMPTS en la FO. En la Figura 5.1 (d) muestra la fibra después de inmovilizar el Anti-IL10, donde fueron ocupados todos los enlaces disponibles del 3-AMPTS. Las imágenes de microscopía permitieron poder determinar la homogeneidad superficial en cada etapa del ensamblado del biosensor. Y finalmente en la Fig. 5.2 se muestran algunos biosensores después de la detección, descritos en la tabla B.3.

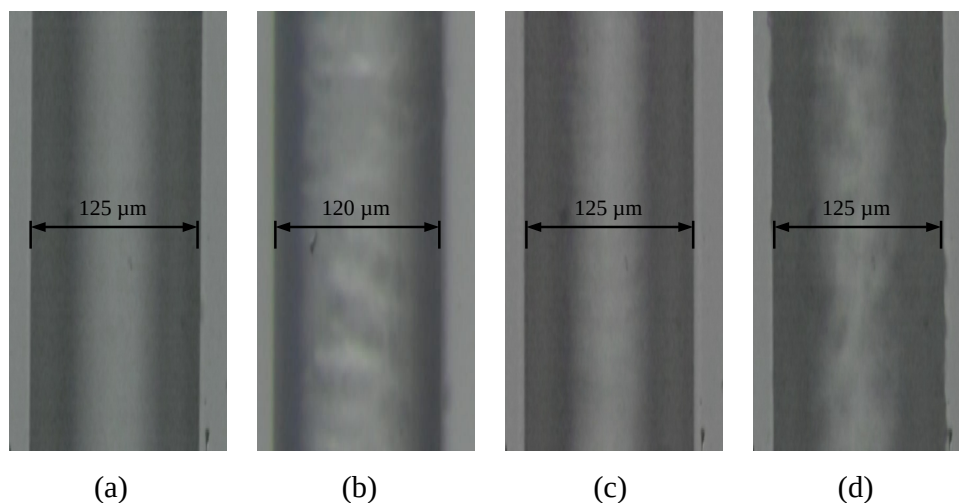


Figura 5.1: Imágenes ópticas obtenidas en la a) LPFG, b) Hidroxilación, c) Funcionalización, d) Inmovilización.

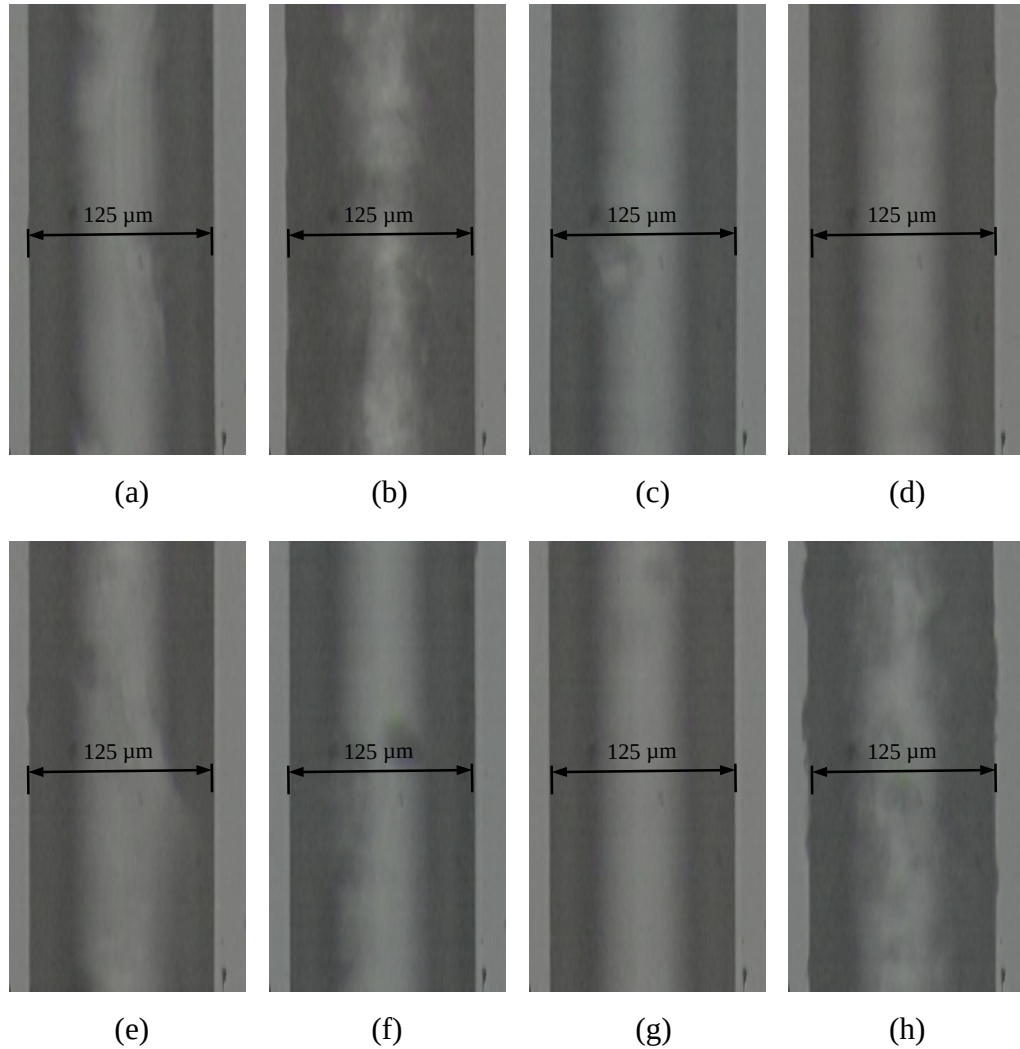


Figura 5.2: Imágenes ópticas obtenidas del Bio-LPFG para detectar IL-10: (a) 2h ISC , (b) Sham, (c) IL-6 STD, (d) 6h ISC, (e) 2h ISC+EB, (f) Anti-KiSS, (g) OPN5 y (h) Proteinasa K.

## 5.2. Transmisión

Los espectros de transmisión se midieron cada 5 minutos hasta que no se observaron más cambios en la señal transmitida. Para asegurar la detección de la proteína IL-10 en suero sanguíneo, los espectros de salida se obtuvieron en cada etapa del autoensamblaje del biosensor de LPFG. Los espectros de transmisión medidos en cada etapa del ensamblado del biosensor se midieron en un rango de 1250 nm a 1450 nm.

La figura 5.3 (a) muestra los espectros de salida en cada etapa del ensamblado del biosensor 11 (IL-10 STD). El biosensor se sumergió en proteína IL-10 STD, para asegurar la detección de IL-10. Estos espectros permitieron tener un control positivo, debido a que es un hecho que está presente la IL-10, y también ayudó a corroborar que hay presencia de IL-10 en suero sanguíneo.

Las variaciones de amplitud y los desplazamientos de los espectros de transmisión pueden interpretarse como el cambio del índice de refracción debido a los enlaces covalentes que están presentes en cada etapa. Por lo tanto para correlacionar estas variaciones y desplazamientos de los espectros de transmisión de cada biosensor se realizó el PCA a los datos experimentales.

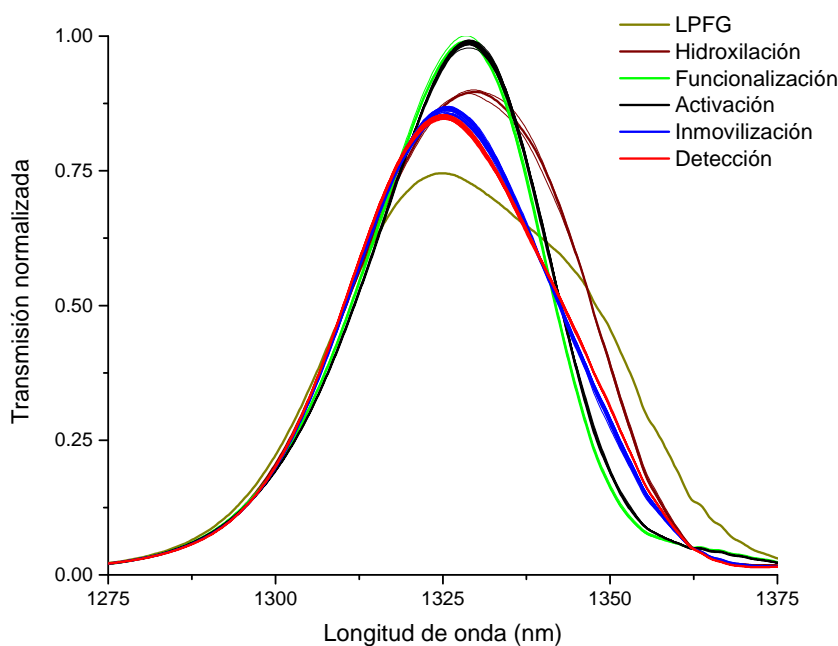


Figura 5.3: Espectro de salida en cada etapa del ensamblado del Biosensor 11 (IL-10 STD).

La Figura 5.4, muestra el PCA en la longitud de onda de 1275 a 1375 nm del biosensor 11 (IL-10 STD); LPFG (círculos verde olivo), hidroxilación (círculos café), funcionalización (círculos verde), activación (círculos negros), inmovilización (círculos azules) y detección (círculos rojos). Es posible observar que cada etapa se presenta una tendencia de agrupamiento de la nube de puntos.

La primera etapa del desarrollo del biosensor (LPFG) se encuentra en el II cuadrante, la etapa de la hidroxilación se encuentra en el I cuadrante. Mientras que la etapa de funcionalización y activación se encuentran en el IV cuadrante, debido a que no se agregan enlaces en la activación solo se orientan perpendicularmente los enlaces presentes, observándose poca diferencia entre cada etapa.

La etapa de la inmovilización y detección se encuentran en el III cuadrante. Fue necesario realizar un acercamiento en las etapas de inmovilización y detección para asegurar que estas etapas se aglomeren en una nube de puntos. Por lo tanto es posible discriminar cada etapa del ensamblado del biosensor.

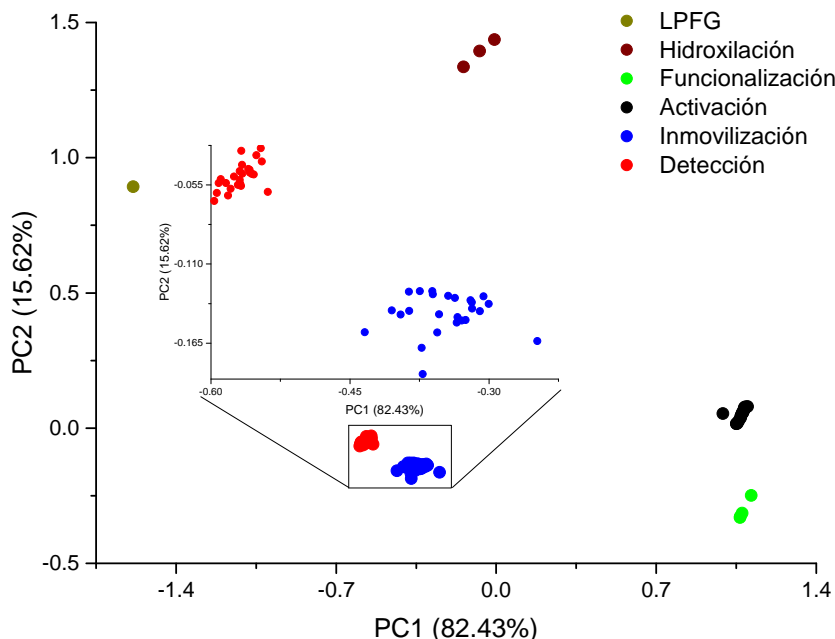


Figura 5.4: PCA de los espectros de salida en cada etapa del ensamblado del Biosensor 11 (IL-10 STD).

El biosensor Bio-LPFG fue capaz de detectar la presencia de IL-10 tanto en las muestras de suero sanguíneo con isquemia cerebral inducida (ISC) como en aquellas tratadas con estradiol benzoato (ISC+EB). Para evaluar las diferencias en la cantidad de proteína detectada entre estos dos tipos de suero sanguíneo, se utilizó un clasificador SVM. La Fig. 5.5 muestra los resultados de clasificación obtenidos mediante SVM para el Bio-LPFG, considerando los diferentes tiempos de inducción.

En las Fig. 5.5(a) y (b), se observa que las variaciones a lo largo de PC2 son cercanas; sin embargo, la muestra ISC presenta una mayor variación, lo que podría estar asociado a una menor concentración de IL-10 en el suero sanguíneo. Esta menor concentración implicaría que el biosensor requiere más tiempo para detectar toda la proteína presente en la muestra.

Por otro lado, las Fig. 5.5(c) y (e) muestran una menor variación en las muestras ISC+EB correspondientes a los tiempos de 6 h y 24 h. Donde las mediciones se aglomeran alrededor de un punto, lo que podría deberse a una saturación del biosensor. Mientras que en las muestras ISC correspondientes a estos tiempos muestran mayor dispersión, probablemente porque el biosensor necesita más tiempo para detectar la proteína presente en su totalidad.

Un caso particular se presenta en la Fig. 5.5(d), donde la muestra de 12 h ISCEB muestra una variación considerablemente mayor en PC2 en comparación con la muestra ISC del mismo tiempo. Esto podría indicar que el biosensor también tardó más en detectar completamente la IL-10 presente en la muestra tratada. Además, se observa que, con excepción de la Fig. 5.5(b), las muestras en todas las figuras se ubicaron en el lado negativo del componente principal PC1. En la Fig. 5.5(b), sin embargo, las muestras se posicionaron en el lado positivo.

Finalmente, la Fig. 5.5(f) presenta la matriz de confusión correspondiente a las clasificaciones mostradas en las figuras anteriores (Fig. 5.5(a-e)), en la cual se obtuvo un valor de F1-Score de 1, es decir que fueron clasificados todas las mediciones de 2h ISC y 2h ISC+EB como la clase 2h ISC y 2h ISC+EB, respectivamente, lo que indica que el clasificador SVM fue eficiente en su totalidad.

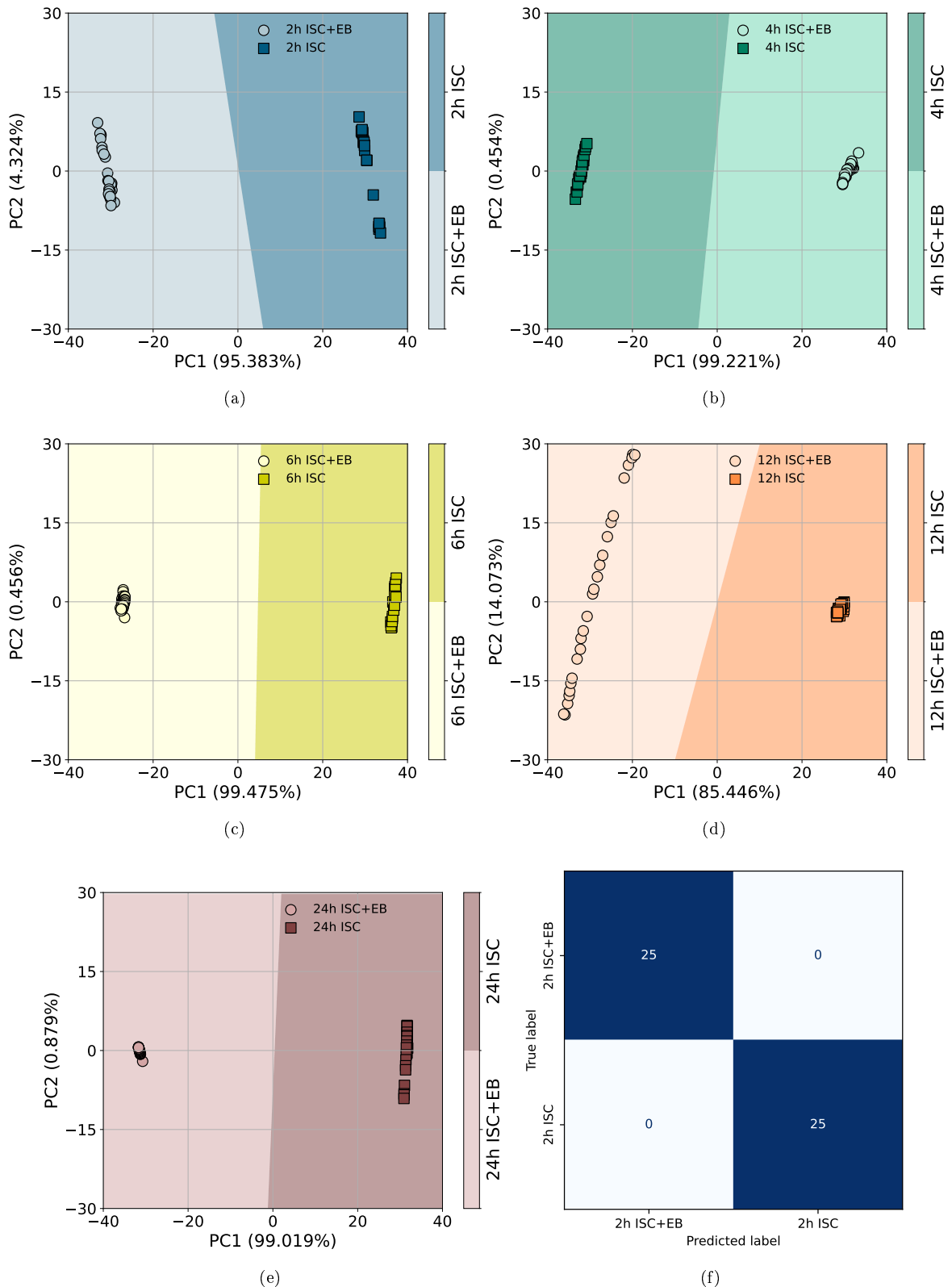


Figura 5.5: SVM con kernel lineal utilizando PCA para clasificar las muestras en suero sanguíneo (ISC, ISC+EB) a diferentes tiempos y su matriz de confusión.

Con el objetivo de identificar una posible tendencia en el aumento de la concentración de IL-10 en las muestras de suero sanguíneo con ISC y ISC+EB, se aplicó un clasificador SVM sobre los datos obtenidos mediante PCA, considerando los tiempos de inducción de 2, 4, 6, 12 y 24 horas, así como el control positivo (IL-10 STD).

En la Fig. 5.6 (a-b) se observa que el clasificador logró diferenciar de forma efectiva todas las muestras de suero sanguíneo, lo que indica que existen variaciones detectables en la concentración de IL-10 entre las diferentes condiciones y tiempos evaluados.

En particular, la muestra de 12 h ISC+EB presenta una mayor dispersión, lo que podría atribuirse a que el biosensor tarda más tiempo en detectar la baja cantidad de IL-10 presente en esa muestra. Este comportamiento es consistente con trabajos previos, como el reportado en la Ref. [46], donde se observó que a las 12 horas post-inducción con tratamiento existe una baja expresión proteica.

Además, se aprecia que las muestras de 2 h y 6 h ISC+EB se ubican del lado negativo del componente principal PC2, al igual que la muestra IL-10 STD. Esta similitud en la ubicación podría estar relacionada con una mayor cantidad de IL-10 en esas muestras. Por el contrario, las muestras de 4 h, 12 h y 24 h ISC+EB se alejan de esa región, lo que sugiere una menor concentración de la proteína.

Tomando en cuenta la distribución observada en la Fig. 5.6(a), se puede identificar una tendencia en sentido horario, que indicaría un posible orden creciente en la concentración de IL-10 en las muestras ISC+EB: 24 h < 12 h < 4 h < 2 h < 6 h.

Siguiendo esta misma lógica, para el caso de las muestras ISC, la Fig. 5.6(b) sugiere la siguiente progresión en la detección de IL-10, de menor a mayor cantidad: 6 h < 2 h < 4 h < 12 h < 24 h.

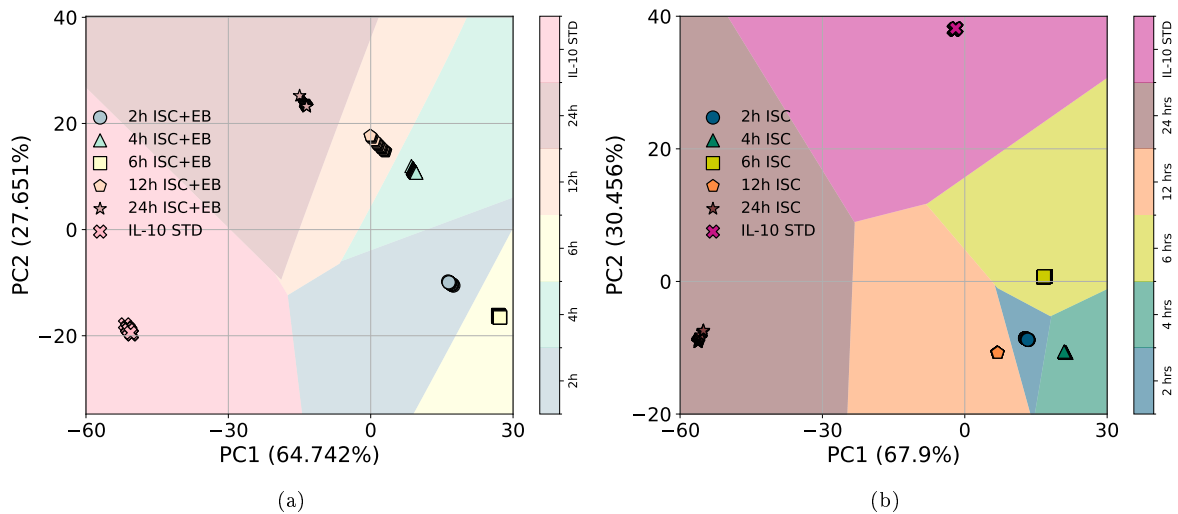


Figura 5.6: SVM con kernel lineal utilizando PCA para clasificar los diferentes tiempos de inducción en las muestras de suero sanguíneo de ISC y ISC+EB.

Dado que el tiempo de inducción en muestras ISC e ISC+EB podría estar relacionado con la expresión de IL-10, se propuso calcular la distancia al origen (es decir, al punto (0,0)) en el espacio de componentes principales. Esta distancia se representa en la Fig. 5.7(a) para las muestras de suero sanguíneo ISC+EB y en la Fig. 5.7(c) para las muestras ISC.

Al graficar dichas distancias, se observó que en el caso de las muestras ISC+EB, las correspondientes a 6 h y al control positivo (IL-10 STD), presentaron una mayor distancia al origen (Fig. 5.7(b)). Este comportamiento sugiere una mayor expresión de IL-10 en estas muestras tratadas con EB. Por otro lado, en las muestras ISC, las mayores distancias se encontraron en 24 h y nuevamente en la muestra IL-10 STD, lo cual podría indicar una mayor cantidad de IL-10 en la muestra de 24 h. Esto es consistente con el hecho de que, en ausencia del tratamiento con EB, el modelo murino podría requerir más tiempo para expresar dicha proteína como parte del proceso natural de recuperación.

Estos resultados coinciden con el análisis previo basado en SVM, en el cual también se observó una mayor expresión de IL-10 en las muestras 6 h ISC+EB y 24 h ISC, reforzando así la validez de ambos enfoques analíticos.

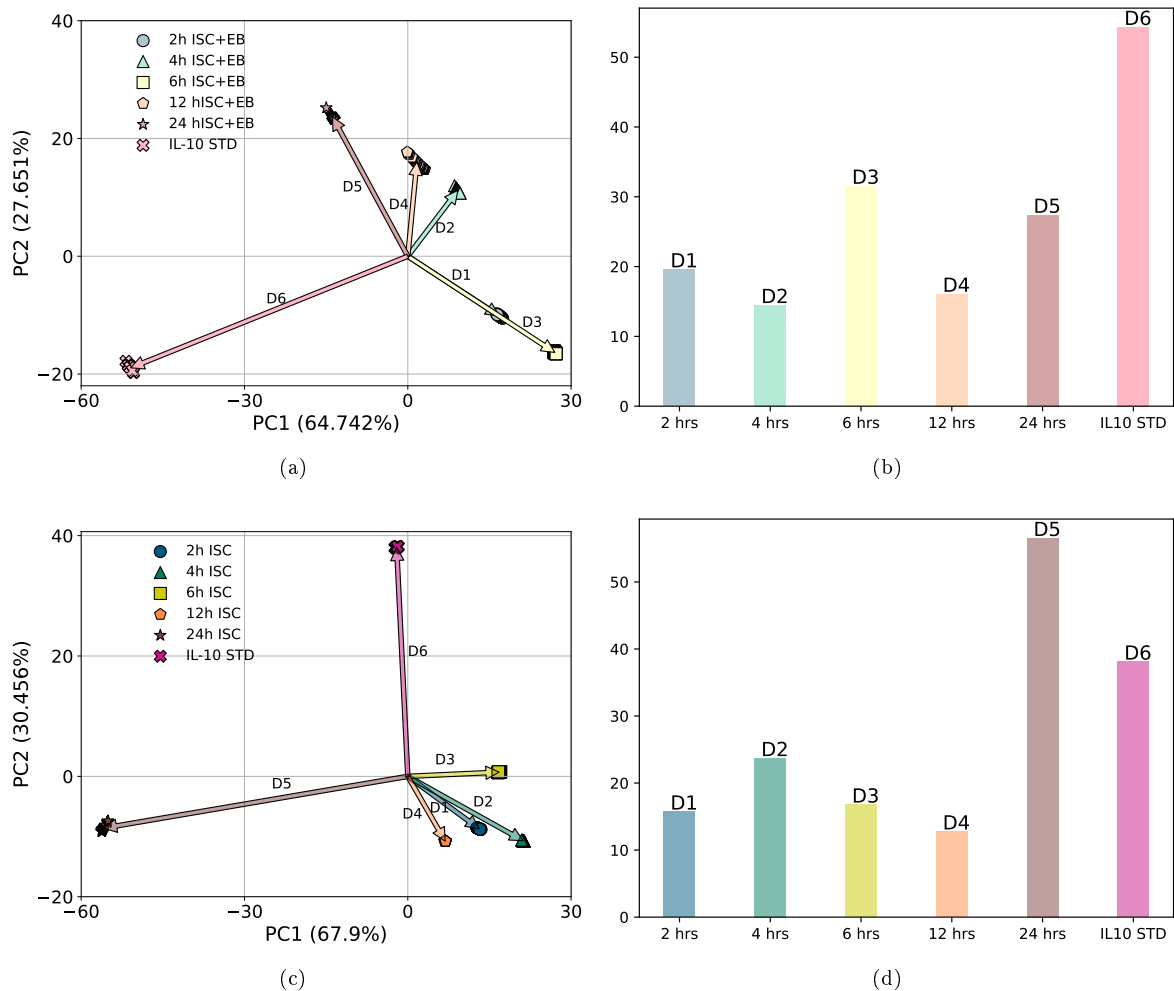


Figura 5.7: Histograma de la distancia al origen de cada tiempo ISC+EB y ISC.

En la Figura 5.8 se muestra el PCA en el intervalo de la longitud de onda de 1275 a 1375 nm de la detección del Biosensor 11 (IL-10), Biosensor 12 (Sham), Biosensor 13 (Anti-KiSS), Biosensor 14 (OPN5) y Biosensor 15 (IL-6 STD); IL-10 STD (circulo cían), Anti-KiSS (estrella morada), Control

$t=0$  (circulo verde limón) Opn5 (estrella verde oliva) y IL-6 (estrella naranja).

Donde PC1 corresponde al 98.94% de la varianza del sistema lineal y 99.92% a la suma de las tres primeras componentes. Se observa que la detección de IL-10 STD (circulo cian) se encuentra en el III cuadrante aglomerado en un solo punto. De la figura es posible observar la discriminación entre los diferentes tiempos de detección, debido a la tendencia de agrupación de los puntos observada en el gráficos de PCA.

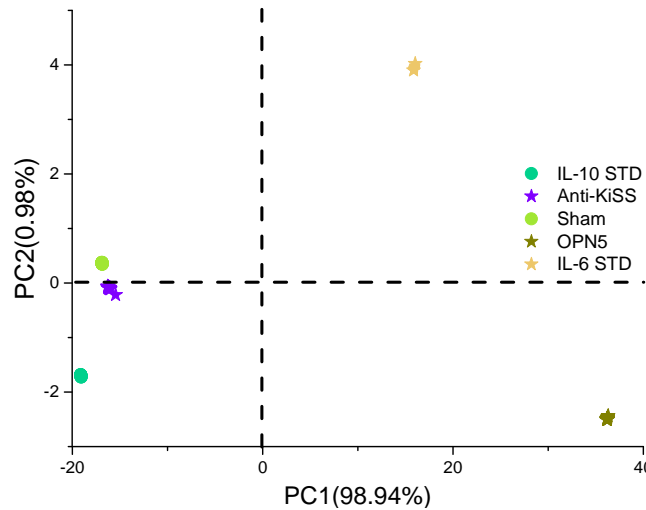


Figura 5.8: PCA de los datos experimentales de los biosensores LPFG para IL-10.

### 5.3. Espectroscopía de infrarrojo en modo micro

En esta sección se muestran los resultados obtenidos mediante la espectroscopía vibracional de infrarrojo en la región del mediano, que nos debería de permitir determinar el tipo de enlaces presentes en la superficie de la fibra. En la figura 5.9 se muestran los espectros infrarrojos obtenidos de los biosensores en LPFG. Para la caracterización de la detección de los biosensores se analizaron los espectros de infrarrojo en el rango de  $1400$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , ya que es la región donde nos interesa ver las variaciones espectrales.

La Figura 5.9 (a) muestra los espectros infrarrojo en modo micro para la detección en IL-10 STD y 2, 4, 6, 12 y 24 hrs con y sin tratamiento, en donde se observan bandas asociadas a los enlaces NH y NH-R propios de la proteína IL-10 entre los  $1450$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$ . La intensidad de absorbancia del biosensor 11 (IL-10 STD) es mayor comparada con los otros espectros, esto puede deberse a que hay una mayor presencia de IL-10.

En la Figura 5.9 (b), muestra los espectros infrarrojo en modo micro de los controles positivo y negativos, se observan diferencias entre el control positivo y los controles negativos tanto en amplitud como corrimientos de las bandas asociadas a los enlaces NH y NH-R propios de la proteína IL-10 entre los  $1450$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

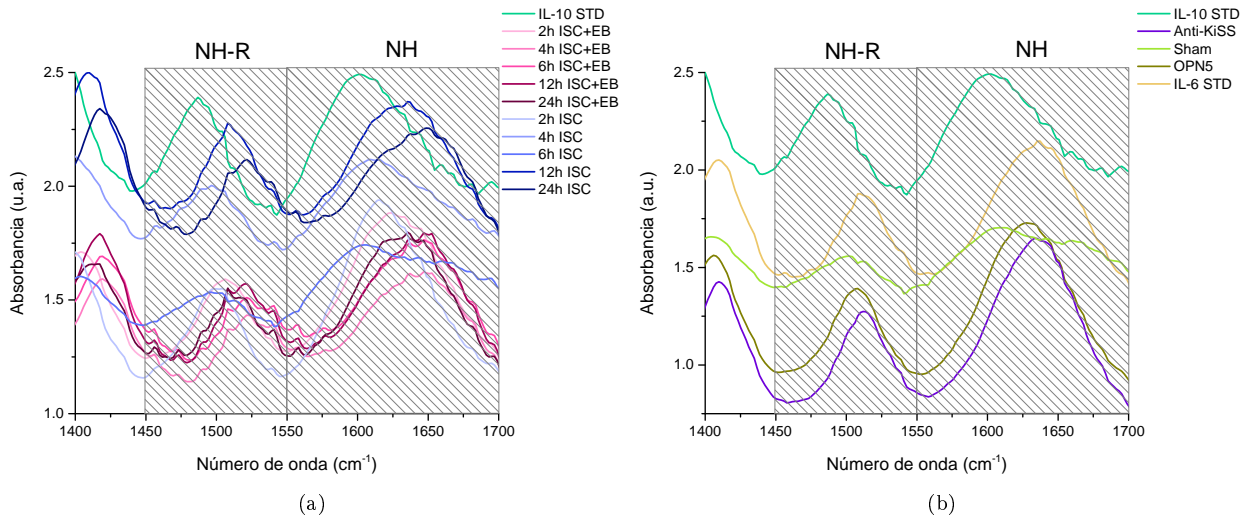


Figura 5.9: Espectros de infrarrojo en modo micro de los biosensores en LPFG, (a) IL-10 STD y todos los tiempos inducidos con y sin tratamiento y (b) Control positivo y controles negativos.

Sin embargo, para poder observar mayores diferencias entre los diferentes tiempos con y sin tratamiento, los resultados experimentales fueron procesados por el método de PCA, para revelar más detalles de las variaciones espectrales. En la Figura 5.10, se observa que PC1 permite diferenciar entre suero sanguíneo inducido con y sin tratamiento. PC1 positivo para suero sanguíneo inducido con tratamiento (puntos en tonos rojo) y PC1 negativo para suero sanguíneo inducido sin tratamiento (puntos en tonos azul).

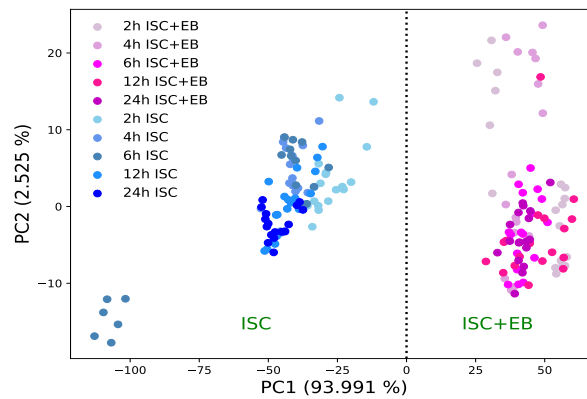


Figura 5.10: PCA de los espectros de infrarrojo en modo micro de los biosensores en LPFG.

## 5.4. Conclusiones Parciales

Se desarrollaron biosensores basados en LPFG, para la detección de IL-10 en suero sanguíneo del modelo murino inducido con IC en diferentes etapas. Donde las técnicas espectrales y morfológicas permitieron determinar la estructura y homogeneidad del biosensor construido mediante la inmovilización del Anti-IL10 en LPFG a través del ensamblado del biosensor.

La señal de salida de la transmisión permitió ver variaciones de amplitud y desplazamiento de longitud de onda en los espectros de salida de los biosensores de LPFG, durante cada etapa de ensamblado del biosensor y detección de IL-10, presente en suero sanguíneo del modelo murino inducido con IC.

Las imágenes de microscopía óptica nos permitieron poder determinar la homogeneidad parcial en la superficie en cada etapa del ensamblado y en la detección del Bio-LPFG. La señal de salida de la transmisión permitió ver variaciones de amplitud y corrimientos, los cuales están asociados a la inmovilización del Anti-IL10 y a la detección de IL-10, presente en suero sanguíneo del modelo murino inducido con IC.

Mediante PCA se confirmó que el autoensamblaje de los biosensores en LPFG, así como la detección de la proteína IL-10 en suero sanguíneo se realizaron correctamente. Al realizar PCA utilizando el control positivo (IL-10 STD) y controles negativos (Anti-KiSS, OPN5 y Proteínasa k), se observó que hay una separación clara del control positivo (IL-10 STD) con los controles negativos (Anti-KiSS, OPN5 y Proteínasa k).

El análisis mediante SVM permitió diferenciar efectivamente las muestras de suero sanguíneo ISC+EB y ISC. Además, la combinación del clasificador SVM con el cálculo de la distancia al origen en el espacio PCA permitió identificar una mayor expresión de IL-10 en las muestras de 6 h ISC+EB y 24 h ISC. Estos resultados indican que tanto el tratamiento con EB como el tiempo de inducción influyen significativamente en la detección de IL-10 en suero sanguíneo, lo que los convierte en herramientas útiles para evaluar la respuesta inflamatoria en el modelo murino.

Finalmente, los espectros de IR permitieron determinar la estructura y homogeneidad del Bio-LPFG construido mediante el autoensamblaje del anticuerpo policlonal IL-10 en la matriz LPFG. Los resultados obtenidos permitieron identificar bandas características de los enlaces NH y NH-R asociados a la proteína IL-10. Además, a través del análisis por PCA se encontró que PC1 permite distinguir entre muestras de suero con tratamiento y sin tratamiento, demostrando la capacidad del enfoque combinado de espectroscopía infrarroja y PCA para diferenciar variaciones espectrales asociadas tanto a la presencia de IL-10 como al efecto del tratamiento EB en el modelo murino.

## Capítulo 6

# Resultados: Biosensores en MZI

Se realizó el análisis de un total de 16 biosensores Bio-MZI: ocho de ellos inmovilizados con el anticuerpo Anti-IL-6, denominados Bio-MZI IL6, y ocho con el anticuerpo Anti-IL-10, denominados Bio-MZI IL10.

Los Bio-MZI IL6 fueron expuestos a muestras de suero sanguíneo inducido a diferentes tiempos de isquemia (ISC): 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h. Por su parte, los Bio-MZI IL10 interactuaron con muestras de suero sanguíneo obtenidos a los mismos intervalos de tiempo, pero en el modelo murino se les proporciono un tratamiento con EB (ISC+EB): 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h.

Para evaluar la selectividad y afinidad de los biosensores (Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10), se utilizaron diferentes proteínas como controles positivos y negativos. Los controles negativos incluyeron los analitos: Control sano, Anti-Kiss, Opn5 y Sham. Como control positivo, se empleó IL6 STD para los Bio-MZI IL6 y IL10 STD para los Bio-MZI IL10.

Además, con el objetivo de analizar la respuesta del biosensor frente a variaciones de temperatura y humedad, se utilizó PBS como analito de referencia, dado que no presenta afinidad específica con el biosensor. El rango de interacción fue el mismo que para las proteínas analizadas. En el Apéndice B, se presentan las Tablas B.4 y B.5, donde se proporciona una descripción más detallada de cada analito.

### 6.1. Transmisión

Los espectros de transmisión se midieron cada 5 minutos hasta que no se observaron más cambios en la señal transmitida. Para asegurar la detección de la proteína IL-10 en suero sanguíneo, los espectros de salida se obtuvieron en cada etapa del autoensamblaje del Bio-MZI, dentro del rango espectral de 1375 a 1575 nm. Esta configuración permite evaluar las variaciones asociadas a cada etapa funcional del biosensor.

Las Fig. 6.1 y 6.2 muestran los espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10, respectivamente. En las figuras se logra observar mayores variaciones en amplitud y desplazamientos en los espectros de transmisión comparados con los espectros en biosensores en LPFG (ver Fig. 5.3).

En el caso de los Bio-MZI IL6, se observaron pocas variaciones en la etapa de detección en los tiempos de 2, 4 y 24 horas, en comparación con las mayores variaciones espectrales observadas a las 0, 6 y 12 horas. Por otro lado, los Bio-MZI IL10 presentaron mayores variaciones en los tiempos de 0, 2, y 4 horas, mientras que a las 24 horas se observaron pocas variaciones espectrales.

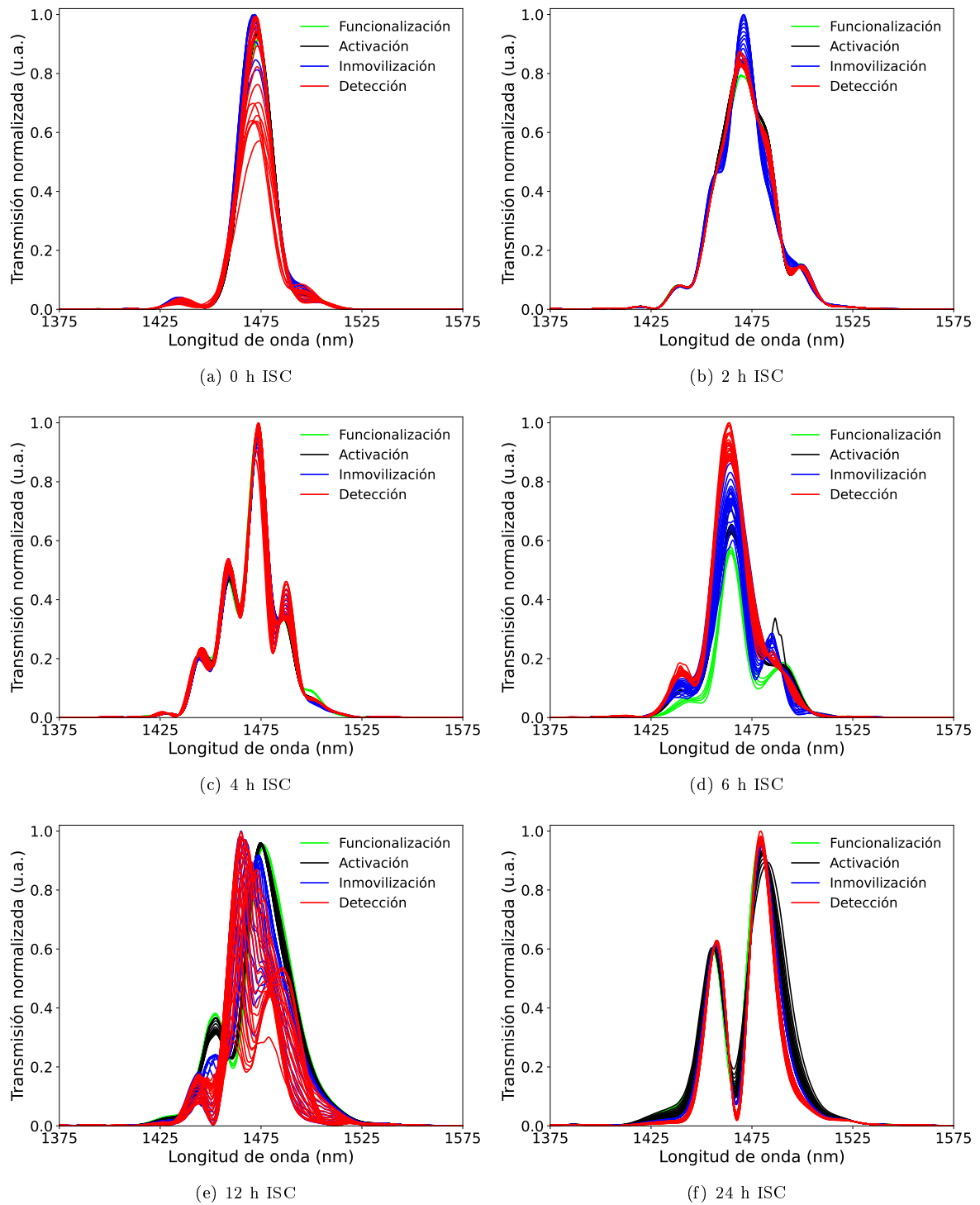


Figura 6.1: Espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los Bio-MZI IL6.

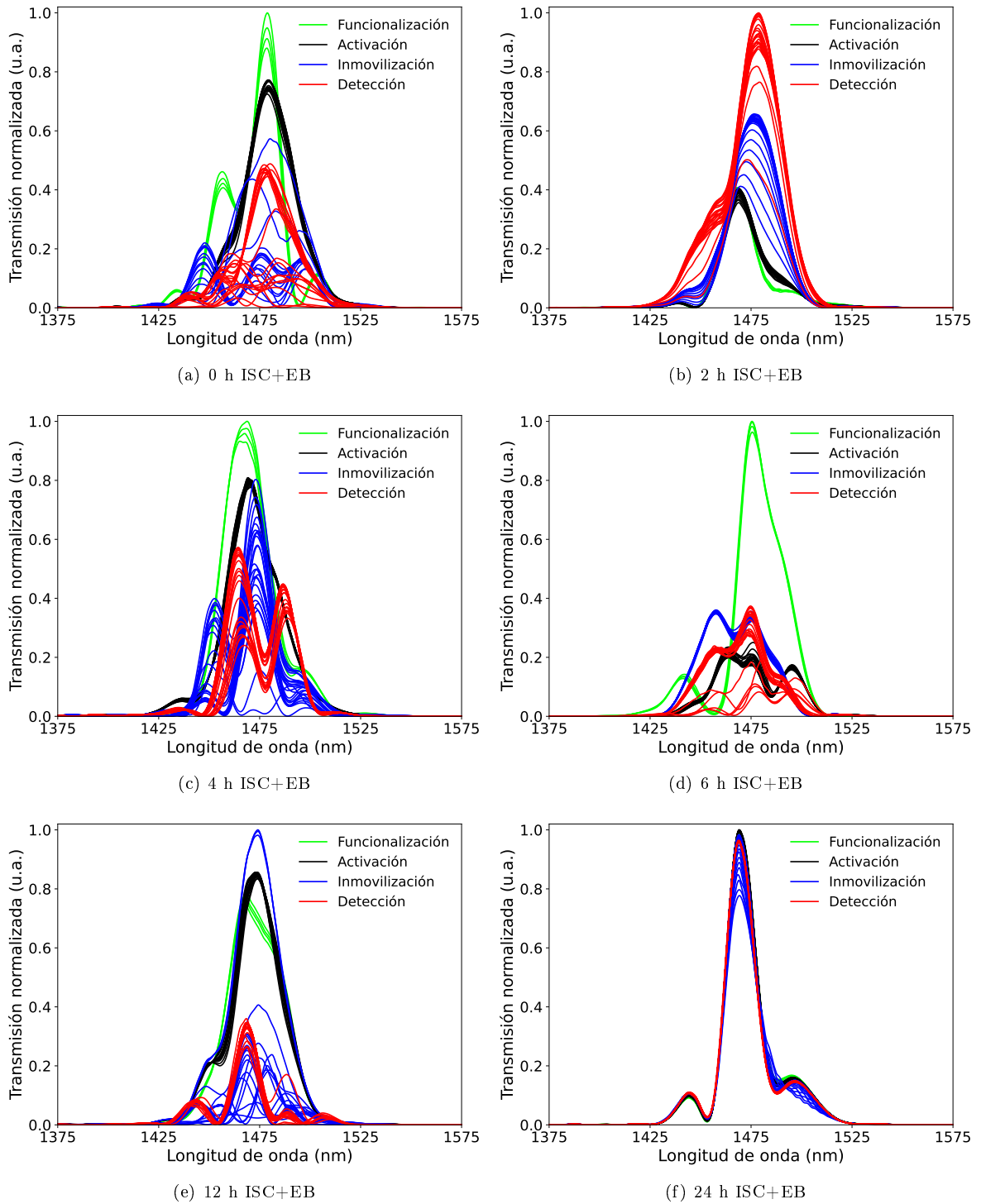


Figura 6.2: Espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los Bio-MZI IL10.

En la Fig. 6.3 se presentan los espectros de salida en cada etapa del ensamblado del Bio-MZI IL6 al interactuar con IL-6 STD y muestra del control sano. La Fig. 6.3(b) muestra mayores variaciones espectrales en comparación con la Fig.6.3(a), correspondiente a IL-6 STD. Esta diferencia podría atribuirse a una mayor concentración basal de IL-6 presente en la muestra del control sano.

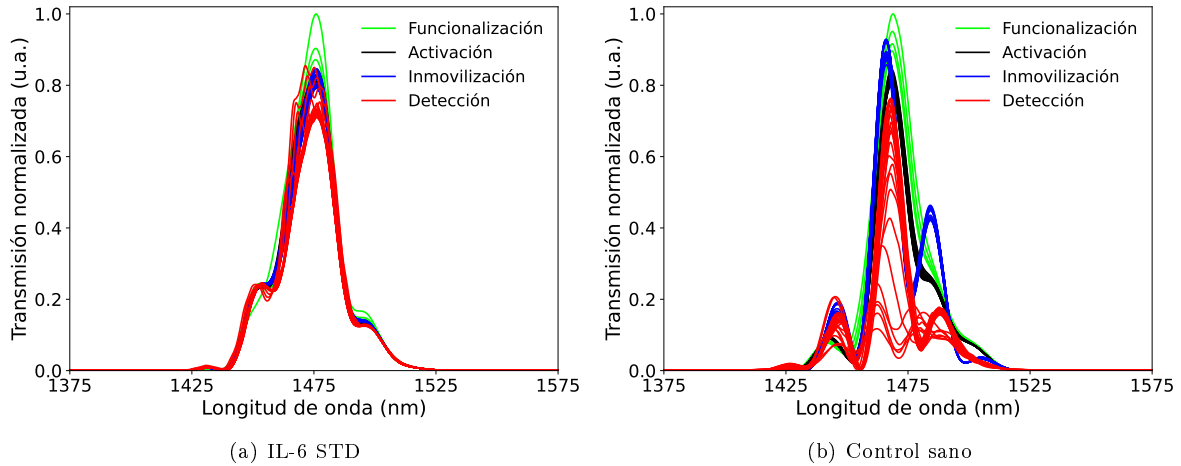


Figura 6.3: Espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los Bio-MZI IL6 detectando en los controles positivo y sano.

En la Figura 6.4 se muestran los espectros de salida obtenidos en cada etapa del ensamblado del Bio-MZI IL10, al interactuar con IL-10 STD y muestra del control sano, donde se observan variaciones espectrales en ambos casos; sin embargo, aunque los patrones son similares, se observan menores variaciones en la muestra del control sano, lo cual podría indicar una menor concentración de IL-10.

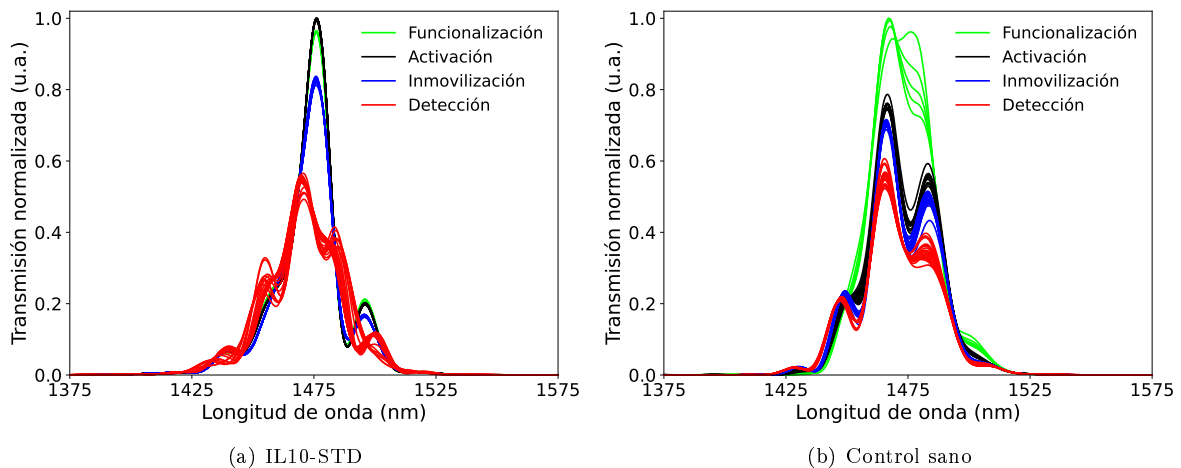


Figura 6.4: Espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los Bio-MZI IL10 detectando en los controles positivo y sano.

Las variaciones pueden interpretarse como el cambio en el índice de refracción debido a los enlaces covalentes presentes en cada etapa del ensamblado, y en la etapa de detección de IL-6 e IL-10 por los Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10, respectivamente. Por lo tanto, para realizar un análisis más profundo de las variaciones y desplazamientos de los espectros de transmisión de cada biosensor, se utilizó el PCA

para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos, en la longitud de onda de 1375 a 1575 nm de los Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10.

En la tabla siguiente se muestran los valores de las primeras cuatro componentes del PCA y la suma de estos valores. Se observa que, en el caso de ISC, el valor mínimo de la varianza de PC1 fue de 40.129% a las 0h ISC, y el valor máximo fue de 84.038% a las 24h ISC. Por lo tanto, usar cuatro componentes permite explicar la mayor parte de la varianza en los datos del sistema lineal de ecuaciones generado con los datos experimentales, alcanzando más del 82.3% de la varianza al sumar las cuatro componentes (ver Tabla 6.1). En el caso de ISC+EB, el valor mínimo de PC1 fue de 39.939% a las 4h ISC+EB, y el máximo fue de 76.769% a las 2h ISC+EB. Por lo tanto, también fue necesario usar las primeras cuatro componentes para alcanzar más del 90% de la varianza.

*Tabla 6.1: Datos del PCA de los Bio-MZI.*

Etiqueta	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)	PC4 (%)	Suma (%)
0 h ISC	40.129	19.743	13.901	8.574	82.347
2 h ISC	65.843	15.061	6.811	4.959	92.674
4 h ISC	60.299	18.99	9.219	5.433	93.941
6 h ISC	44.204	34.038	7.103	5.222	90.566
12 h ISC	67.859	23.176	6.599	0.982	98.616
24 h ISC	84.038	10.615	3.517	0.862	99.0319
0 h ISC+EB	49.706	26.014	12.512	5.413	93.645
2 h ISC+EB	76.769	16.929	2.351	2.01	98.059
4 h ISC+EB	39.939	28.713	19.237	3.666	91.554
6 h ISC+EB	48.48	35.904	9.294	4.994	98.672
12 h ISC+EB	57.185	19.806	9.663	4.19	90.844
24 h ISC+EB	62.876	30.666	3.284	1.135	97.961

En las Fig. 6.5 y 6.6, se muestra el PCA de los Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10, respectivamente. En estas figuras, las diferentes etapas están representadas de la siguiente manera: funcionalización (círculos verde), activación (círculos negros), inmovilización (círculos azules) y detección (círculos rojos). Es posible observar que para Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10 las etapas de funcionalización y activación se encuentran aglomeradas en una nube de puntos. En las etapas de inmovilización y detección, donde en los primeros minutos de la inmovilización y detección la nube de puntos de los datos experimentales tienden a aglomerar y conforme aumenta el tiempo de inmovilización y detección, los puntos comienzan a mostrar una tendencia.

# Resultados: Biosensores en MZI

## 6.1 Transmisión

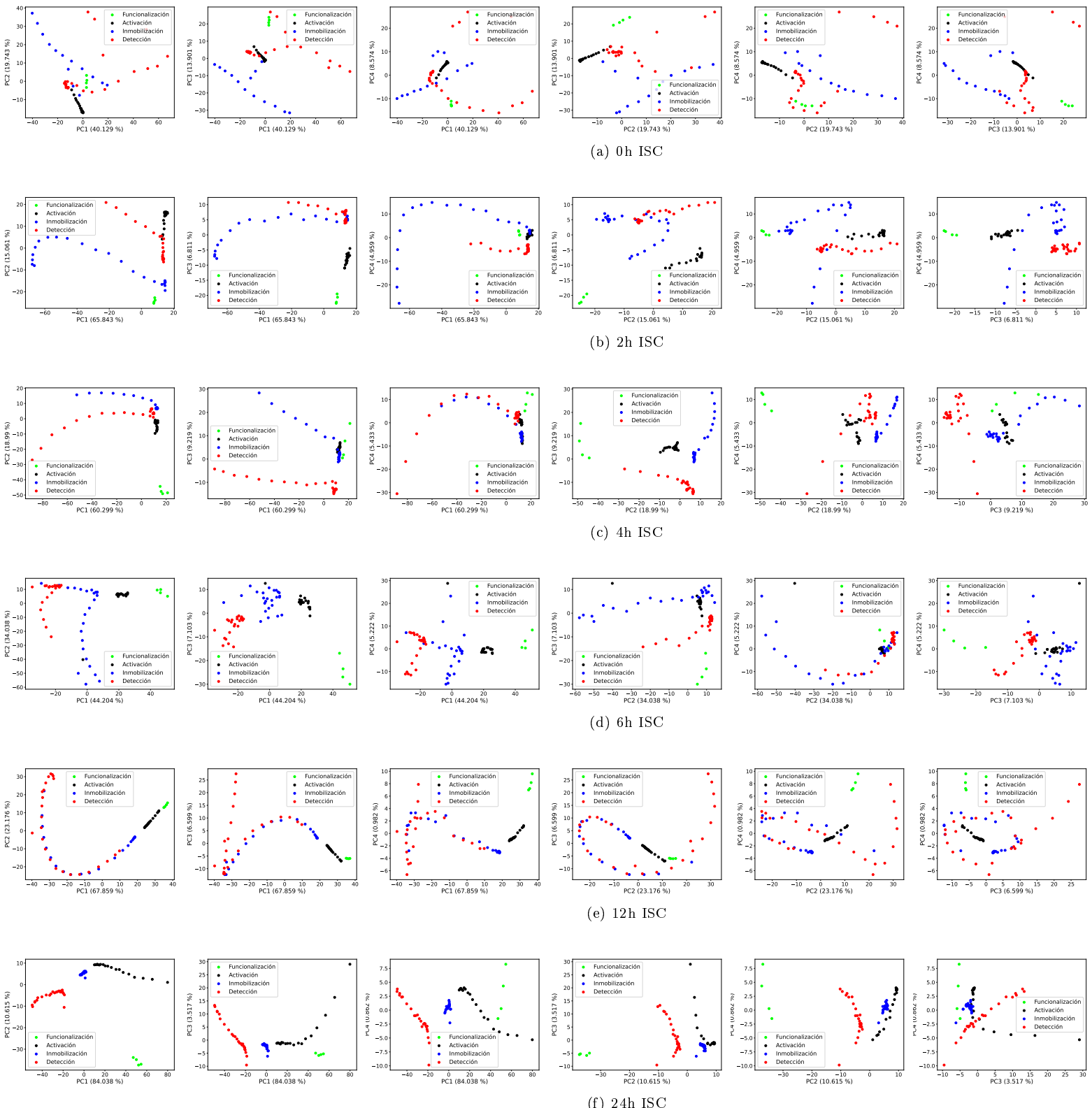


Figura 6.5: PCA de los espectros de salida en cada etapa del ensamblado de los Bio-MZI IL6.

# Resultados: Biosensores en MZI

## 6.1 Transmisión

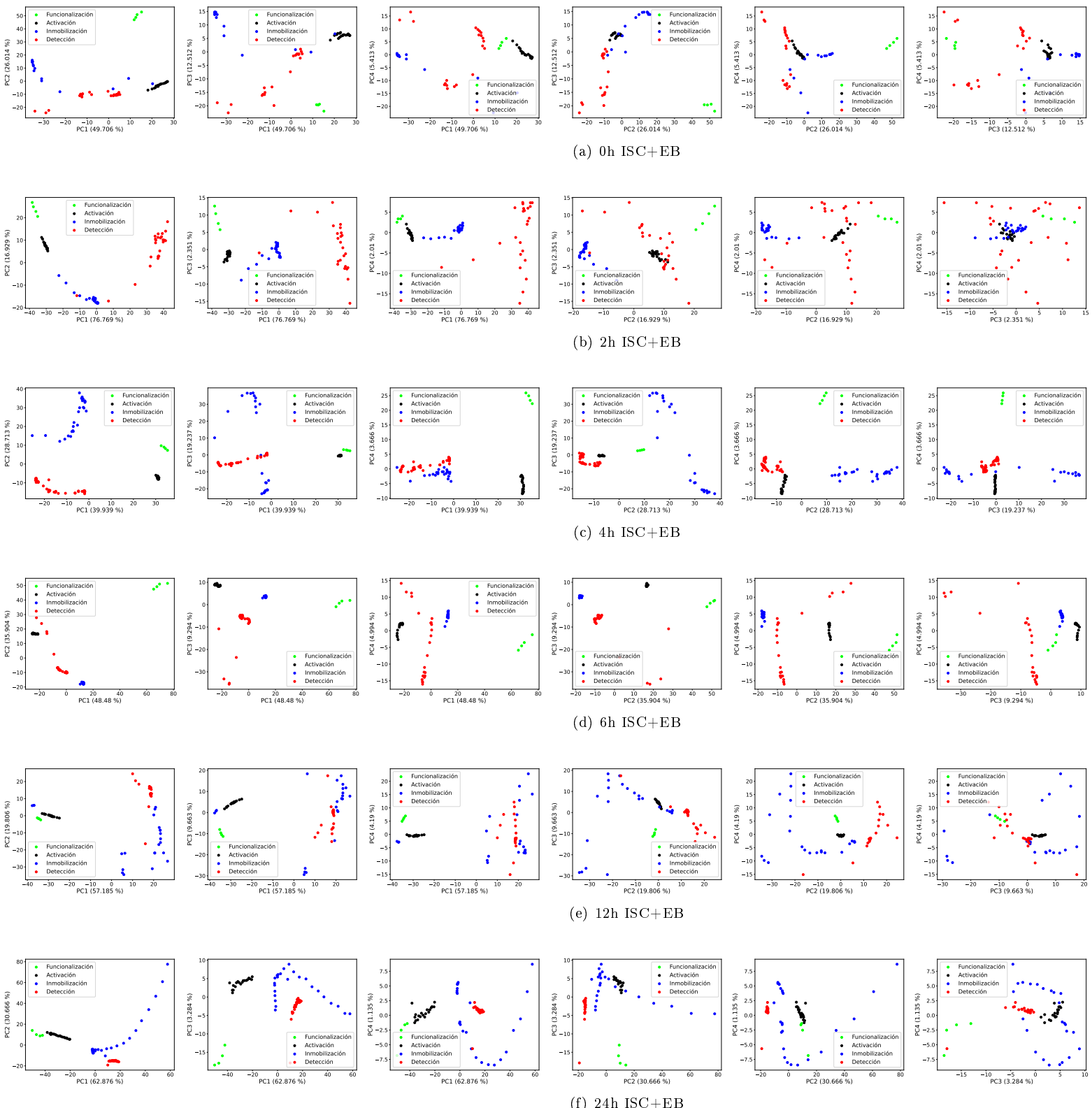


Figura 6.6: PCA de los espectros de salida en cada etapa del ensamble de los Bio-MZI IL10.

Con el objetivo de clasificar los diferentes tiempos post-isquemia en muestras de suero sanguíneo sanguíneo ISC e ISC+EB, se aplicó un clasificador SVM sobre los datos obtenidos mediante PCA de los Bio-MZI que detectaron IL-6 e IL-10. Para cada caso, se asignó una clase distinta a cada tiempo de inducción, considerando los tiempos de 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas, así como el control positivo (IL-6 STD para ISC e IL-10 STD para ISC+EB).

Primero, se evaluó el tipo de kernel más adecuado para lograr una clasificación eficiente. Para ello, se analizaron las métricas de desempeño utilizando diferentes cantidades de componentes principales, comenzando con las dos primeras e incrementando progresivamente hasta diez.

Para las muestras con ISC (detección de IL-6), el kernel lineal alcanzó un valor de F1-Score de 1.0 al utilizar las primeras cinco componentes (Fig. 6.7a). En contraste, con el kernel gaussiano fue necesario emplear al menos seis componentes para lograr una clasificación completa, lo que podría indicar un riesgo de sobreajuste (Fig. 6.7b).

Y para las muestras ISC+EB (detección de IL-10), el kernel lineal también logró una clasificación eficiente (F1-Score = 1) al utilizar seis componentes principales (Fig. 6.8a). En cambio, con el kernel gaussiano se requirieron al menos ocho componentes para alcanzar un rendimiento equivalente, lo que sugiere una mayor complejidad del modelo y un mayor riesgo de sobreajuste (Fig. 6.8b).

Con el fin de facilitar la visualización de los resultados, en las Fig. 6.7(c) y Fig. 6.8(c) se muestran las clasificaciones obtenidas mediante SVM lineal utilizando únicamente las dos primeras componentes principales, tanto para IL-6 como para IL-10. Estas gráficas permiten observar la separación entre las clases correspondientes a los distintos tiempos post-isquemia. Finalmente, las Fig. 6.7(d) y Fig. 6.8(d) presentan las matrices de confusión generadas a partir del modelo lineal (utilizando cinco componentes para IL-6 y seis para IL-10), confirmando que el clasificador logra diferenciar correctamente entre todas las muestras analizadas.

Luego, con el objetivo de determinar si el biosensor es capaz de detectar la presencia o ausencia de IL-6 o IL-10 en los diferentes sueros sanguíneos, se aplicó nuevamente el clasificador SVM sobre los datos procesados mediante PCA. En este caso, se incluyeron tres tipos de muestras: control sano, control positivo (IL-6 STD o IL-10 STD, según correspondiera) y control negativo (OPN5). Para estas solo fueron analizadas las mediciones después de la primera hora, es decir a partir de la medición a 60 min hasta 120 min.

Primero, se realizó PCA, y posteriormente se entrenó el clasificador SVM utilizando únicamente las muestras de control positivo y control negativo. Empleando un kernel lineal y las primeras tres componentes principales, fue posible lograr una separación eficiente entre ambos controles, como se muestra en la matriz de confusión de la Fig. 6.9(c), el SVM clasificó correctamente las 13 mediciones del control positivo y las 13 mediciones del control negativo.

En el caso de la detección de IL-6, se observó que las muestras de 12h ISC y control sano, se agrupan junto al control negativo, lo que puede indicar que en estos sueros sanguíneos la expresión de IL-6 podría ser muy baja o incluso nula.

Por otro lado, para la detección de IL-10, se observó un comportamiento similar: las muestras de 12h ISC+EB, 24h ISC+EB, y algunas mediciones de 4h ISC+EB, también se ubicaron en la región correspondiente al control negativo. Lo que también sugiere que en esos sueros sanguíneos la expresión de IL-10 podría ser igualmente poca o nula.

Finalmente, con el objetivo de identificar en qué muestras de sueros sanguíneos con ISC y ISC+EB se

presenta la mayor expresión de IL-6 e IL-10, respectivamente, se utilizaron los mismos datos del análisis anterior y se aplicó un clasificador SVM con kernel gaussiano. A cada muestra de suero sanguíneo y a cada control se le asignó una clase con base en la cantidad esperada de proteína detectada.

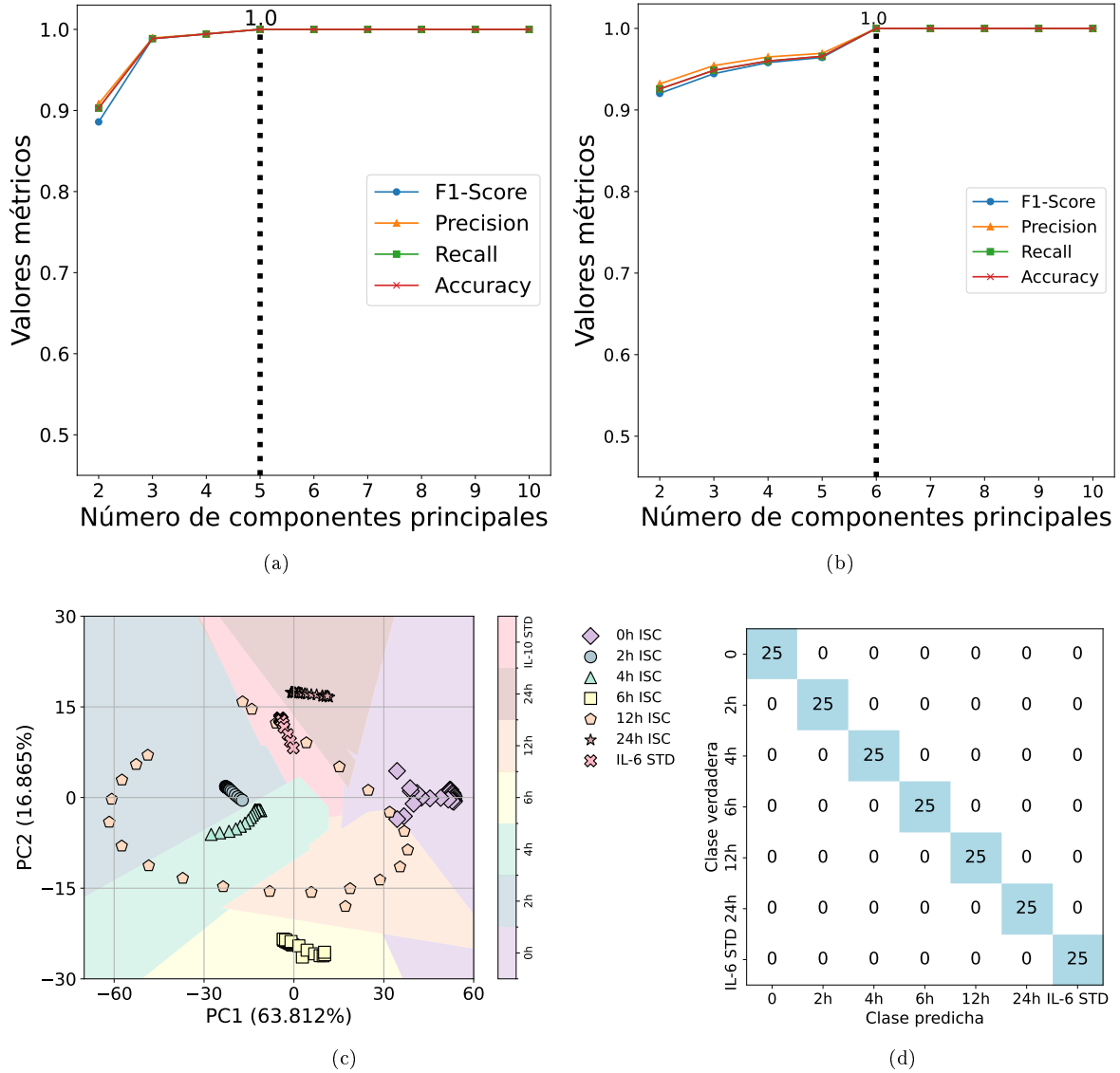


Figura 6.7: Clasificación de los biosensores Bio-MZI que detectaron IL-6 en suero sanguíneo ISC mediante SVM aplicado sobre datos de PCA, utilizando kernel lineal y gaussiano.

Para el caso del biosensor Bio-MZI funcionalizado para detectar IL-6, se asignó la clase control positivo a las muestras de 2h ISC y al control positivo (IL-6 STD), y la clase control negativo al resto de los sueros sanguíneos. Esta propuesta se basa en resultados previamente reportados en la literatura [46], donde se ha encontrado que en el suero sanguíneo con ISC, la mayor expresión proteica ocurre a las 2h ISC.

De manera análoga, para el biosensor Bio-MZI que detecta IL-10, se asignó la clase control po-

sitivo a las muestras de 6h ISC+EB, IL-10 STD y al control sano, y la clase control negativa al resto. Esta decisión también se fundamenta en los mismos resultados, donde se reporta que la mayor expresión de IL-10 ocurre a las 6h ISC+EB. Además, se observó que el control sano presentó una señal similar a la del control positivo, lo cual sugiere que en ausencia de daño isquémico el organismo mantiene niveles basales elevados de IL-10. Por este motivo, se consideró adecuado clasificar al control sano como clase control positivo.

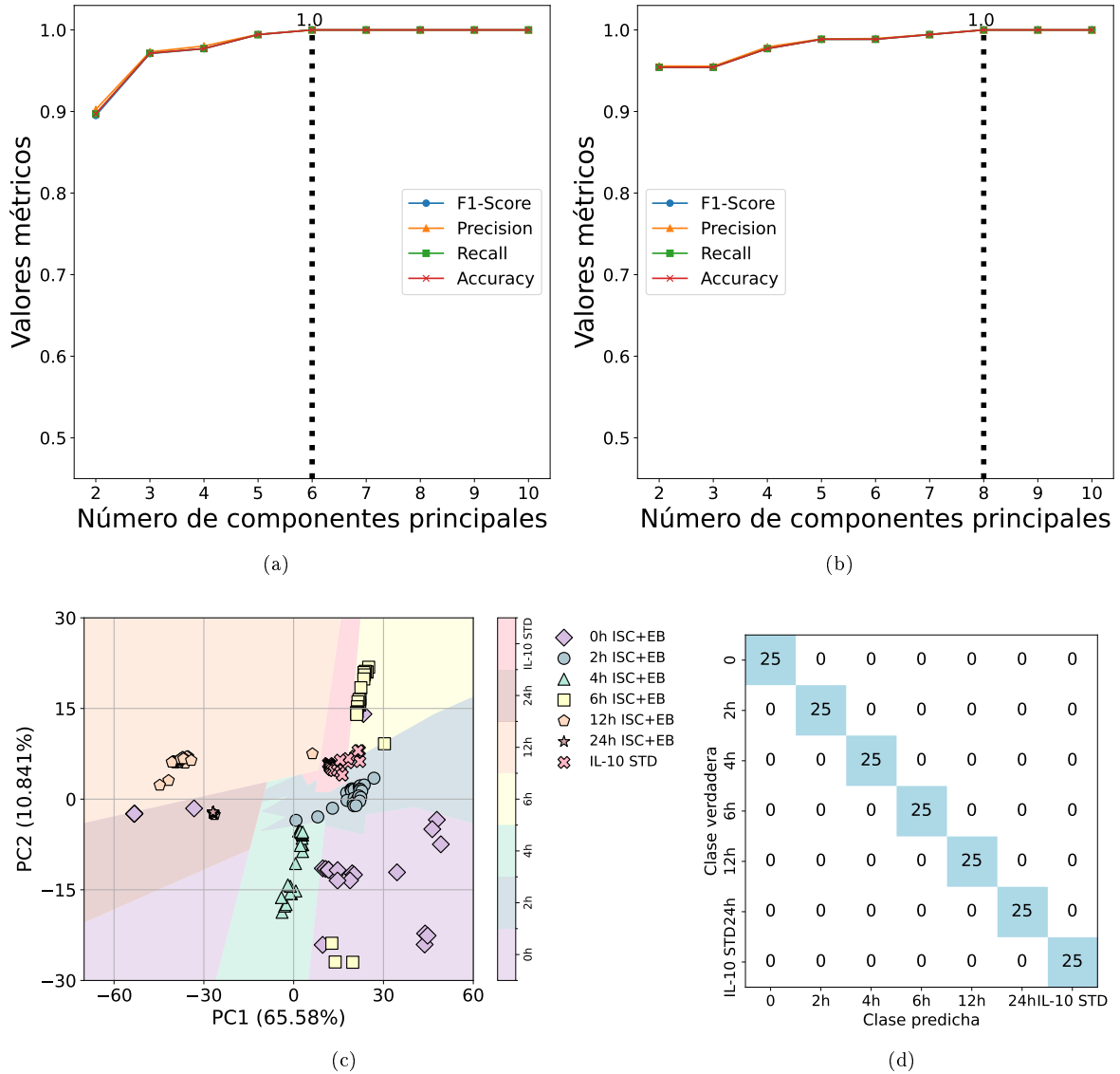


Figura 6.8: Clasificación de los biosensores Bio-MZI que detectaron IL-10 en suero sanguíneo ISC+EB mediante SVM aplicado sobre datos de PCA, utilizando kernel lineal y gaussiano.

Para alcanzar un valor de F1-Score igual a 1.0 en el caso del Bio-MZI que detecta IL-6, fue suficiente utilizar únicamente tres componentes principales (Fig. 6.10a). Por otro lado, para el Bio-MZI que detecta IL-10, se observa que es necesario emplear hasta siete componentes para alcanzar un desempeño óptimo (Fig. 6.10b). Sin embargo, al utilizar solo tres componentes se obtuvo un valor de F1-Score de 0.98, el

cual también se considera un resultado excelente.

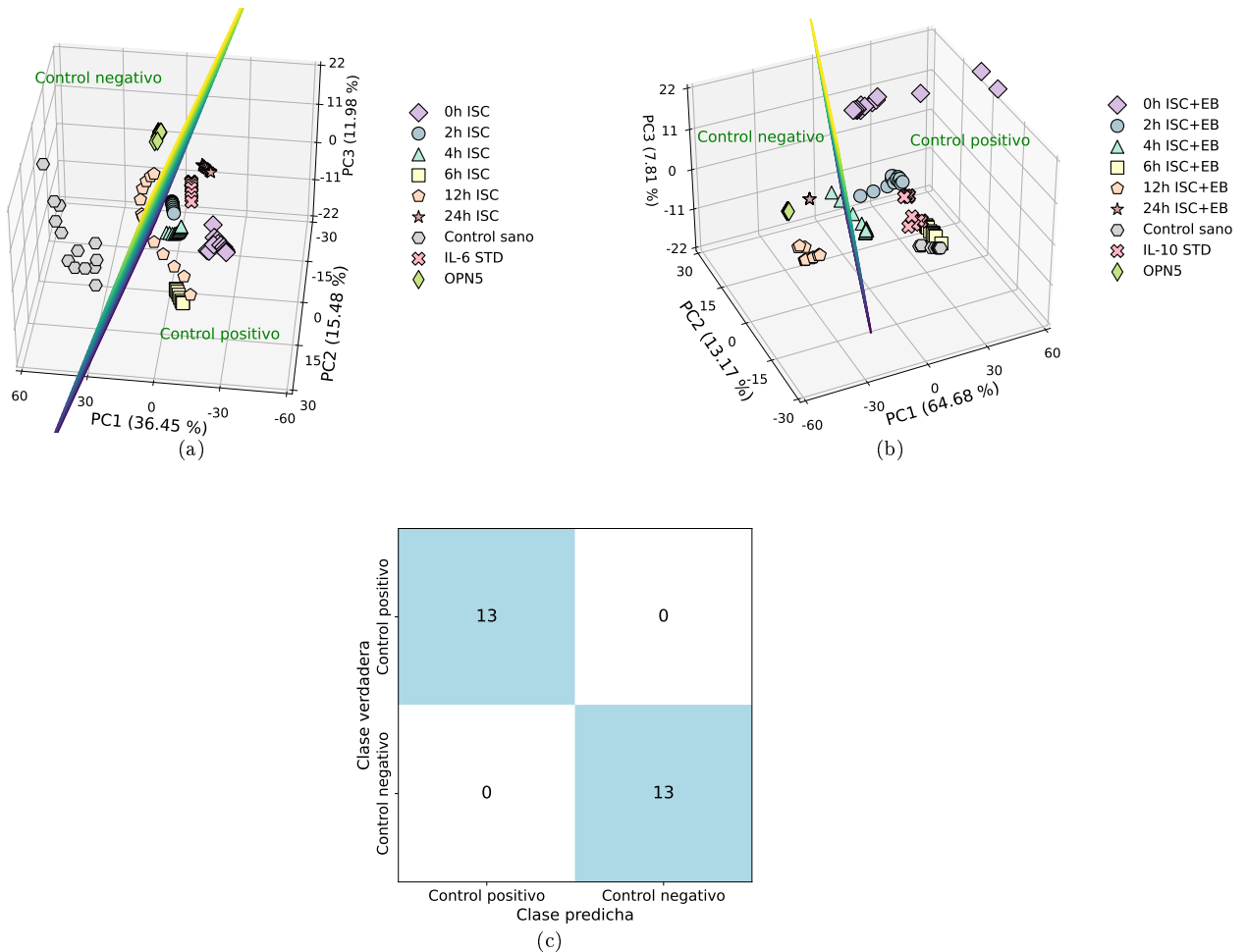


Figura 6.9: SVM utilizando PCA de los Bio-MZI con un kernel lineal para clasificar el Bio-MZI detecta o no las proteínas IL6 y IL-10.

Las Fig. 6.10(c) y (d) muestran las matrices de confusión usando un kernel lineal empleando tres componentes principales para ambos casos. Estas matrices confirman la efectividad del modelo para identificar correctamente las clases positivas y negativas definidas. Donde para el caso del Bio-MZI que detecta IL-10, solo tuvo un error al clasificar una medición de control negativo como positivo.

Además, en la Fig. 6.10(e) se muestra SVM para la detección de IL-6, donde las muestras de 2h ISC y el control positivo (IL-6 STD) se encuentran dentro del elipsoide delimitado por la frontera de decisión. De forma similar, en la Fig. 6.10(f), se muestra SVM para la detección de IL-10, se observa que las muestras de 6h ISC+EB, el control sano y el control positivo (IL-10 STD) se ubican dentro del elipsoide. Esto indica que dichas muestras presentan la mayor expresión de IL-10, y además, resalta que el control sano presenta niveles elevados de IL-10. Por lo tanto, las muestras contenidas dentro del elipsoide representan aquellas con mayor concentración de IL-6 e IL-10, respectivamente.

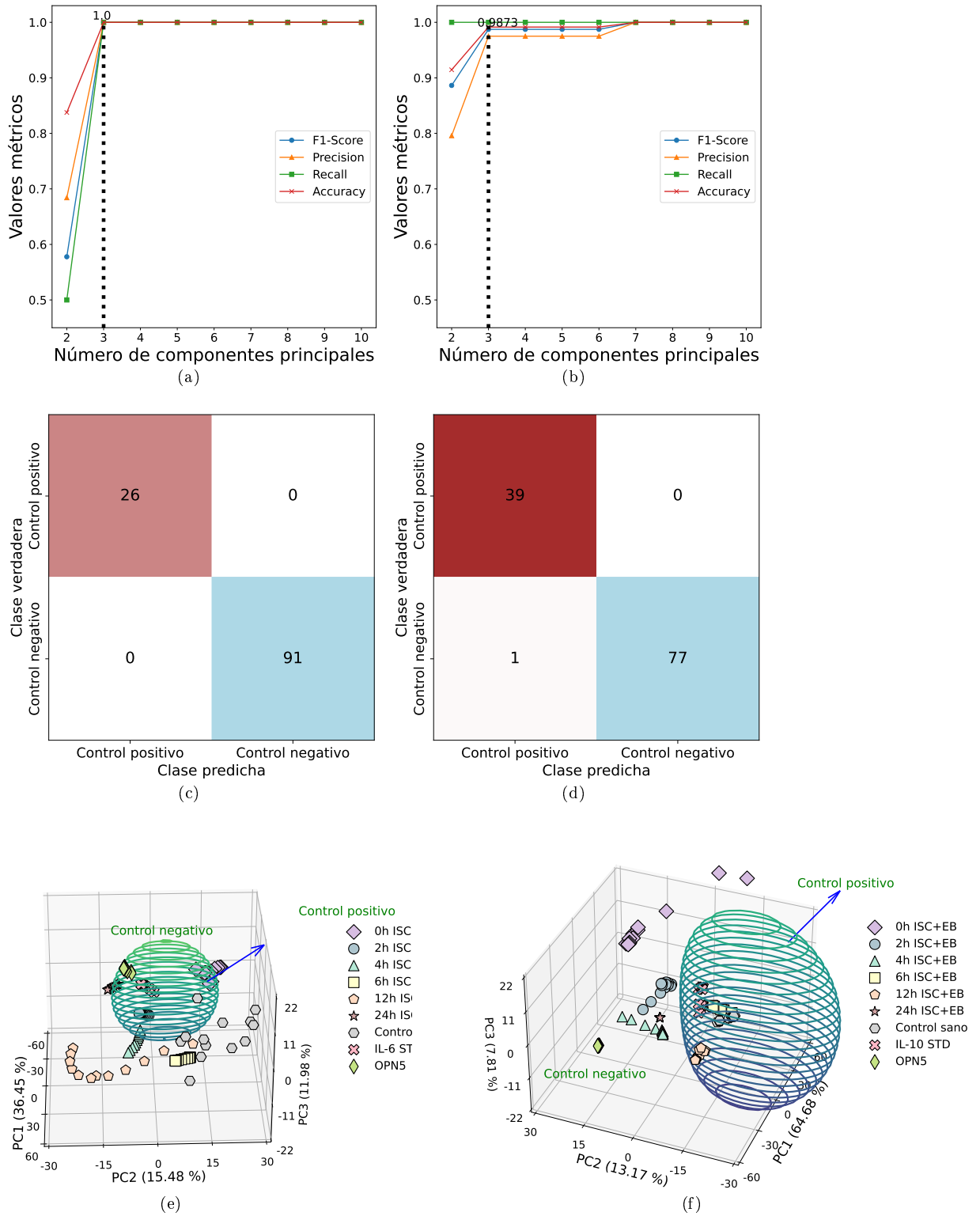
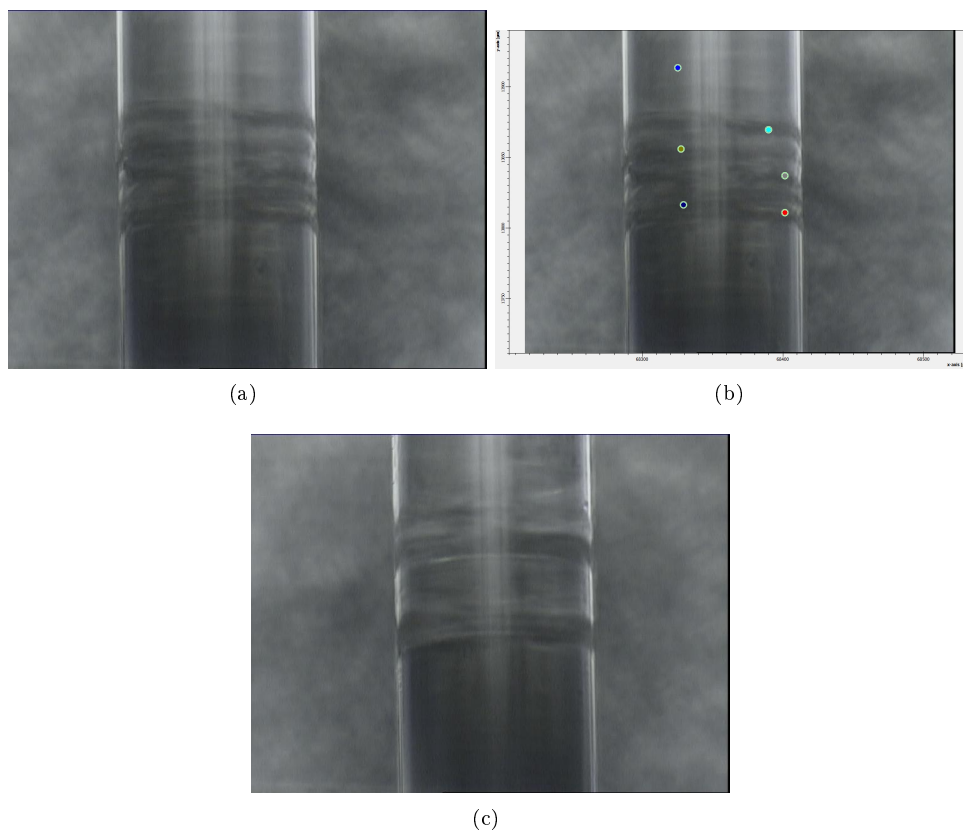


Figura 6.10: SVM utilizando PCA de los Bio-MZI con un kernel gaussiano para clasificar el suero sanguíneo con mayor cantidad de IL6 y IL-10.

## 6.2. Espectroscopía de infrarrojo en modo micro

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo (IR) de todos los biosensores Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10, con el objetivo de confirmar la presencia de las proteínas IL6 e IL10 en Bio-IL6 y Bio-IL10, respectivamente. Para ello, se seleccionó una región específica de la superficie de la fibra óptica (OF) donde se desarrolló el biosensor, utilizando el microscopio Hyperyon 2000 con un objetivo de 20X, como se muestra en la Fig. 6.11(a).

Posteriormente, se eligieron seis puntos sobre la superficie de la fibra (ver Fig. 6.11(b)), en los cuales se midieron los espectros de IR. Este procedimiento se repitió tres veces, en tres diferentes zonas a lo largo de la superficie modificada para el autoensamblaje del dispositivo biosensor en la fibra: la región inicial, media y final. Las Fig. 6.11(a) y 6.11(c) muestran puntos de RPL en Bio-MZI, evidenciando cambios en la estructura de la fibra óptica.



*Figura 6.11: Micrografías ópticas de la superficie de los biosensores Bio-MZI.*

Los espectros obtenidos de los Bio-MZI que detectaron en muestra IL6 STD y IL10 STD se muestran en las Fig. 6.12(a) y 6.12(c). Estos espectros muestran la región de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , la cual contiene múltiples bandas asociadas a vibraciones características de distintos grupos funcionales. Por lo tanto la presencia o ausencia, así como los cambios en intensidad y posición de las bandas, permiten identificar diferencias estructurales entre las interleucinas IL6 e IL10.

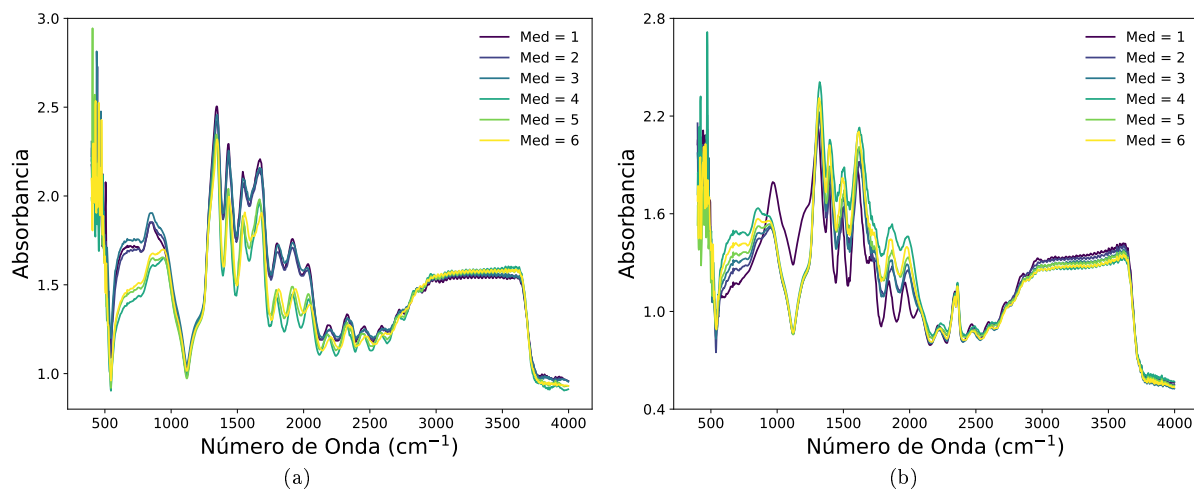


Figura 6.12: (a) Espectros de IR de los biosensores Bio-MZI, interactuando en muestra: (a) IL6 STD y (b) IL10 STD.

Por lo tanto, se analizarán únicamente las regiones espectrales donde se evidencia la presencia de las proteínas. En las Fig. 6.13(a) y (b), se observa una banda asociada a los grupos funcionales C–O en la región entre 950 y 1250  $\text{cm}^{-1}$ . Donde se observó que tanto en el Bio-MZI IL6 como en el Bio-MZI IL10 se presenta un valle espectral en torno a los 1125  $\text{cm}^{-1}$ .

Luego, en las Fig. 6.13(c) y (d), se identifican bandas relacionadas con grupos funcionales que involucran enlaces N–H, correspondientes a amidas. En particular, se aprecian bandas en el intervalo de 1500–1600  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a amidas secundarias (NH–R), y en el rango de 1600–1750  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a amidas primarias (NH<sub>2</sub>). En el caso del Bio-MZI IL10, estas bandas presentan una mayor amplitud, lo que podría indicar una interacción más intensa o una mayor cantidad de proteína inmovilizada.

Finalmente, en las Fig. 6.13(e) y (f), se observan bandas adicionales de menor amplitud, correspondientes a grupos funcionales C–H, con una disminución notable en la región de 2800 a 2900  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro del Bio-MZI IL10, lo cual también sugiere diferencias en la composición o conformación superficial del biosensor.

A partir de las seis mediciones realizadas en la zona media del biosensor, se calculó un espectro promedio con el fin de reducir el ruido y representar de forma robusta la señal característica de cada muestra. Estos espectros promedio fueron utilizados para construir gráficas comparativas entre los biosensores Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10.

En el caso del Bio-MZI IL6, los biosensores fueron utilizados para detectar proteínas en suero sanguíneo de modelo murino con isquemia cerebral inducida (ISC) en diferentes tiempos post-inducción: 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h y 24 h. Por otro lado, el Bio-MZI IL10 fue empleado para la detección en suero sanguíneo de animales tratados con EB y posteriormente sometidos a isquemia cerebral (ISC+EB), en los mismos tiempos post-inducción.

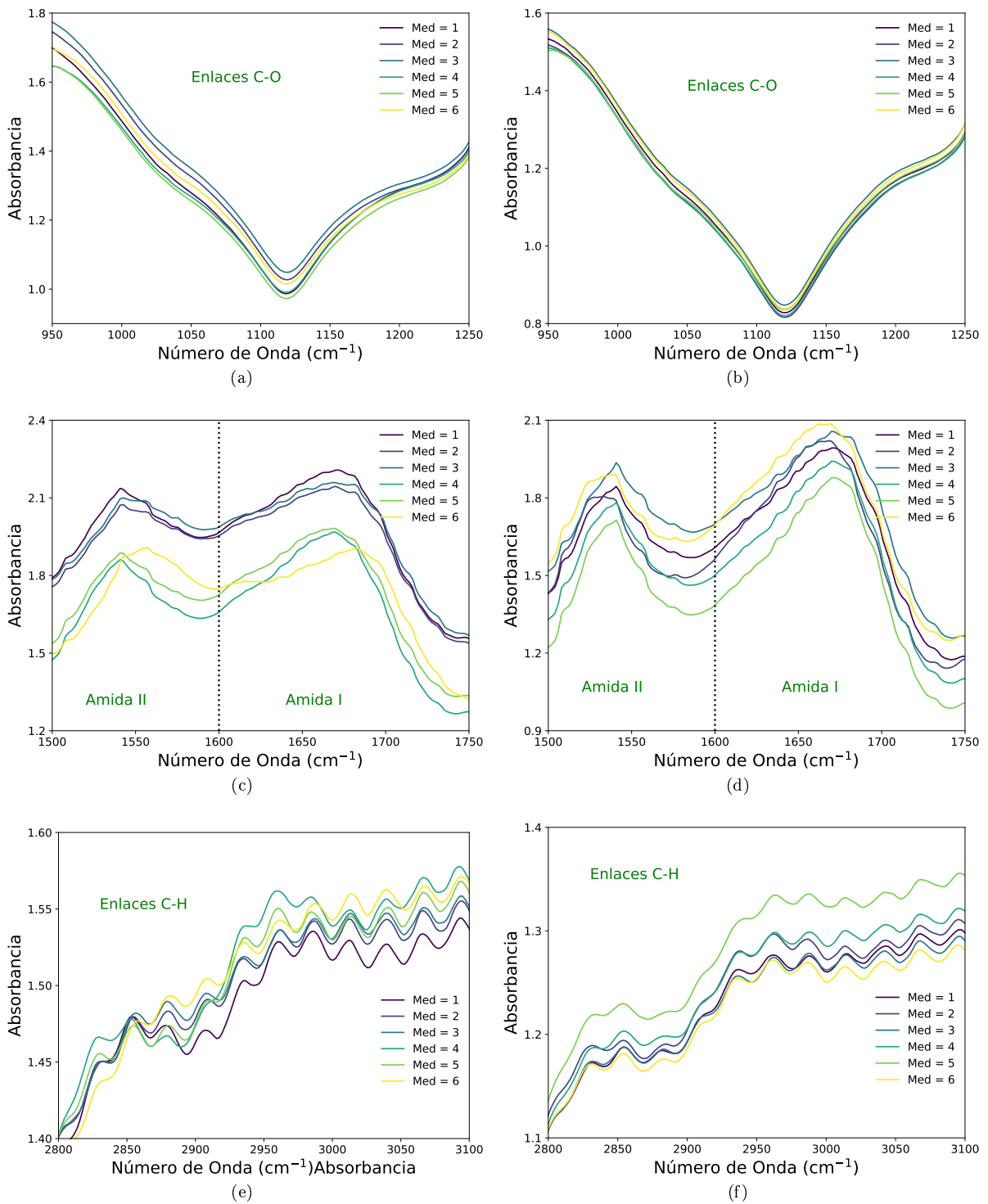


Figura 6.13: (a) Espectro de IR del biosensor, donde se analizaron 3 regiones: (b) 950 a 1250 cm<sup>-1</sup>, (c) 1500 a 1750 cm<sup>-1</sup> y (d) 2800 a 3100 cm<sup>-1</sup>.

En la región de 950 y 1250  $\text{cm}^{-1}$ , se observa que el valle tiene la menor amplitud a las 2h ISC (ver Fig. 6.14 a). Y en la región de 1500–1750  $\text{cm}^{-1}$  y 2800 a 2900  $\text{cm}^{-1}$  se observa que a 0h ISC se muestra la mayor amplitud (ver Fig. 6.14 c y e). Lo cual puede estar asociado a la mayor presencia de IL6. Luego en la región de 950 y 1250  $\text{cm}^{-1}$ , se observa que el valle tiene la menor amplitud a las 6h ISC+EB. Y en la región de 1500–1750  $\text{cm}^{-1}$  y 2800 a 2900  $\text{cm}^{-1}$  se observa que a 4h y 6h ISC+EB muestran la mayor amplitud (ver Fig. 6.14 d y f).

### 6.2.1. Clasificador SVM

Por otro lado, con el objetivo de corroborar que los biosensores Bio-MZI IL6 y Bio-MZI IL10 detectaron específicamente las proteínas IL6 e IL10, respectivamente, se aplicó un clasificador de Máquinas de Vectores de Soporte (SVM) utilizando los espectros de IR. Para el caso del Bio-MZI IL6, se emplearon los espectros correspondientes a las mediciones con el control positivo (IL6 STD) y el control negativo (OPN5). De manera análoga, para el Bio-MZI IL10 se utilizaron los espectros obtenidos con el control positivo (IL10 STD) y el mismo control negativo (OPN5). Esta clasificación permitió evaluar la capacidad de cada biosensor de detectar específicamente su analito (IL6 o IL10).

La Fig. 6.15 presenta los resultados de clasificación mediante SVM para el Bio-MZI IL6. Donde en las Fig. 6.15(a), (c) y (d) se observa que, en las regiones espectrales de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ , 1500–1750  $\text{cm}^{-1}$  y 2800–3100  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, la clasificación entre el control positivo y el control negativo fue exitosa utilizando las dos primeras componentes principales y un kernel lineal en el modelo SVM. En contraste, para la región de 950–1250  $\text{cm}^{-1}$ , fue necesario emplear un kernel gaussiano para lograr una discriminación óptima entre las clases, como se muestra en la Fig. 6.15(b). Finalmente, la Fig. 6.15(e) presenta la matriz de confusión correspondiente a las clasificaciones mostradas en las Fig. 6.15(a–d), donde se obtuvo un valor de F1-Score de 1, indicando una clasificación efectiva.

La Fig. 6.16 muestra los resultados de clasificación mediante SVM para el Bio-MZI IL10. En las Fig. 6.16(a), y (c), correspondientes a las regiones espectrales de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  y 1500–1750  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, se logró una clasificación efectiva entre el control positivo y el control negativo utilizando un kernel lineal y las dos primeras componentes principales. En contraste, para la región de 950–1250  $\text{cm}^{-1}$ , también se utilizó un kernel lineal, pero fue necesario utilizar las tres primeras componentes principales para obtener una discriminación óptima entre las clases, como se observa en la Fig. 6.16(b). De forma similar, en la región de 2800–3100  $\text{cm}^{-1}$  se logró una correcta clasificación entre control positivo y negativo con un kernel lineal; sin embargo, fue necesario utilizar cuatro componentes principales. Al usar únicamente dos o tres componentes, se cometió un error de clasificación, asignando una medición de control positivo como control negativo, lo que resultó en un valor de F1-Score de 0.8. Finalmente, la Fig. 6.16(e) presenta la matriz de confusión correspondiente a las clasificaciones mostradas en las Fig. 6.16(a–d), en la cual se obtuvo un F1-Score de 1, lo que indica un desempeño de clasificación óptimo.

También es posible observar en las Fig. 6.16(a), (c) y (d) que algunas mediciones correspondientes a las muestras de suero sanguíneo de 0 h y 2 h ISC+EB se agrupan en la región asociada al control negativo. Este comportamiento podría deberse a una baja concentración de IL-10 en esas etapas tempranas. Es importante destacar que, en este tipo de análisis, obtener información cuantitativa precisa sobre los niveles de IL6 o IL10 presentes en las muestras de suero sanguíneo resulta complejo; la técnica utilizada permite únicamente identificar la presencia o ausencia de la proteína inmovilizada en la superficie.

Resultados: Biosensores en MZI  
6.2 Espectroscopía de infrarrojo en modo micro

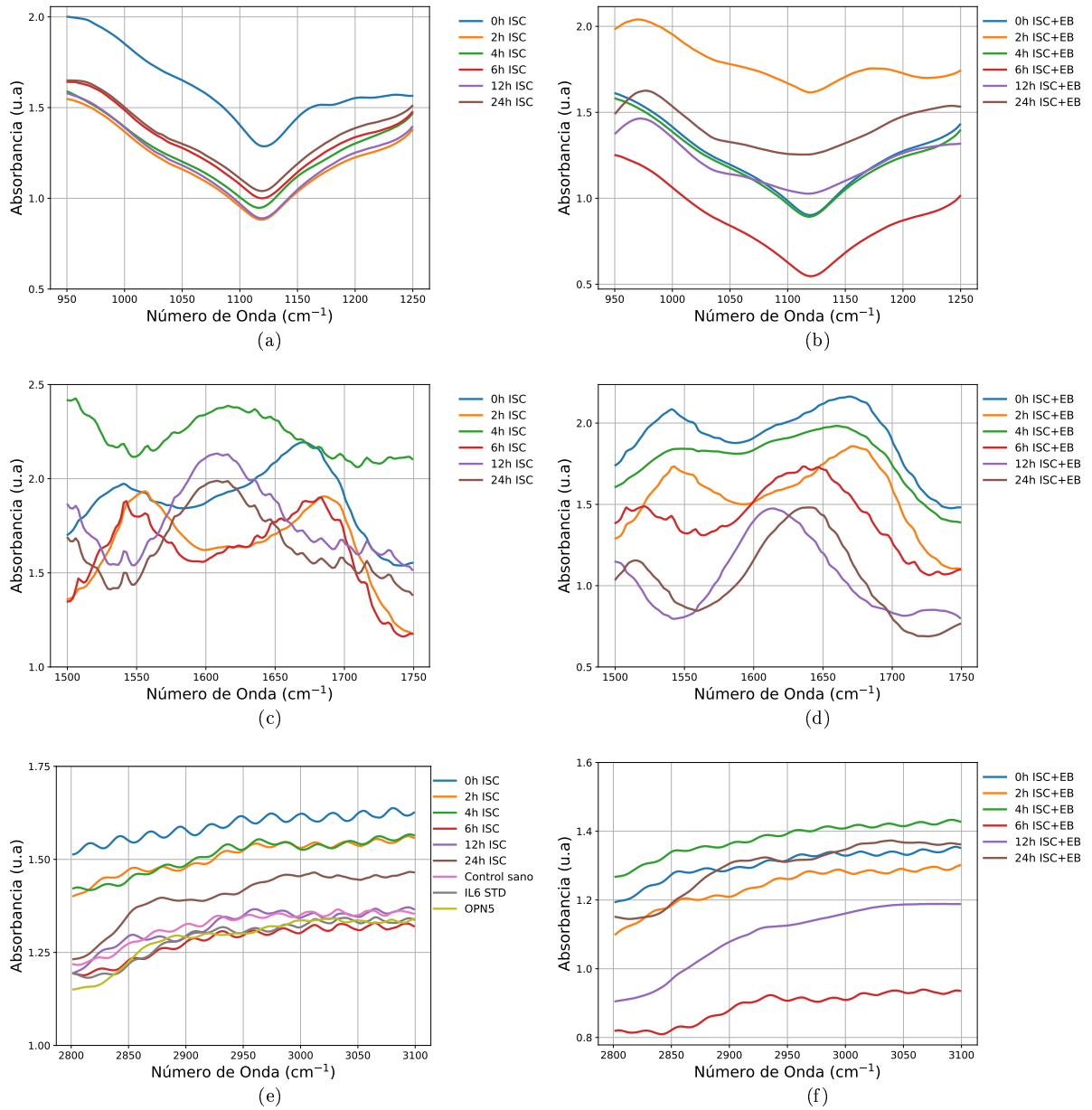


Figura 6.14: (a) Espectro de IR del biosensor, donde se analizaron 3 regiones: (b) 950 a 1250 cm<sup>-1</sup>, (c) 1500 a 1750 cm<sup>-1</sup> y (d) 2800 a 3100 cm<sup>-1</sup>.

Resultados: Biosensores en MZI  
6.2 Espectroscopía de infrarrojo en modo micro

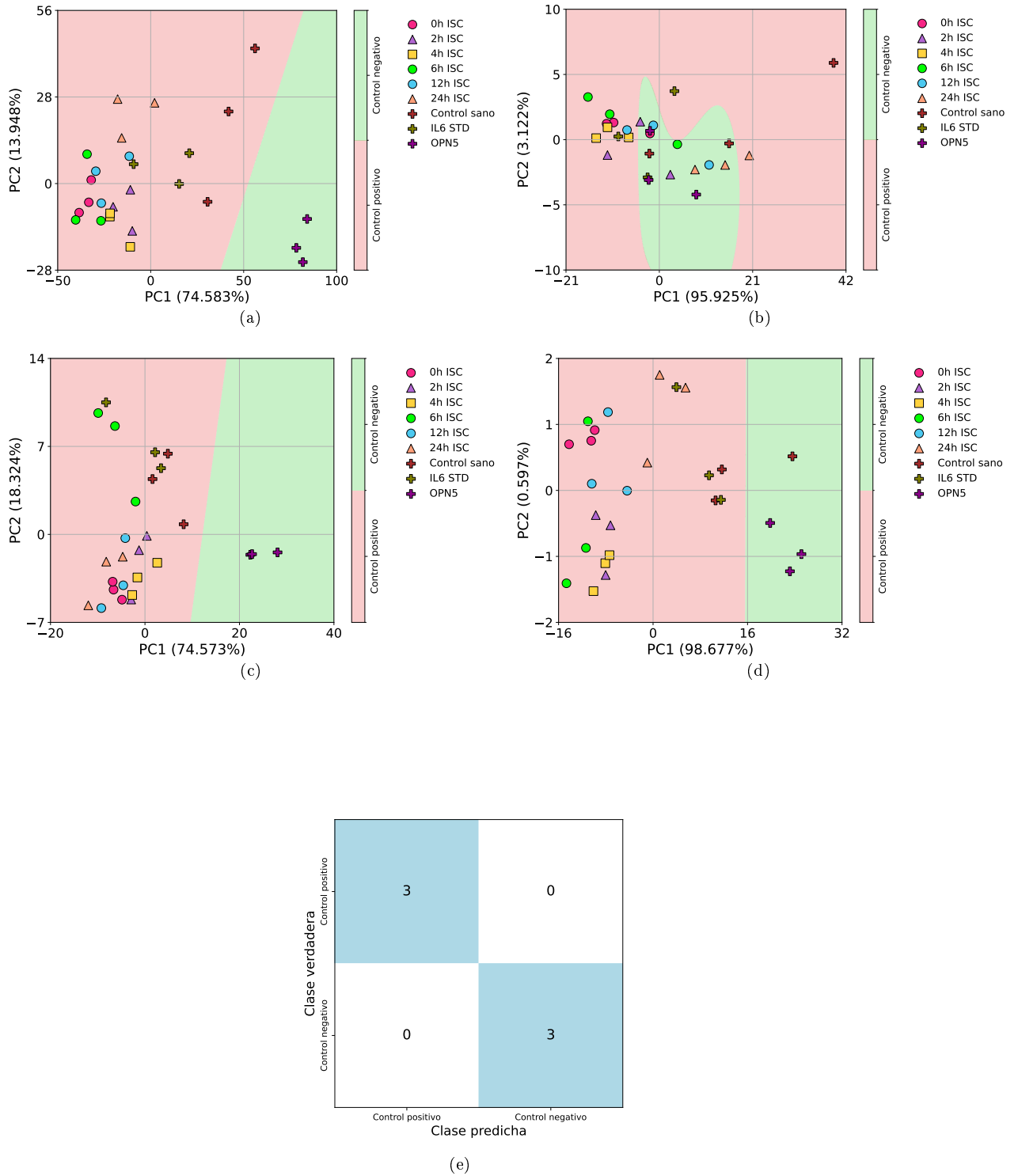


Figura 6.15: SVM utilizando PCA de los espectros de IR de los Bio-MZI IL6 para clasificar los controles positivos y negativos en las regiones: (a) 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , (b) 950 a 1250  $\text{cm}^{-1}$ , (c) 1500 a 1750  $\text{cm}^{-1}$  y (d) 2800 3100  $\text{cm}^{-1}$ .

Resultados: Biosensores en MZI  
6.2 Espectroscopía de infrarrojo en modo micro

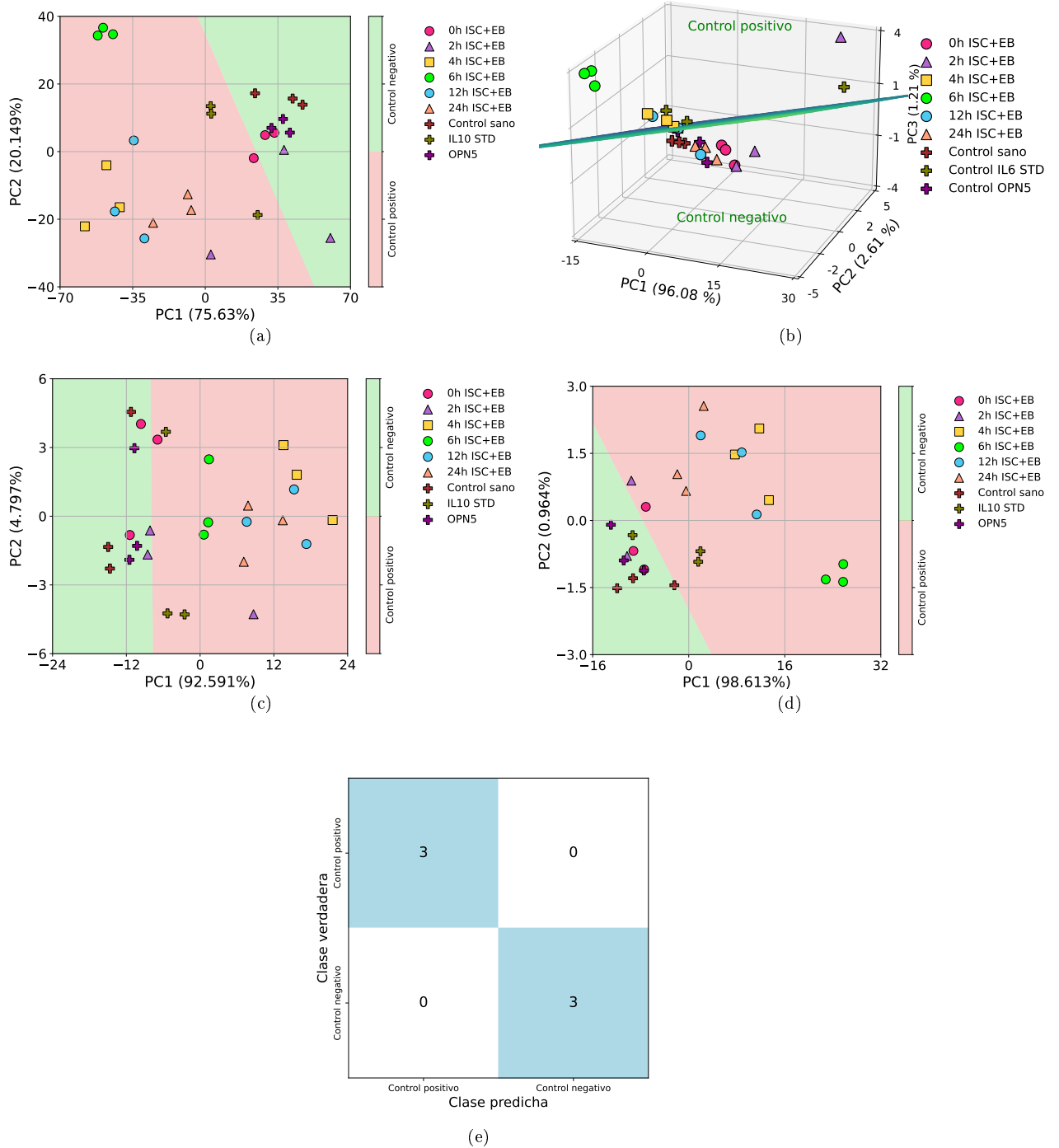


Figura 6.16: SVM utilizando PCA de los espectros de IR de los Bio-MZI IL10 para clasificar los controles positivos y negativos en las regiones: (a) 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , (b) 950 a 1250  $\text{cm}^{-1}$ , (c) 1500 a 1750  $\text{cm}^{-1}$  y (d) 2800 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.3. Conclusiones Parciales

Se desarrollaron biosensores basados en MZI utilizando los anticuerpos Anti-IL-6 y Anti-IL-10 como elemento de reconocimiento biológico para la detección de proteínas proinflamatoria IL-6 y antiinflamatoria IL-10 en suero sanguíneo de un modelo murino.

El MZI incrementa la resolución y la sensibilidad del sistema debido al factor  $L$  descrito en la Ec. 2.19, lo cual permite detectar cambios en el índice de refracción para determinar la proteínas IL6 e IL-10 en el suero sanguíneo de un modelo murino.

Los espectros de transmisión del Bio-MZI mostraron mayores variaciones en amplitud y desplazamiento en el rango de longitud de onda, en las etapas de ensamblado y durante la detección de IL-6 e IL-10.

El análisis combinado de PCA y SVM permitió clasificar con alta precisión las muestras de suero sanguíneo según el tiempo post IC y la presencia de IL-6 e IL-10. También identificó de manera efectiva las muestras con mayor expresión de estas proteínas en suero sanguíneo con ISC y ISC+EB.

Finalmente, los espectros de infrarrojo (IR) permitieron caracterizar la estructura superficial de los biosensores Bio-MZI. El análisis de bandas características asociadas a grupos funcionales confirmó la presencia de IL-6 e IL-10. La aplicación de SVM sobre estos espectros validó la especificidad de detección de cada biosensor, obteniendo valores de F1-Score de hasta 1 en la mayoría de las regiones espectrales, lo cual demuestra un desempeño confiable para clasificar si el biosensor detectó o no las proteínas IL-6 e IL-10.

## Capítulo 7

# Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

Las Fig. 7.1 (a), (c) y (e) muestran los espectros de transmisión normalizados para cada etapa del proceso de autoensamblaje y las Fig. 7.1 (b), (d) y (f) muestran el análisis de componentes principales (PCA) de los biosensores desarrollados, Bio-TOF, Bio-LPFG y Bio-MZI, respectivamente.

PCA tiene 2 características principales, la primera es la capacidad de reducir la dimensionalidad, es decir, es posible representar una señal multivariable en un nuevo espacio con un pequeño conjunto de variables que más contribuyen a la varianza del sistema lineal, en este caso, el espectro original tiene mil puntos de datos, y PCA permite proyectar un espectro como un único punto en un espacio de 2 componentes principales. La segunda característica es que el PCA puede mostrar patrones ocultos de los datos originales, como puede verse en el recuadro de la Fig. 7.1 (a), en este caso, mostramos la evolución de la etapa de inmovilización y la respuesta del biosensor a la IL-10 STD.

Es posible observar algunas variaciones espectrales (cambios de intensidad y ligeros desplazamientos de longitud de onda), si utilizamos la técnica tradicional de demodulación, la cual se basa en la medición del desplazamiento y/o atenuación del espectro en una longitud de onda específica, no es sencillo establecer un comportamiento particular entre ambas etapas debido a que existen espectros superpuestos, en su lugar podemos aprovechar la información completa del espectro utilizando un análisis multivariado como el PCA como se reportó en un trabajo previo [14].

La gráfica PCA de la Fig. 7.1 (b) (donde cada espectro se representa como un único punto en el espacio PCA 2D) muestra claramente que estas etapas son diferentes, y es posible observar una clara tendencia de la respuesta del biosensor a la proteína. Esta información puede utilizarse para establecer la presencia de la IL-10 STD.

Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

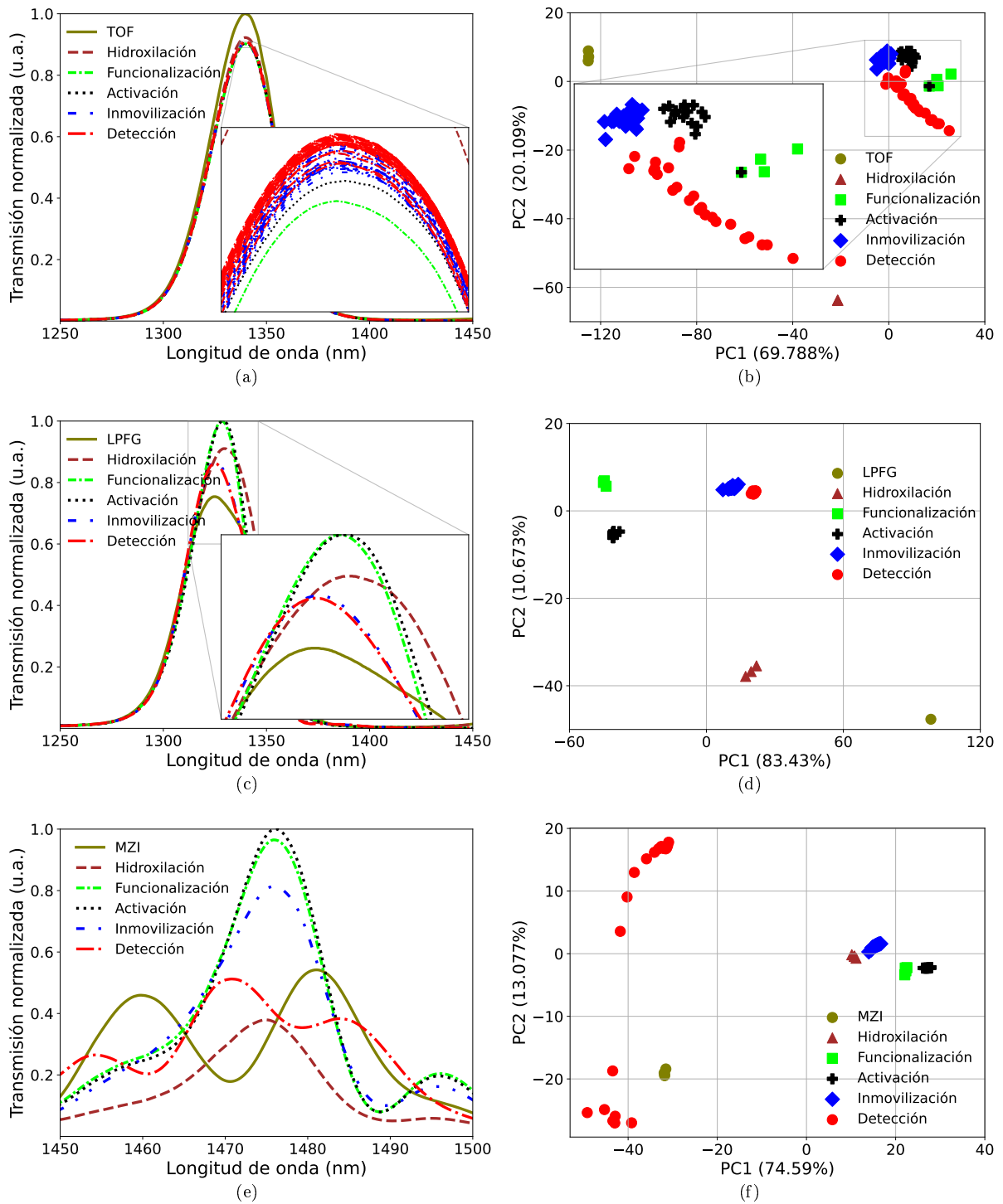


Figura 7.1: Espectro de salida en cada etapa del ensamblado de los biosensores desarrollados en (a) TOF, (c) LPFG, y (e) MZI. PCA del espectro de salida en cada etapa del ensamblado de los biosensores desarrollados en (b) TOF, (d) LPFG, y (f) MZI.

## Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

---

En el caso del Bio-TOF, los cambios en el espectro no son tan perceptibles a simple vista, por lo que realizamos un zoom en el pico del espectro, donde podemos observar ciertas atenuaciones relacionadas con los cambios del índice de refracción durante el proceso de ensamblaje (Fig. 7.1 (a)). En el gráfico PCA (Fig. 7.1(b)), podemos observar una aglomeración de los datos en la etapa de ensamblado, mientras que, durante la detección de IL-10 STD tenemos una respuesta significativa. Para el caso de Bio-LPFG, a partir del zoom en el pico del espectro, se observan aumentos y disminuciones de potencia, así como ciertos desplazamientos espectrales (Fig. 7.1 (c)), mientras que en PCA, se observa que cada etapa del ensamblado se sitúa en diferentes posiciones en los espacios PC1 y PC2, sin embargo, sólo se observan pequeñas variaciones en los datos de cada etapa. A diferencia de Bio-TOF, la etapa de detección está aglomerada (Fig. 7.1(d)).

Finalmente, para Bio-MZI, los cambios en el espectro en cada etapa son evidentes, se observan cambios en la potencia, desplazamientos e incluso formación de picos en el espectro (Fig. 7.1(e)), en este caso, el PCA se muestra en la Fig. 7.1(f) donde las etapas autoensambladas se separaron unas de otras y el rango de detección es mayor en comparación con Bio-TOF y Bio-LPFG.

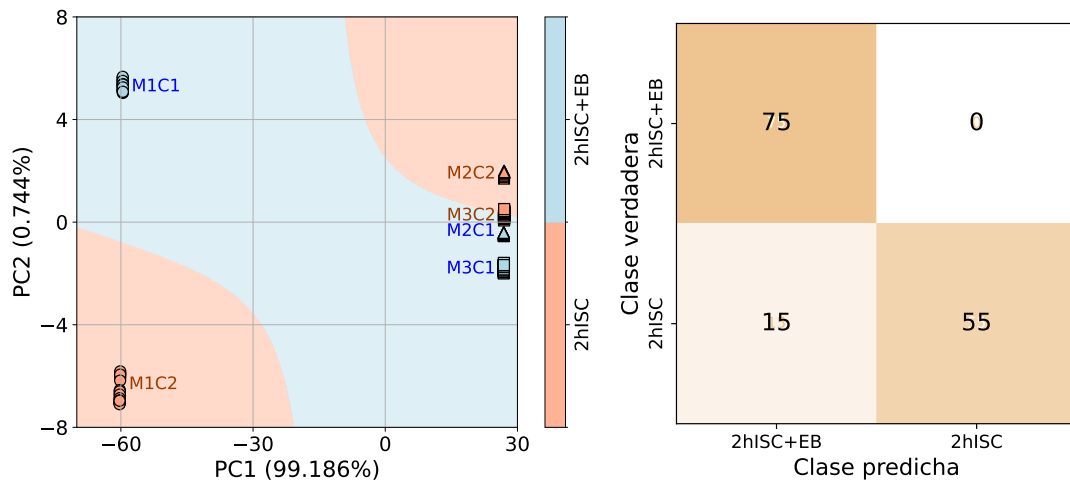
El uso de PCA para realizar análisis espectrales mostró que los cambios en el índice de refracción eran diferentes en cada etapa del autoensamblaje. También nos permitió observar cómo los tres tipos de biosensores detectaban la proteína IL-10. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos encontrados en la literatura [47], suelen utilizar sólo un punto del espectro para medir las variaciones de potencia o los desplazamientos de longitud de onda para determinar la respuesta del sensor, que es la técnica tradicional de demodulación, por lo tanto, es importante utilizar técnicas de aprendizaje automático como PCA y SVM para mejorar el rendimiento de los biosensores de fibra óptica, que es el propósito de este trabajo. El uso de un kernel lineal en SVM resultó especialmente adecuado, ya que los datos presentaban una estructura linealmente separable tras la reducción de dimensionalidad, lo que facilitó la identificación de patrones claros a través de un hiperplano lineal, optimizando así la separación entre clases de forma eficiente.

Debido a la naturaleza de los biosensores, son de un solo uso, por lo que para tener un mayor número de mediciones, cada muestra de clase (2hISC+EB, C1, 2hISC, C2) se midió con 3 biosensores (M1, M2 y M3) para cada configuración (Bio-TOF, Bio-LPFG y Bio-MZI). La Fig. 7.2(a-c) muestra las gráficas de PCA y SVM para la detección de IL-10 en suero sanguíneo con tratamiento con EB (2 h ISC+EB) y sin tratamiento (2 h ISC), junto con sus respectivas matrices de confusión para los tres tipos de biosensores.

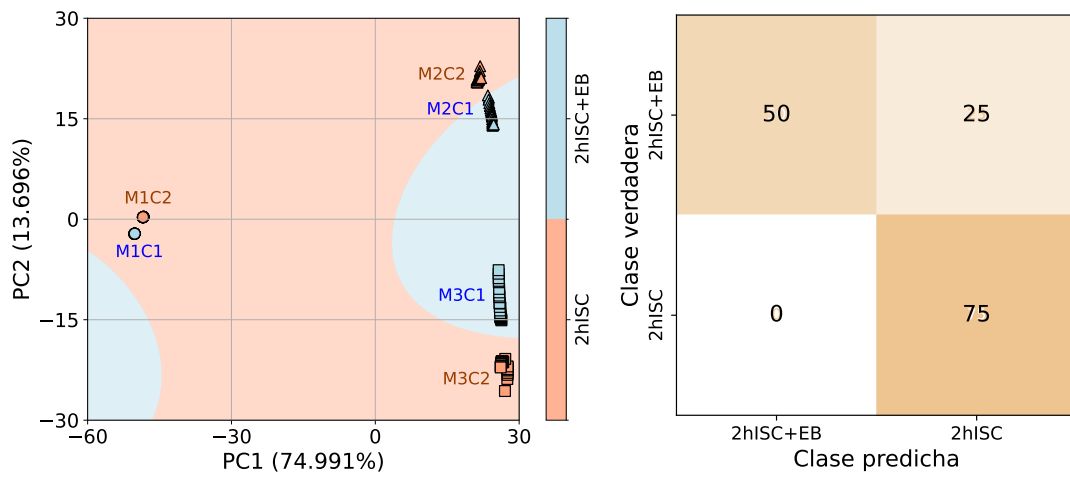
De estos resultados se puede observar que fue posible discriminar el suero sanguíneo con 2hISC+EB y 2hISC con un buen porcentaje de eficacia. Los valores F1-Score obtenidos a partir de la matriz de confusión son 0.895, 0.828 y 0.973 para cada biosensor (TOF, LPFG y MZI) respectivamente. Utilizando la frontera de decisión generada por el kernel gaussiano SVM, para el caso de Bio-TOF (Fig. 7.2a) podemos observar una buena discriminación entre ambas muestras, presentando una considerable proximidad entre los puntos de la medida M2C1 (2hISC+EB) y M3C2 (2hISC), con un ligero solapamiento, obteniéndose únicamente 15 errores de clasificación.

Para el Bio-LPFG (Fig. 7.2(b)), podemos observar que todas las medidas M1C1 (2hISC+EB) están mal clasificadas porque se encuentran en la región C2 (2hISC). Finalmente, para el Bio-MZI (Fig. 7.2(c)), se obtuvo la mejor clasificación entre muestras, sólo 4 clasificaciones erróneas se muestran en la matriz de confusión. Además, se observa una mayor dispersión entre las medidas que podría estar relacionada con la sensibilidad del Bio-MZI.

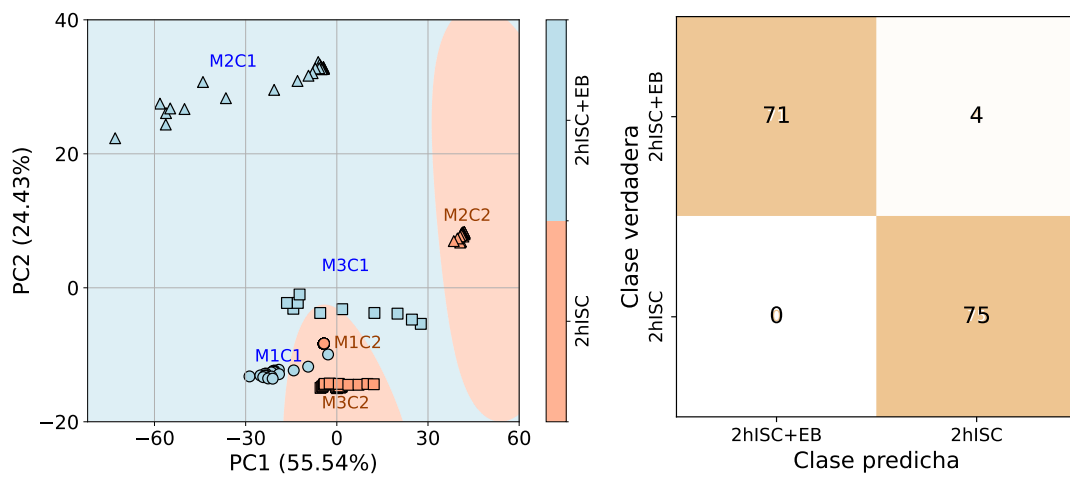
Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino



(a) Bio-TOF y su matriz de confusión



(b) Bio-LPFG y su matriz de confusión



(c) Bio-MZI y su matriz de confusión

Figura 7.2: SVM con kernel gaussiano utilizando PCA para clasificar las muestras en suero sanguíneo de 2h inducidas para 2hISC+EB y 2hISC.

## Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

---

Para asegurar la detección de IL-10 en el suero sanguíneo con y sin tratamiento en todos los biosensores, se utilizó IL-10 STD como control positivo. En la Fig. 7.3(a) y (c) se muestran los resultados para los casos con Bio-TOF (Fig. 7.3(a)) y Bio-MZI (Fig. 7.3(c)), podemos observar que las medidas de IL-10 STD están más dispersas en comparación con el caso del Bio-LPFG (Fig. 7.3(b)), donde se aprecia una aglomeración, hasta tal punto que todas las medidas se observan como una sola.

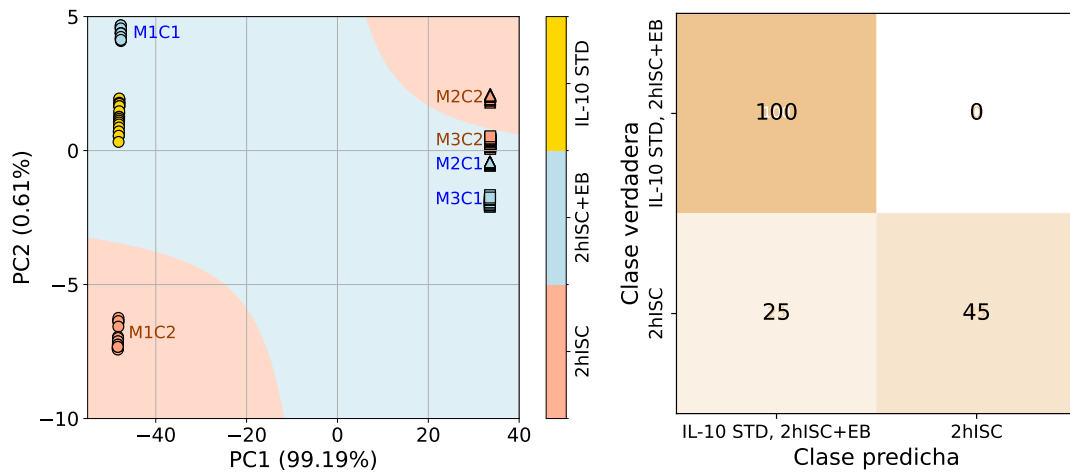
En general, podemos decir que los biosensores fueron capaces de discriminar eficazmente la detección de IL-10 STD, ya que con los tres tipos de biosensores, la proteína se localiza en la región esperada, es decir, en la región asociada a la muestra con tratamiento (2hISC+EB). Los valores de F1-Score obtenidos a partir de la matriz de confusión son 0.877, 0.85 y 0.977 para cada biosensor (TOF, LPFG y MZI) respectivamente.

Para corroborar la selectividad y afinidad de respuesta de los biosensores de IL-10, éstos fueron expuestos a diferentes proteínas que funcionaron como controles positivos y negativos. La Fig. 7.4 (a-c) muestra los resultados del PCA de los biosensores desarrollados para la detección de proteínas como Anti-Kiss, Opn5, IL-6 STD, suero sanguíneo sin isquemia (Sham), e inmovilización el Anti-IL-10, los cuales fueron utilizados como controles negativos, mientras que la IL-10 STD fue utilizada como control positivo para las muestras 2hISC, 2hISC+EB. En las Tablas B.2, B.3, y B.5, hay una mejor descripción de cada analito. Para evaluar la selectividad de los biosensores en la discriminación entre muestras con altas concentraciones de IL-10 (controles positivos) y aquellas sin IL-10 (controles negativos) o con bajas concentraciones (2hISC), se emplearon diferentes funciones de kernel. En el caso del Bio-TOF, fue necesario utilizar un kernel polinomial de cuarto grado para lograr una discriminación óptima de los datos. En contraste, para el Bio-LPFG y el Bio-MZI, el uso de un kernel gaussiano proporcionó una mejor selectividad al distinguir entre muestras con altas o bajas concentraciones de IL-10.

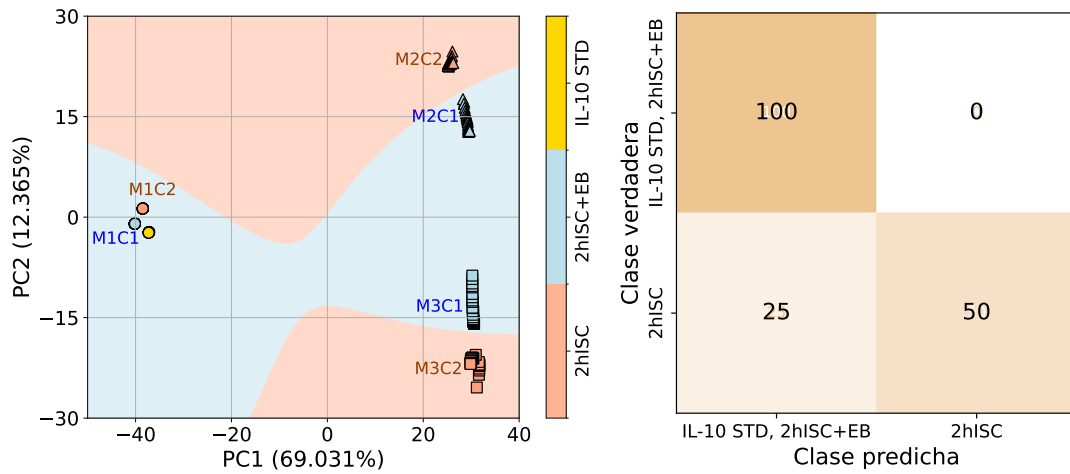
En la Fig. 7.4 (a) se observa que la muestra 2hISC se ubica del lado de los controles negativos para los tres biosensores (M1C2, M2C2 y M3C2), mientras que los datos correspondientes a 2hISC+EB se encuentran del lado de los controles positivos. Sin embargo, la muestra IL-10 STD fue clasificada en la región de los controles negativos, lo cual representa las 25 clasificaciones erróneas mostradas en la matriz de confusión (Fig. 7.4b), donde el valor del F1 score fue de 0.911, lo cual es un buen valor; no obstante, el clasificador falla al agrupar correctamente el control positivo con la muestra 2hISC+EB como una misma clase. Por lo tanto, se puede concluir que este tipo de biosensor podría no ser confiable para esta aplicación.

Por otro lado, para el Bio-LPFG, como se muestra en la Fig. 7.4c, se observa una mejor clasificación, ya que el control positivo se encuentra del lado derecho en comparación con los resultados obtenidos con los Bio-TOF. Sin embargo, la muestra M1C1 fue clasificada como control negativo; esta clasificación errónea probablemente se deba a la baja concentración de IL-10 en la muestra. Las 25 clasificaciones erróneas se muestran en la matriz de confusión, donde el valor del F1 score fue de 0.913, lo cual representa un buen desempeño. Finalmente, en el caso del Bio-MZI (ver Fig. 7.4c), el error en la clasificación del control positivo y de la muestra 2hISC+EB es bastante menor que con el Bio-TOF y el Bio-LPFG, mientras que para la clasificación de los controles negativos el error aumentó ligeramente. En trabajos previos hemos demostrado que un sensor basado en un MZI presenta una mayor sensibilidad en comparación con los LPFG y TOF [32], [14], por lo tanto pensamos que es el mismo comportamiento, es decir, el Bio-MZI tiene mayor sensibilidad a bajas concentraciones de IL-10 en muestras de suero sanguíneo. En general, pensamos que algunas muestras tienen baja concentración y por eso algunos biosensores no son capaces de clasificar correctamente las muestras, por ejemplo M1C1 en Bio-LPFG.

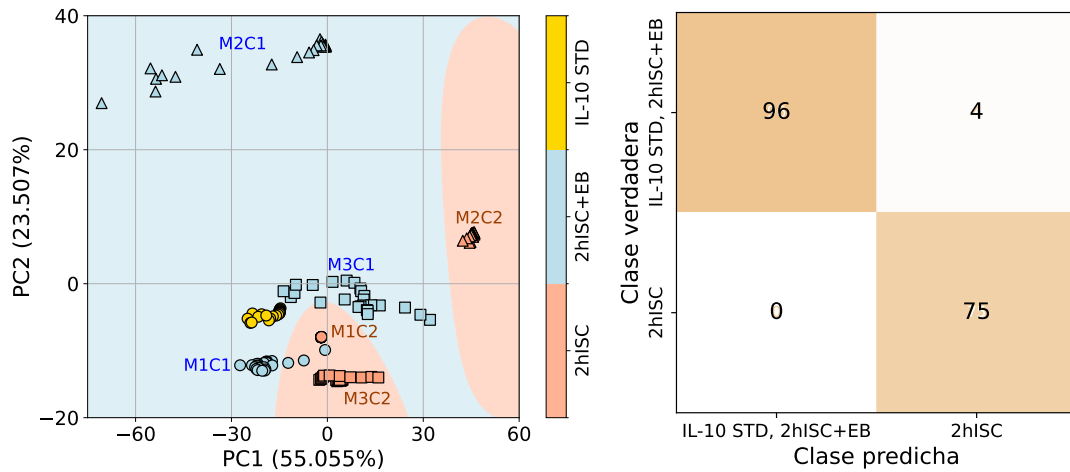
Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino



(a) Bio-TOF y su matriz de confusión



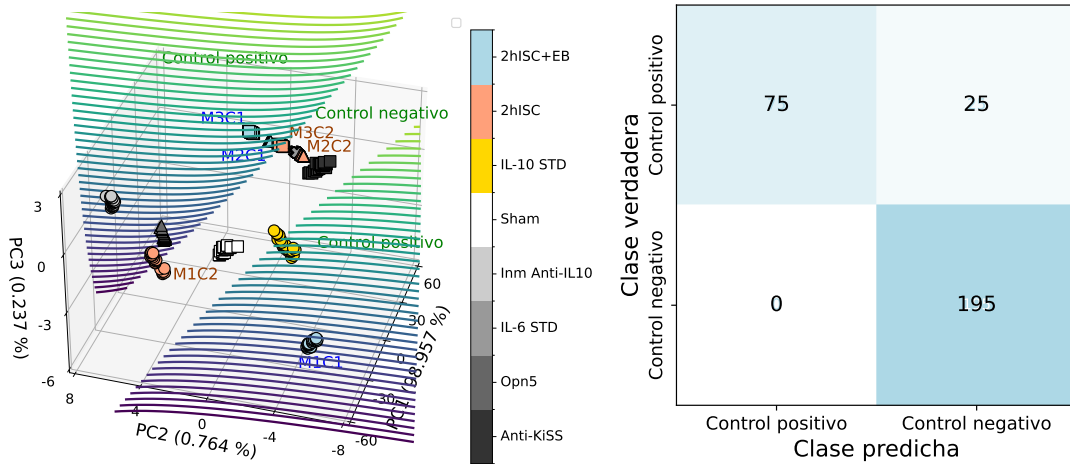
(b) Bio-LPFG y su matriz de confusión



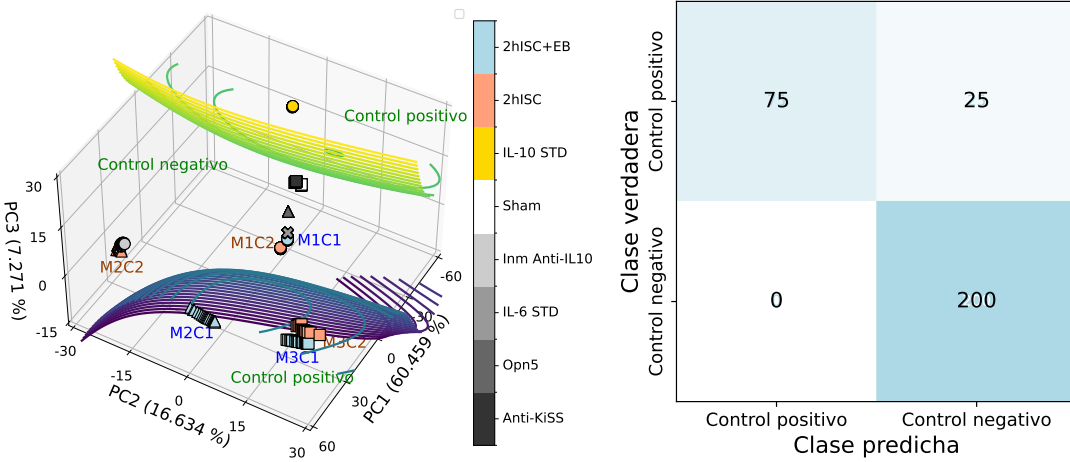
(c) Bio-MZI y su matriz de confusión

Figura 7.3: SVM con kernel gaussiano utilizando PCA para clasificar las muestras 2hISC+EB, 2hISC, e IL-10 STD y su respectiva matriz de confusión.

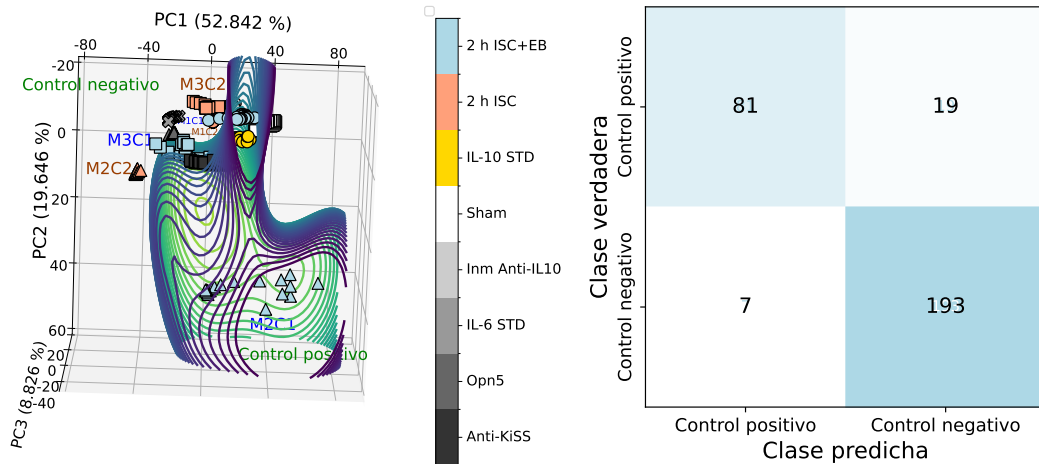
Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino



(a) Bio-TOF y su matriz de confusión



(b) Bio-LPFG y su matriz de confusión



(c) Bio-MZI y su matriz de confusión

Figura 7.4: SVM utilizando PCA para clasificar los controles positivos y negativos junto con las muestras de 2hISC+EB, 2hISC y sus respectivas matrices de confusión. El clasificador para Bio-TOF fue entrenado con un núcleo polinomial de cuarto orden, mientras que los clasificadores para Bio-LPFG y Bio-MZI fueron entrenados con un núcleo gaussiano.

## Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

---

Sin embargo, en el caso del Bio-MZI, algunas o todas las muestras se clasificaron correctamente en todos los conjuntos de mediciones. En aquellos conjuntos donde las muestras fueron parcialmente clasificadas en la clase correcta, estas coinciden con las últimas mediciones en el tiempo, donde creemos que la respuesta del biosensor debe ser mayor y, por lo tanto, la clasificación debería ser mejor. Para este biosensor, se encontraron 26 clasificaciones erróneas, 19 mediciones tanto de M1C1 como de M3C1, y 7 mediciones de Sham que fueron clasificadas erróneamente como clase de control positivo, como se muestra en la matriz de confusión.

El F1 score para este biosensor fue de 0.918, es decir, el mejor rendimiento del biosensor. En general, los tres tipos de biosensores pueden clasificar correctamente todos los controles negativos.

Para comparar las respuestas de los biosensores desarrollados para el mismo suero sanguíneo y la IL-10 STD, se realizó un análisis PCA y se aplicó SVM: Bio-TOF (círculos), Bio-LPFG (triángulos) y Bio-MZI (cuadrado), mostrados en la Fig. 7.5 (a-c), respectivamente. Fue posible identificar diferencias en la detección de IL-10 en suero sanguíneo con y sin EB como proteína neuroprotectora. Las respuestas de los biosensores para 2hISC tienen una dispersión muy pequeña debido a la ausencia o muy baja concentración de IL-10 (ver Fig. 7.5(a)).

Cuando se aplicó SVM para clasificar las respuestas de los tres biosensores, se obtuvo un valor F1-Score de 1, indicando que el clasificador fue capaz de diferenciar el tipo de biosensor utilizado para detectar la proteína IL-10 en el analito. Por otro lado, en la Fig. 7.5(b) se muestran las respuestas de los biosensores para 2hISC+EB. En este caso hay una notable dispersión de datos, especialmente para el Bio-MZI, podría estar relacionado con su mayor sensibilidad. Finalmente, en la Fig. 7.5(c) se muestran las respuestas de los biosensores para IL-10 STD. Al igual que en el caso anterior, existe una dispersión de datos que reafirma la capacidad de los biosensores para detectar eficazmente las concentraciones de la proteína IL-10 con una alta precisión de clasificación. Por lo tanto, se puede concluir que las muestras de suero sanguíneo obtenidas a las 2hISC+EB mostraron una mayor expresión de IL-10 en comparación con el suero sanguíneo obtenido a las 2hISC.

Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

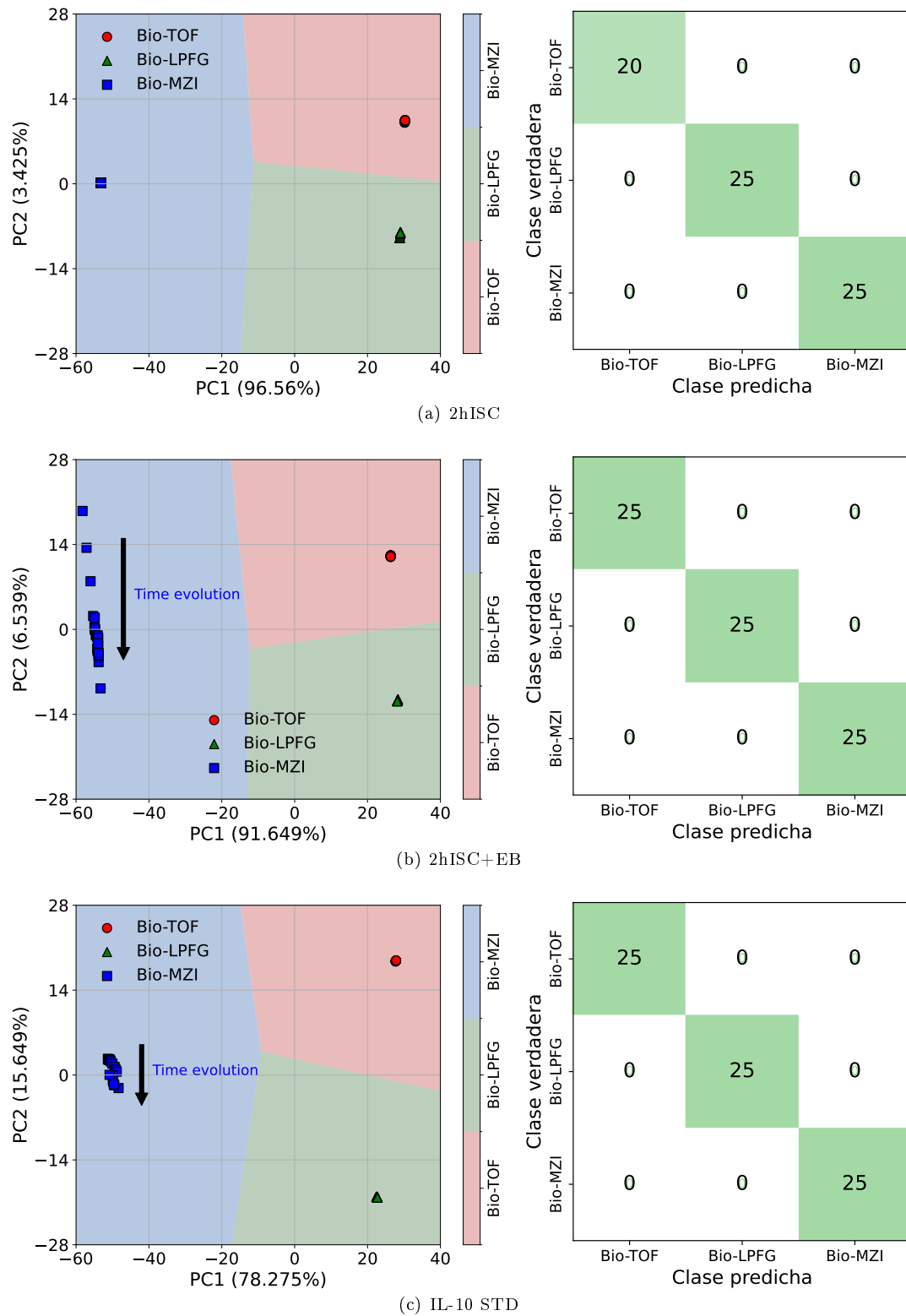


Figura 7.5: Respuestas de los biosensores utilizando PCA y un clasificador SVM con kernel lineal. Muestras de suero sanguíneo con: a) 2hISC, b) 2hISC+EB y un control positivo c) IL-10 STD.

## Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

---

Finalmente, se realizó un análisis PCA para evaluar la detección de IL-10 STD en cada biosensor (ver Fig. 7.6). En este análisis, se visualizaron tres etapas de detección: la etapa inicial (0 a 40 min) representada en blanco, la etapa intermedia (45 a 80 min) en gris, y la etapa final (85 a 120 min) en gris oscuro.

Además, se aplicó un clasificador SVM para facilitar la identificación de tendencias en la detección de IL-10 en cada caso. En el caso de Bio-TOF, se observó un comportamiento casi lineal durante las etapas inicial y final, mientras que la etapa intermedia mostró un patrón de aglomeración. Este biosensor logró un valor de F1-Score de 1, lo que indica una clasificación perfecta. Se distinguieron dos regiones claras: una asociada con tiempos tempranos (ubicada en el lado negativo de PC1) y la otra con tiempos posteriores. (on the positive side of PC1). Esto revela una clara tendencia en la que el tiempo de detección aumenta con el valor de PC1.

Por otro lado, el Bio-LPFG mostró una gran dispersión en los puntos de medición, lo que dificultó la identificación de una tendencia temporal clara en PC1 y PC2. Al calcular la matriz de confusión, se obtuvo un valor de F1-Score de 0.51, lo que sugiere dificultades para clasificar correctamente las diferentes etapas de detección en este biosensor.

En el caso de Bio-MZI, se observó una clara tendencia temporal en PC1, aunque la etapa final mostró cierta dispersión en las mediciones. Al igual que en Bio-TOF, fue posible identificar dos regiones: la etapa temprana y media (ubicada en el lado negativo de PC1) y la etapa tardía (situado en el lado positivo de PC1). Esto indica que la detección de IL-10 STD sigue una tendencia lineal, con un aumento en PC1 a medida que avanza el tiempo de detección. Similar al Bio-TOF, el valor del F1-Score fue 1, lo que indica una clasificación perfecta. En resumen, los biosensores Bio-TOF y Bio-MZI demostraron ser más sensibles en la detección de la proteína IL-10 STD en comparación con el Bio-LPFG. Estos resultados sugieren la posibilidad de desarrollar una regresión lineal para cuantificar el porcentaje de IL-10 presente en las muestras de suero sanguíneo.

Aplicación de la técnica de máquina de soporte vectorial a biosensores de fibra óptica para la detección del neuroprotector (IL-10) en muestras de suero de modelo murino

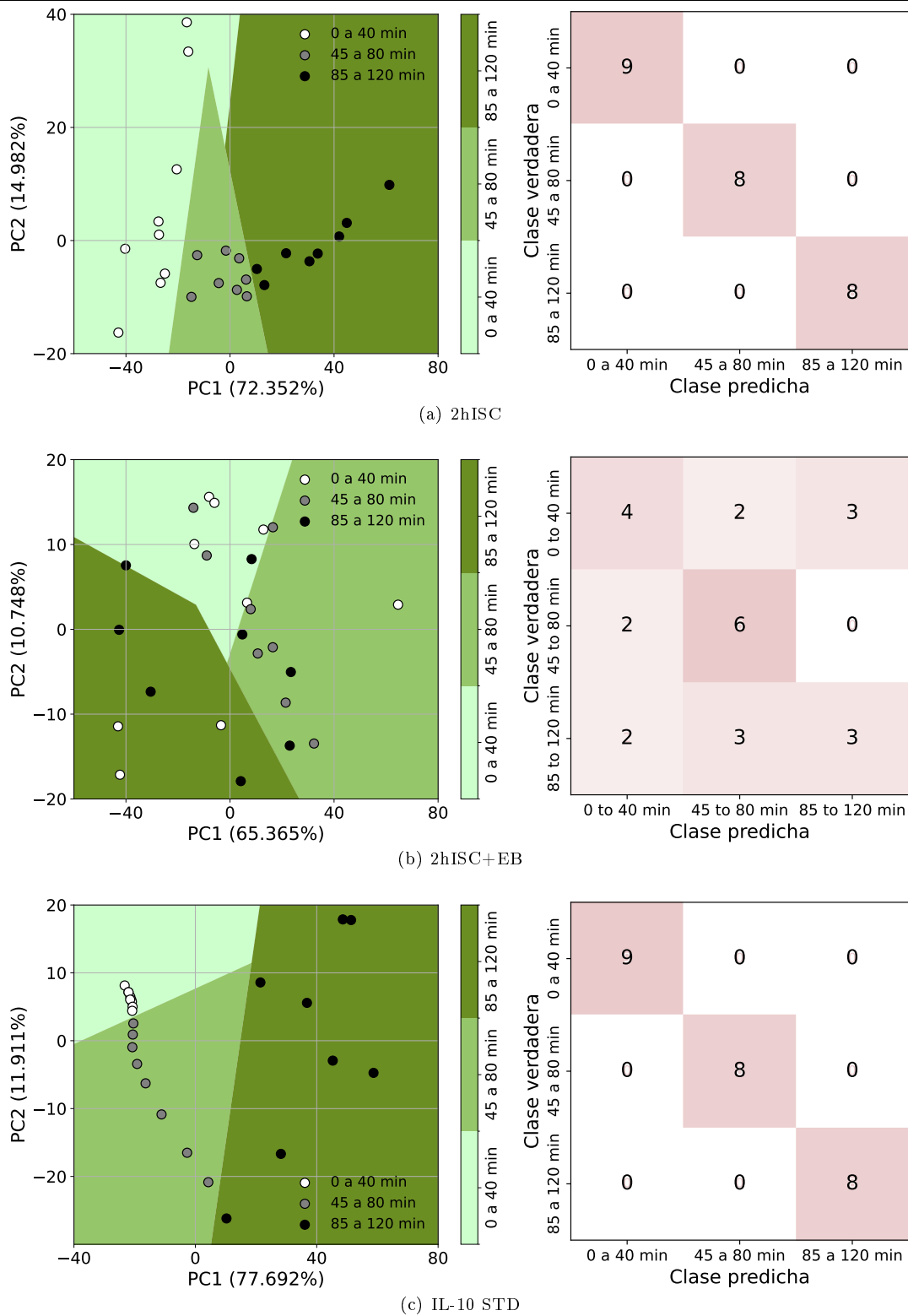


Figura 7.6: Resultados de PCA para los datos de detección de IL-10 en STD de IL-10 obtenidos en los tres tipos de biosensores y clasificación de la evolución de la detección (etapas inicial, media y final) utilizando SVM lineal: (a) Bio-TOF, (b) Bio-LPFG y (c) Bio-MZI.

## 7.1. Conclusiones Parciales

En este trabajo se desarrollaron tres tipos de biosensores para detectar la proteína neuroprotectora IL-10 en muestras de suero sanguíneo utilizando dispositivos de fibras ópticas, tales como TOF, LPFG y MZI. Las respuestas de los biosensores se analizaron utilizando PCA y el clasificador SVM con kernels lineales, polinomiales y gaussianos. Los tres tipos de biosensores fueron capaces de detectar IL-10 en muestras de suero sanguíneo, además, a partir de los resultados, se encontró que el Bio-MZI mostró una mayor sensibilidad a la concentración de IL-10. Se entrenaron tres modelos de clasificación para clasificar: a) 2hISC y 2hISC+EB, b) 2hISC, 2hISC+EB y control positivo IL-10 STD, y c) 2hISC/control negativo, y 2hISC+EB/control positivo. En todos los casos, el Bio-MZI obtuvo los mejores resultados debido a su mayor sensibilidad a la concentración de IL-10. La puntuación F1 de los tres modelos fue de 0.973, 0.977 y 0.918, respectivamente.

SVM es una herramienta potente y eficiente para el análisis y clasificación de las respuestas obtenidas a partir de los biosensores desarrollados, aumentando su potencial en aplicaciones biomédicas para la detección de biomarcadores como la IL-10, así como para la monitorización continua en tiempo real.

Los resultados de este estudio fueron publicados en el artículo titulado *Application of support vector machine technique to optical fiber biosensors for neuroprotector (IL-10) detection in serum samples of murine model*, en la revista científica **Optics and Laser Technology** [48].

## Capítulo 8

# Conclusiones Generales

Se desarrollaron los protocolos experimentales para la generación de los biosensores basados en TOF, LPFG y MZI, utilizando anticuerpos (Anti-IL-6 y Anti-L-10) como elemento de reconocimiento biológico, cuyos resultados pueden ser extrapolados a otros analitos de interés diferentes a los del presente trabajo.

Los espectros de IR permitieron determinar la estructura y homogeneidad de los biosensores construidos mediante la inmovilización de Anti-IL-10 en TOF, LPFG y MZI a través del ensamblado del biosensor.

La señal de salida de la transmisión permitió observar variaciones de amplitud y desplazamiento de longitud de onda en los espectros de salida de los biosensores TOF, LPFG y MZI, durante cada etapa de autensamblado del biosensor y detección de IL-6 e IL-10, presente en suero sanguíneo del modelo murino inducido con isquemia cerebral global.

Los biosensores basados en TOF, LPFG y MZI utilizan los cambios en el índice de refracción de las biomoléculas inmovilizadas en la superficie de una fibra óptica para detectar las proteínas IL-6 e IL-10. En el biosensor MZI comparado con los otros biosensores fue posible observar mayores variaciones de amplitud y desplazamientos espectrales.

PCA permitió analizar los datos obtenidos en transmitancia, mediante la agrupación de los datos en términos de las componentes principales del nuevo sistema. Mediante PCA se confirmó que el ensamblaje de los biosensores TOF, LPFG y MZI, así como la detección de la proteína IL-6 e IL-10 en suero sanguíneo se realizaron correctamente.

La implementación de SVM fue fundamental para optimizar la detección y clasificación de IL-10. Este enfoque permitió una separación eficiente entre las muestras, logrando una alta precisión en los tres tipos de biosensores evaluados. En la clasificación de muestras con y sin tratamiento, el método alcanzó un valor de F1-Score perfecto (valor de 1), lo que confirma su robustez y exactitud. Además, el uso de un modelo lineal facilitó la identificación de patrones en datos linealmente separables, destacando la efectividad de este enfoque en el análisis de las muestras.

Los tres tipos de biosensores fueron capaces de detectar IL-6 e IL-10 en muestras de suero sanguíneo, sin embargo, a partir de los resultados, el Bio-MZI mostró una mayor sensibilidad a los cambios del índice de refracción durante la detección. En el caso de Bio-TOF y Bio-MZI, destaca su capacidad de detección y selectividad, especialmente en la clasificación de muestras con y sin tratamiento EB. Mediante la biodetección fue posible establecer los tiempos de mayor y menor expresión de IL-6 e

IL-10, siendo 2h ISC para una y 6h ISC+EB para la otra respectivamente.

En conclusión, SVM es una herramienta poderosa y eficiente para el análisis y clasificación de las respuestas obtenidas con los biosensores desarrollados, lo que incrementa su potencial en aplicaciones biomédicas. Su capacidad para detectar biomarcadores como la IL-6 e IL-10 y su viabilidad para la monitorización continua en tiempo real lo posicionan como una técnica prometedora en el campo de la salud y el diagnóstico clínico.

# Apéndice A

## Código fuente en Python

### A.1. PCA

```
1 import pandas as pd
2 import os
3 import numpy as np
4 import matplotlib.pyplot as plt
5 from sklearn.decomposition import PCA
6 from sklearn.preprocessing import StandardScaler
7 from matplotlib import colors as mcolors
8
9 # Definir una funcion para extraer la fibra, concentracion y minutos de cada
   nombre de archivo
10 def obtener_fibra_concentracion_y_minutos(nombre_archivo):
11
12     if '_' in nombre_archivo:
13         partes = nombre_archivo.split('-')
14         Tiempo = int(partes[0])
15         inter = partes[1].split('_')
16         concentracion = inter[0]
17         minutos = int(inter[1].split('min')[0])
18     else:
19         partes = nombre_archivo.split('-')
20         Tiempo = int(partes[0])
21         concentracion = partes[1]
22         minutos = int(partes[-1].split('min')[0])
23     return (Tiempo, concentracion, minutos)
24
25 #Seleccionar el intervalo de medicion a analizar
26 Longitud_Inicial = 1374
27 Longitud_Final = 1575.2
28
29 class Mediciones():
30     def __init__(self, id, file_path):
31         self.id = id
32         self.file_path = file_path
33
34     def generate_df(self):
35         files = os.listdir(self.file_path)
```

```
36     files_MZI = []
37     files_HidroX = []
38     files_Func = []
39     files_Activ = []
40     files_Inmov = []
41     files_Detec = []
42     for f in files:
43         if 'MZI' in f:
44             files_MZI.append(f)
45         elif 'hidroxilacion' in f:
46             files_HidroX.append(f)
47         elif 'fun' in f:
48             files_Func.append(f)
49         elif 'act' in f:
50             files_Activ.append(f)
51         elif 'In' in f:
52             files_Inmov.append(f)
53         elif 'det' in f:
54             files_Detec.append(f)
55         else:
56             print(f'No se encontro el tipo de archivo {f}')
57
58     # Ordenar los nombres de archivo segun la concentracion y el tiempo de
59     # medicion
60     archivos_ordenados_MZI = sorted(files_MZI, key=
61         obtener_fibra_concentracion_y_minutos)
62     archivos_ordenados_HidroX = sorted(files_HidroX, key=
63         obtener_fibra_concentracion_y_minutos)
64     archivos_ordenados_Func = sorted(files_Func, key=
65         obtener_fibra_concentracion_y_minutos)
66     archivos_ordenados_Activ = sorted(files_Activ, key=
67         obtener_fibra_concentracion_y_minutos)
68     archivos_ordenados_Inmov = sorted(files_Inmov, key=
69         obtener_fibra_concentracion_y_minutos)
70     archivos_ordenados_Detec = sorted(files_Detec, key=
71         obtener_fibra_concentracion_y_minutos)
72
73     #path = pathlib.Path(f'{self.file_path}')
74     path = self.file_path
75     df_list_MZI = [pd.read_csv(path + rf'\{f}', skiprows=1, names=[
76         'Longitud de onda', f'T{f}'], delim_whitespace=True) for f in
77         archivos_ordenados_MZI]
78     df_list_HidroX = [pd.read_csv(path + rf'\{f}', skiprows=1, names=[
79         'Longitud de onda', f'T{f}'], delim_whitespace=True) for f in
80         archivos_ordenados_HidroX]
81     df_list_Func = [pd.read_csv(path + rf'\{f}', skiprows=1, names=[
82         'Longitud de onda', f'T{f}'], delim_whitespace=True) for f in
83         archivos_ordenados_Func]
84     df_list_Activ = [pd.read_csv(path + rf'\{f}', skiprows=1, names=[
85         'Longitud de onda', f'T{f}'], delim_whitespace=True) for f in
86         archivos_ordenados_Activ]
87     df_list_Inmov = [pd.read_csv(path + rf'\{f}', skiprows=1, names=[
88         'Longitud de onda', f'T{f}'], delim_whitespace=True) for f in
89         archivos_ordenados_Inmov]
```

```

73 df_list_Detec = [pd.read_csv(path + rf'\{f}', skiprows=1, names=[
    Longitud de onda', f'T{f}'], delim_whitespace=True) for f in
    archivos_ordenados_Detec]
74
75 return {'MZI':df_list_MZI,
76         'Hidroxi':df_list_Hidroxi,
77         'Func':df_list_Func,
78         'Activ':df_list_Activ,
79         'Inmov':df_list_Inmov,
80         'Detec':df_list_Detec
81         }
82
83 def dfs_cond(self):
84     med = self.generate_df()
85
86     m1 = len(med['MZI'])
87     for i in range(m1):
88         cond_MZI = (Longitud_Inicial<med['MZI'][i]['Longitud de onda'])*(
            med['MZI'][i]['Longitud de onda']<Longitud_Final)
89         med['MZI'][i]=med['MZI'][i][cond_MZI]
90         print(med['MZI'][i])
91     #
92     m3 = len(med['Hidroxi'])
93     cond_Hidroxi = (Longitud_Inicial<med['Hidroxi'][i]['Longitud de onda'])*(
            med['Hidroxi'][i]['Longitud de onda']<Longitud_Final)
94     for i in range(m3):
95         med['Hidroxi'][i]=med['Hidroxi'][i][cond_Hidroxi]
96         print(med['Hidroxi'][i])
97     #
98     m4 = len(med['Func'])
99     for i in range(m4):
100         cond_Func = (Longitud_Inicial<med['Func'][i]['Longitud de onda'])*(
            med['Func'][i]['Longitud de onda']<Longitud_Final)
101         med['Func'][i]=med['Func'][i][cond_Func]
102         print(med['Func'][i])
103     #
104     m6 = len(med['Activ'])
105     for i in range(m6):
106         cond_Activ = (Longitud_Inicial<med['Activ'][i]['Longitud de onda'])
            *( med['Activ'][i]['Longitud de onda']<Longitud_Final)
107         med['Activ'][i]=med['Activ'][i][cond_Activ]
108         print(med['Activ'][i])
109     #
110     m7 = len(med['Inmov'])
111     for i in range(m7):
112         cond_Inmov = (Longitud_Inicial<med['Inmov'][i]['Longitud de onda'])
            *( med['Inmov'][i]['Longitud de onda']<Longitud_Final)
113         med['Inmov'][i]=med['Inmov'][i][cond_Inmov]
114         print(med['Inmov'][i])
115     #
116     m8 = len(med['Detec'])
117     for i in range(m8):
118         cond_Detec = (Longitud_Inicial<med['Detec'][i]['Longitud de onda'])
            *( med['Detec'][i]['Longitud de onda']<Longitud_Final)
119         med['Detec'][i]=med['Detec'][i][cond_Detec]

```

```
120         print(med['Detec'][i])
121
122     return med
123
124     def normalize_cero_uno(self):
125         medcu = self.dfs_cond()
126         for tipo, lista_df in medcu.items():
127             maximo=[]
128             for df in lista_df:
129                 transmission = df.columns[1]
130                 maxx=df[transmission].max()
131                 maximo.append(maxx)
132             max_val = max(maximo)
133             for df in lista_df:
134                 transmission = df.columns[1]
135                 df[transmission] = (df[transmission])/max_val
136         return medcu
137
138     def normalize_Std(self):
139         med = self.normalize_cero_uno()
140         for tipo, lista_df in med.items():
141             for df in lista_df:
142                 transmission = df.columns[1]
143                 df[transmission] = (df[transmission]- df[transmission].mean())/df[
144                     transmission].std()
145         return med
146
147     def tableN(self):
148         med1_normalize = self.normalize_Std()
149         for tipo, lista in med1_normalize.items():
150             exp =med1_normalize[tipo]
151             df0 = exp[0]
152             n = len(exp)
153             for i in range(1,n):
154                 df0= pd.merge(df0, exp[i], how='outer', on='Longitud de onda')
155             med1_normalize[tipo] = df0
156         return med1_normalize
157
158     def tableR(self):
159         med1_DatosR = self.dfs_cond()
160         for tipo, lista in med1_DatosR.items():
161             exp =med1_DatosR[tipo]
162             df0 = exp[0]
163             n = len(exp)
164             for i in range(1,n):
165                 df0= pd.merge(df0, exp[i], how='outer', on='Longitud de onda')
166             med1_DatosR[tipo] = df0
167         return med1_DatosR
168
169     path = r"Datos-Completos "
170     Exp1 = Mediciones('DatosCompletos', path)
171     df_tables = Exp1.tableN()
172     #####
```

```
173 tableM1 =pd.merge(df_tables['MZI'], df_tables['HidroX'], how='outer', on='
    Longitud de onda') # 'LPFG' + 'HidroX'
174 tableM2 =pd.merge(df_tables['Func'], df_tables['Activ'], how='outer', on='
    Longitud de onda') # 'Func' + 'Activ'
175 tableM3 =pd.merge(df_tables['Inmov'], df_tables['Detec'], how='outer', on='
    Longitud de onda') # 'Inmov' + 'Detec'
176 tableN1 =pd.merge(tableM1, tableM2, how='outer', on='Longitud de onda') # 'LPFG
    ' + 'HidroX' + 'Func' + 'Activ'
177 table = pd.merge(tableN1, tableM3, how='outer', on='Longitud de onda') # 'LPFG'
    + 'HidroX' + 'Func' + 'Activ' + 'Inmov' + 'Detec'
178 #####
179
180 #Guardamos los datos de table en un archivo table.txt
181 table.to_csv('Datos.txt', sep='\t', index=False)
182
183 longitud_onda = table['Longitud de onda']
184 diferencia=len(longitud_onda)
185 # Eliminamos la longitud de onda
186 nombres_med=table.keys()
187 med=nombres_med[1:]
188 print(len(med))
189 mediciones = table[med]
190
191 ### Transponemos las mediciones
192 DatosT=mediciones.transpose()
193
194 #####
195 #####          Calculamos PCA          #####
196
197 # Se divide la matriz del dataset en dos partes
198 X = DatosT.iloc[:,0:diferencia].values
199 # la submatriz x contiene los valores de las columnas del dataframe y todas las
    filas
200 y=np.array(med)
201
202 # Paso 2. Estandarizacion
203 # Calculamos la media de cada columna
204 mean = np.mean(X, axis=0)
205 std_dev = np.std(X, axis=0)
206 X_std = (X - mean) / std_dev
207
208 # Paso 3. Obtener los eigenvectores y eigenvalores a partir de la matriz de
    covarianza
209 #Calculamos los autovalores y autovectores de la matriz y los mostramos
210 cov_mat = np.cov(X_std.T)
211 eig_vals, eig_vecs = np.linalg.eig(cov_mat)
212
213 # Hacemos una lista de parejas (eigenvector, eigenvalor)
214 eig_pairs = [(np.abs(eig_vals[i]), eig_vecs[:,i]) for i in range(len(eig_vals))
    ]
215 # Ordenamos estas parejas en orden descendiente con la funcion sort
216 eig_pairs.sort(key=lambda x: x[0], reverse=True)
217
218 # Calcular la varianza explicada y extraer la parte real
219 tot = sum(eig_vals)
```

```

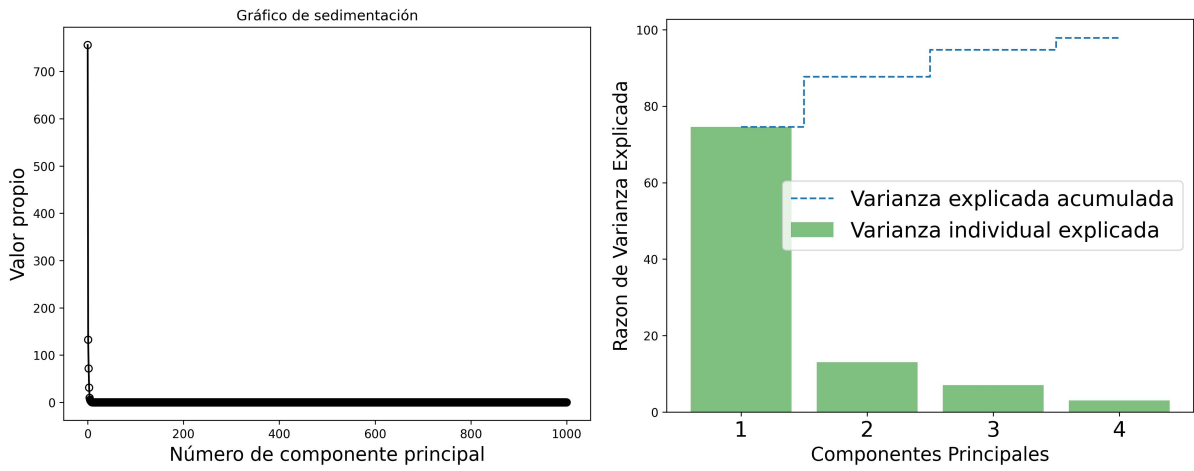
220 var_exp = [(i / tot)*100 for i in sorted(eig_vals, reverse=True)]
221 Var = [np.round(np.real(var), 3) for var in var_exp]
222 print("Var", Var)
223 print("Var_(1:4)", Var[:4])
224
225 # Sumar los primeros cuatro elementos
226 sumaPCA = sum(Var[:4])
227 print('Suma (PC1 + PC2 + PC3 + PC4) =', sumaPCA)
228
229 # Calcular la suma acumulativa de los elementos
230 cum_var_exp = np.cumsum(Var)
231
232 #=====
233 #Representamos en un diagrama de barras la varianza explicada por cada
    eigenvalor, y la acumulada
234 plt.figure(figsize=(8, 6));
235 plt.bar(range(4), Var[:4], alpha=0.5, label='Varianza individual explicada',
    color='g');
236 plt.step(range(4), cum_var_exp[:4], where='mid', linestyle='--', label='
    Varianza explicada acumulada');
237 plt.xticks([0,1,2,3], ['1','2','3','4'], fontsize=18);
238 plt.ylabel('Razon de Varianza Explicada', fontsize=16);
239 plt.xlabel('Componentes Principales', fontsize=16);
240 plt.legend(loc='center right', fontsize=18);
241
242 # Guardar la grafica
243 plt.savefig('Imagenes\Varianzaexplicada.jpg', dpi=300, bbox_inches='tight');
244 #=====
245 ##### Grafico de sedimentacion
246 eig_vals_real= [np.real(var) for var in eig_vals]
247 eigenvalor = [i for i in sorted(eig_vals_real, reverse=True)]
248
249 plt.figure(figsize=(8, 6));
250 plt.scatter(np.arange(0,diferencia,1), eigenvalor, marker='o', facecolors='none
    ',edgecolors='k');
251 plt.plot(np.arange(0,diferencia,1), eigenvalor, 'k-');
252 plt.ylabel('Valor propio', fontsize=16);
253 plt.xlabel('Numero de componente principal', fontsize=16);
254 plt.title('Grafico de sedimentacion');
255 plt.savefig('GraficoSedimentacion.jpg', dpi=300, bbox_inches='tight');
256 #=====
257 CP=X_std.dot(eig_vecs)
258 Componentes=CP[:,5].real
259
260 pc1=Componentes[:,0].real
261 pc2=Componentes[:,1].real
262 pc3=Componentes[:,2].real
263 pc4=Componentes[:,3].real
264 pc5=Componentes[:,4].real
265
266 dict_PCX = {
267     'PC1': {'componente': pc1, 'varianza': Var[0]},
268     'PC2': {'componente': pc2, 'varianza': Var[1]},
269     'PC3': {'componente': pc3, 'varianza': Var[2]},
270     'PC4': {'componente': pc4, 'varianza': Var[3]},

```

```

271     'PC5': {'componente': pc5, 'varianza': Var[4]}
272 }
273
274 def plot_PCX_PCY(PCX, PCY):
275
276     A=dict_PCX[PCX]['componente']
277     B=dict_PCX[PCY]['componente']
278
279     varA= dict_PCX[PCX]['varianza']
280     varB= dict_PCX[PCY]['varianza']
281
282     #-----
283     # Grafica
284     fig, ax = plt.subplots(figsize=(8, 6))
285
286     # Grafica de los puntos de cada etapa del ensamblado del biosensor y la
287     # deteccion
288     ax.scatter(A[0:4], B[0:4], label='MZI', c='olive', marker='o', s=120,
289               edgecolors='olive')
290     ax.scatter(A[4:8], B[4:8], label='Hidroxilacion', c='brown', marker='^',
291               s=120, edgecolors='brown')
292     ax.scatter(A[8:12], B[8:12], label='Funcionalizacion', c='lime', marker='s',
293               s=120, edgecolors='lime')
294     ax.scatter(A[12:31], B[12:31], label='Activacion', c='k', marker='P', s
295               =120, edgecolors='k')
296     ax.scatter(A[31:56], B[31:56], label='Inmovilizacion', c='blue', marker='D',
297               s=120, edgecolors='blue')
298     ax.scatter(A[56:81], B[56:81], label='Deteccion', c='r', marker='o', s
299               =120, edgecolors='r')
300
301     ax.legend(loc='upper right', fontsize=13, facecolor='none', edgecolor='none
302               ', bbox_to_anchor=(0.52, 0, 0.5, 0.4))
303
304     # Agregar etiquetas y leyenda
305     plt.xlabel(f'{PCX} ({varA}%)', fontsize=18);
306     plt.ylabel(f'{PCY} ({varB}%)', fontsize=18);
307     plt.xticks(fontsize=16);
308     plt.yticks(fontsize=16);
309     plt.grid()
310
311     x_ticks = np.linspace(-40, 40, 5) # 5 valores entre -40 y 40
312     y_ticks = np.linspace(-60, 20, 5) # 5 valores entre -10 y 10
313
314     plt.xticks(x_ticks, fontsize=16);
315     plt.yticks(y_ticks, fontsize=16);
316
317     plt.savefig(f'Imagenes\PCA\PCA-{PCX}vs{PCY}-Color.jpg', dpi=300,
318               bbox_inches='tight')
319     plt.savefig(f'Imagenes\PCA\PCA-{PCX}vs{PCY}-Color.pdf', dpi=300,
320               bbox_inches='tight')
321
322     plt.show()
323
324 plot_PCX_PCY('PC1', 'PC2')

```



(a) Gráfico de sedimentación, que muestra el número del componente principal versus su valor propio correspondiente. (b) Varianza explicada, que muestra cuánta varianza se puede atribuir a cada una de las componentes principales.

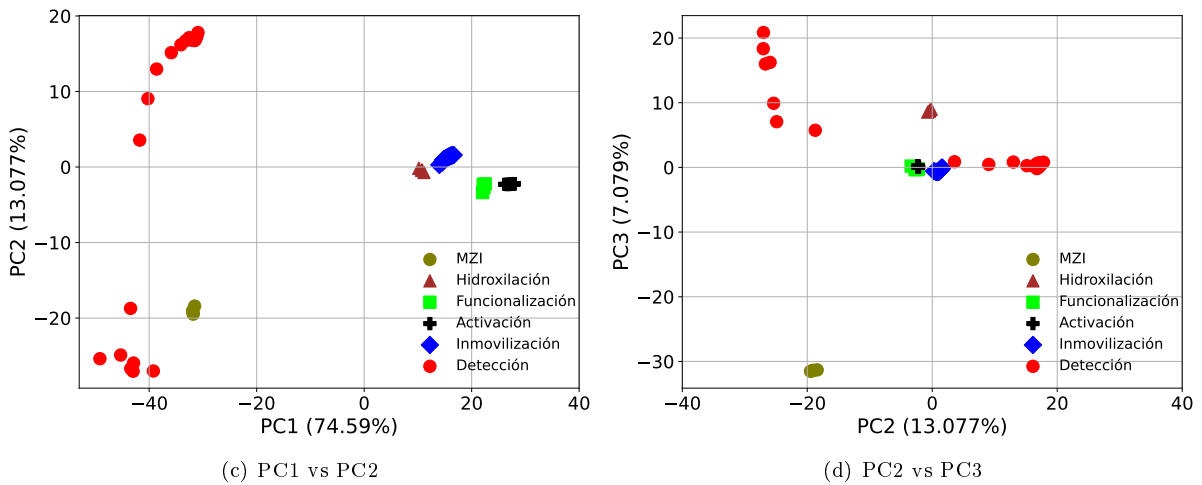
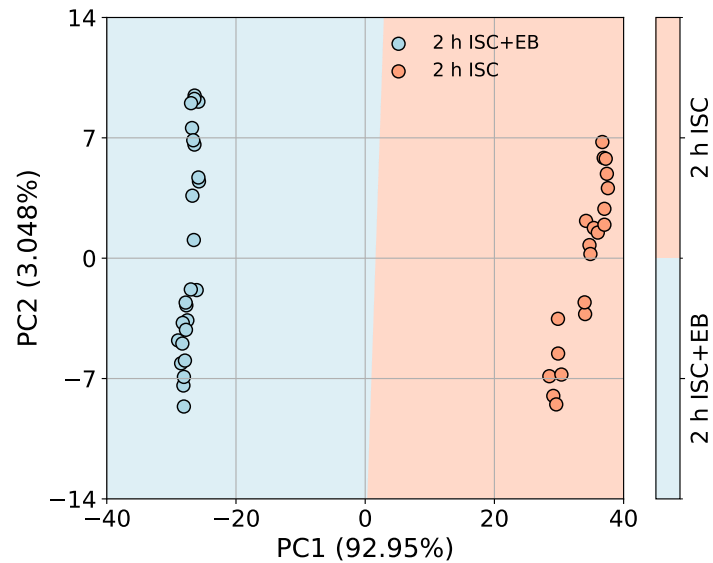


Figura A.1: Graficas obtenidas por el programa de análisis de componentes principales.

## A.2. SVM

```
1 #Calculo del SVM
2 from matplotlib.colors import ListedColormap, BoundaryNorm
3 from sklearn.svm import SVC
4
5
6 def plot_PCX_PCY(PCX, PCY):
7
8     A=dict_PCX[PCX]['componente']
9     B=dict_PCX[PCY]['componente']
10
11     varA= dict_PCX[PCX]['varianza']
12     varB= dict_PCX[PCY]['varianza']
13
14     # Datos de ejemplo
15     pcx = np.array(A)
16     pcy = np.array(B)
17
18     # Asignar etiquetas a cada tipo de biosensor
19     labels1 = np.array([1]*25 + [2]*20 )           # 1 - ISC+EB , 2 - ISC
20
21     # Crear la matriz de características
22     MC = np.column_stack((pcx, pcy))
23
24     #-----
25
26     # Crear un clasificador SVM
27     svm_clf1 = SVC(kernel='linear')
28     svm_clf1.fit(MC, labels1)
29
30     #-----
31
32     # Crear una malla para graficar los limites de decision del SVM en el
33     # espacio de las componentes principales
34     valor = 15
35     x_min, x_max = pcx.min() - valor, pcx.max() + valor
36     y_min, y_max = pcy.min() - valor, pcy.max() + valor
37     xx, yy = np.meshgrid(np.arange(x_min, x_max, 0.02),
38                           np.arange(y_min, y_max, 0.02))
39
40     #-----
41     z1 = svm_clf1.predict(np.c_[xx.ravel(), yy.ravel()])
42     z1 = z1.reshape(xx.shape)
43
44     #-----
45     # Definir los colores especificos
46     # Convertir colores hexadecimales a RGBA con alpha=0.4
47     color_naranja_tenuo = to_rgba("#FFA07A", alpha=0.4) # Naranja claro con
48     # transparencia
49     color_azul_tenuo = to_rgba("#ADD8E6", alpha=0.4) # Azul claro con
50     # transparencia
51     # Crear un mapa de color con los colores transparentes
52     cmap1 = ListedColormap([color_azul_tenuo, color_naranja_tenuo])
```

```
51 bounds1 = np.linspace(0.5, 2.5, 3)
52 norm1 = BoundaryNorm(bounds1, cmap1.N)
53
54
55 #
56 -----
57
56 # Dibujar las areas de decision
57 plt.figure(figsize=(8, 6));
58 plt.contourf(xx, yy, z1, cmap=cmap1, norm=norm1)
59
60 # Crear la barra de color con etiquetas especificas
61 cbar = plt.colorbar(plt.cm.ScalarMappable(norm=norm1, cmap=cmap1),
62                    boundaries=bounds1, ticks=[1,2])
63 cbar.ax.set_yticklabels(['2 h ISC+EB', '2 h ISC'], rotation=90, va='center',
64                        , fontsize=16)
65
66 #Grafica de los puntos
67
68 plt.scatter(A[0:25], B[0:25], label='2 h ISC+EB', c="#ADD8E6", marker='o',
69            s=80, edgecolors='black')
70 plt.scatter(A[25:45], B[25:45], label='2 h ISC', c="#FFA07A", marker='o', s
71            =80, edgecolors='black')
72
73 plt.legend(loc='upper right', fontsize=13, facecolor='none', edgecolor='none
74            ', bbox_to_anchor=(0.87, 1))
75
76 # Agregar etiquetas y leyenda
77 plt.xlabel(f'{PCX} ({varA}%)', fontsize=18);
78 plt.ylabel(f'{PCY} ({varB}%)', fontsize=18);
79
80 x_ticks = np.linspace(-40, 40, 5) # 5 valores entre -40 y 40
81 y_ticks = np.linspace(-14, 14, 5) # 5 valores entre -10 y 10
82 plt.xticks(x_ticks, fontsize=16);
83 plt.yticks(y_ticks, fontsize=16);
84
85 plt.xlim(-40,40)
86 plt.ylim(-14,14)
87
88 plt.grid()
89
90 # Guardar la grafica
91 plt.savefig(f'Imagenes\SVM\SVM-Lineal\SVML-{PCX}vs{PCY}-Color.jpg', dpi
92            =300, bbox_inches='tight')
93 plt.savefig(f'Imagenes\SVM\SVM-Lineal\SVML-{PCX}vs{PCY}-Color.pdf', dpi
94            =300, bbox_inches='tight')
95 plt.savefig(f'Imagenes\SVM\SVM-Lineal\SVML-{PCX}vs{PCY}-Color.png', dpi
96            =300, bbox_inches='tight', transparent=True)
97
98 # Mostrar la grafica
99 plt.show()
100
101 plot_PCX_PCY('PC1', 'PC2')
```



(a)

Figura A.2: PCA y SVM aplicados a datos de detección en suero sanguíneo de 2 h inducidas con y sin tratamiento.

### A.3. Matriz de confusión

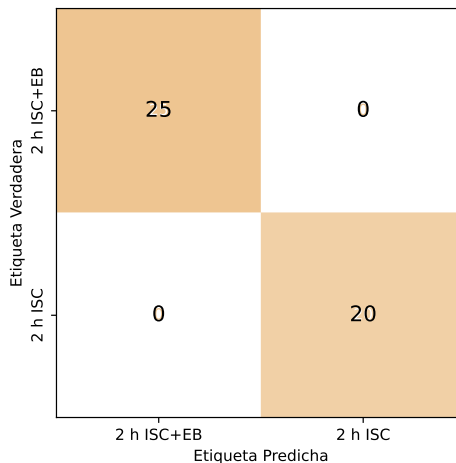
```

1 import numpy as np
2 #Calculo del SVM
3 from matplotlib.colors import ListedColormap, BoundaryNorm
4 from sklearn.svm import SVC
5
6 #Matriz de confusion
7 from sklearn.metrics import confusion_matrix, ConfusionMatrixDisplay, f1_score,
8   precision_score, recall_score, accuracy_score
9 from matplotlib.colors import LinearSegmentedColormap
10 from matplotlib.colors import ListedColormap, to_rgba #Color en matriz de
11   confusion
12
13 def apply_pca(X):
14     pca = PCA(n_components=10) # Initialize PCA with 3 components
15     X_pca = pca.fit_transform(X) # Apply PCA to the data
16     return X_pca, pca.explained_variance_ratio_, pca.explained_variance_
17
18 Componentes = X_pca
19
20 pc1=Componentes[:,0].real
21 pc2=Componentes[:,1].real
22 pc3=Componentes[:,2].real
23 pc4=Componentes[:,3].real
24 pc5=Componentes[:,4].real
25
26 dict_PCX = {
27     'PC1': {'componente': pc1},
28     'PC2': {'componente': pc2},

```

```
27     'PC3': {'componente': pc3},
28     'PC4': {'componente': pc4},
29     'PC5': {'componente': pc5}
30 }
31
32 def ConfusionMatrix_PCX_PCY(PCX, PCY):
33     A = dict_PCX[PCX]['componente']
34     B = dict_PCX[PCY]['componente']
35
36     pcx = np.array(A)
37     pcy = np.array(B)
38
39     labels1 = np.array([1]*25 + [2]*20 ) # 1 - ISC+EB , 2 - ISC
40
41     MC = np.column_stack((pcx, pcy))
42
43     # Crear un clasificador SVM
44     svm_clf1 = SVC(kernel='linear')
45     svm_clf1.fit(MC, labels1)
46
47     # Predicciones del clasificador
48     predictions = svm_clf1.predict(MC)
49
50     # Calcular la matriz de confusion
51     conf_matrix = confusion_matrix(labels1, predictions)
52
53     # Calcular las metricas
54     f1 = f1_score(labels1, predictions)
55     precision = precision_score(labels1, predictions)
56     recall = recall_score(labels1, predictions)
57     accuracy = accuracy_score(labels1, predictions)
58
59     print("Matriz de Confusion:\n", conf_matrix)
60     print(f"F1-Score: {f1:.2f}")
61     print(f"Precision: {precision:.2f}")
62     print(f"Recall: {recall:.2f}")
63     print(f"Accuracy: {accuracy:.2f}")
64
65
66     #
67     =====
68
69     # Mostrar la matriz de confusion en una figura separada
70     plt.figure(figsize=(8, 6))
71
72     cm_display = ConfusionMatrixDisplay(confusion_matrix = conf_matrix ,
73         display_labels = ['2 h ISC+EB', '2 h ISC'])
74
75     # Graficar la matriz de confusion
76     # Crear el colormap personalizado
77     cmap1 = LinearSegmentedColormap.from_list("naranja_azul", ['#FFFFFF', '#
78         EEC591'])
79
80     cm_display.plot(cmap = cmap1, colorbar=False)
```

```
78
79 # Personalizar los numeros en la matriz de confusion
80 # Modifica 'fontsize' y 'color' segun tus preferencias
81 for i in range(conf_matrix.shape[0]):
82     for j in range(conf_matrix.shape[1]):
83         plt.text(j, i, conf_matrix[i, j],
84                 ha='center', va='center',
85                 color='k', fontsize=14)
86
87 # Texto en las etiquetas
88 plt.xlabel("Etiqueta Predicha")
89 plt.ylabel("Etiqueta Verdadera")
90
91 plt.yticks(rotation=90, va='center') # Rotar las etiquetas del eje X (
92     Predicted Label)
93 plt.savefig(f'Imágenes\SVM\SVM-Lineal\Confusion_Matrix-{PCX}vs{PCY}-Color.
94     jpg', dpi=300, bbox_inches='tight')
95 plt.savefig(f'Imágenes\SVM\SVM-Lineal\Confusion_Matrix-{PCX}vs{PCY}-Color.
96     pdf', dpi=300, bbox_inches='tight')
97 plt.savefig(f'Imágenes\SVM\SVM-Lineal\Confusion_Matrix-{PCX}vs{PCY}-Color.
98     png', dpi=300, bbox_inches='tight', transparent=True)
99
100 plt.show()
101 ConfusionMatrix_PCX_PCY('PC1', 'PC2')
```



(a)

Figura A.3: Matriz de confusión del SVM (Fig. A.2).



# Apéndice B

## Tablas

Tabla B.1: Descripción de los biosensores Bio-TOF para detectar IL-6.

Biosensor	ERB	Analito	Descripción
Biosensor 1	Anti-IL6	2h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo $t= 2$ hrs.
Biosensor 2		2h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t= 2$ hrs.
Biosensor 3		6h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo $t= 6$ hrs.
Biosensor 4 (Control positivo)		IL-6 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-6 Standard.
Biosensor 5 (Control negativo)		Sham	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo sin Isquemia cerebral al tiempo $t=0$ .
Biosensor 6 (Control negativo)		Anti-KiSS	Biosensor que interactúa con el anticuerpo Anti-kisspeptina.
Biosensor 7 (Control negativo)		OPN5	Biosensor que interactúa con la proteína Op-sina Opn5.
Biosensor 8 (Control negativo)		Proteinasa k	Biosensor que interactúa con la proteína Proteinasa k.

Tabla B.2: Descripción de los biosensores Bio-TOF para detectar IL-10.

Biosensor	ERB	Analito	Descripción
Biosensor 1	Anti-IL10	2h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 2 hrs.
Biosensor 2		2h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 2 hrs.
Biosensor 3		6h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 6 hrs.
Biosensor 4 (Control positivo)		IL-10 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-10 Standard.
Biosensor 5 (Control negativo)		Sham	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo sin Isquemia cerebral al tiempo t=0.
Biosensor 6 (Control negativo)		Anti-KiSS	Biosensor que interactúa con el anticuerpo Anti-kisspeptina.
Biosensor 7 (Control negativo)		OPN5	Biosensor que interactúa con la proteína Op-sina Opn5.
Biosensor 8 (Control negativo)		Proteinasa k	Biosensor que interactúa con la proteína Proteinasa k.
Biosensor 15 (Control negativo)		IL-6 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-6 Standard.

Tabla B.3: Descripción de los biosensores Bio-LPFG para detectar IL-10.

Etiqueta	ERB	Analito	Descripción
Biosensor 1	Anti-IL-10	2h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 2 hrs.
Biosensor 2		4h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 4 hrs.
Biosensor 3		6h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 6 hrs.
Biosensor 4		12h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 12 hrs.
Biosensor 5		24h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 24 hrs.
Biosensor 6		2h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 2 hrs.
Biosensor 7		4h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 4 hrs.
Biosensor 8		6h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 6 hrs.
Biosensor 9		12h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 12 hrs.
Biosensor 10		24h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t= 24 hrs.
Biosensor 11 (Control positivo)		IL-10 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-10 Standard.
Biosensor 12 (Control negativo)		Sham	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t=0 hrs.
Biosensor 13 (Control positivo)		Anti-KiSS	Biosensor que interactúa con el anticuerpo Anti-kisspeptina.
Biosensor 14 (Control positivo)		OPN5	Biosensor que interactúa con la proteína Op-sina Opn5.
Biosensor 15 (Control positivo)		IL-6 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-6 Standard.

Tabla B.4: Descripción de los biosensores Bio-MZI para detectar IL-6.

Etiqueta	ERB	Analito	Descripción
Biosensor 1	Anti-IL-6	0h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=0$ hrs.
Biosensor 2		2h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=2$ hrs.
Biosensor 3		4h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=4$ hrs.
Biosensor 4		6h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=6$ hrs.
Biosensor 5		12h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=12$ hrs.
Biosensor 6		24h ISC	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=24$ hrs.
Biosensor 7		24h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo $t=24$ hrs.
Biosensor 8 (Control positivo)		IL-6 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-6 Standard.
Biosensor 9 (Control negativo)		Sham	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo $t=0$ hrs.
Biosensor 10 (Control negativo)		Anti-KiSS	Biosensor que interactúa con el anticuerpo Anti-kisspeptina.
Biosensor 11 (Control negativo)		OPN5	Biosensor que interactúa con la proteína Op-sina Opn5.

Tabla B.5: Descripción de los biosensores Bio-MZI para detectar IL-10.

Etiqueta	ERB	Analito	Descripción
Biosensor 1	Anti-IL-10	0h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 0 hrs.
Biosensor 2		2h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 2 hrs.
Biosensor 3		4h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 4 hrs.
Biosensor 4		6h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 4 hrs.
Biosensor 5		12h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 12 hrs.
Biosensor 6		24h ISC+EB	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido con tratamiento al tiempo t= 24 hrs.
Biosensor 7 (Control positivo)		IL-10 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-10 Standard.
Biosensor 8 (Control negativo)		Sham	Biosensor que interactúa con suero sanguíneo inducido sin tratamiento al tiempo t=0 hrs.
Biosensor 9 (Control negativo)		Anti-KiSS	Biosensor que interactúa con el anticuerpo Anti-kisspeptina.
Biosensor 10 (Control negativo)		OPN5	Biosensor que interactúa con la proteína Op-sina Opn5.
Biosensor 11 (Control negativo)		IL-6 STD	Biosensor que interactúa con Human IL-6 Standard.

Tabla B.6: Datos del PCA de los biosensores del 1 al 5 en las diferentes regiones de longitud de onda de Bio-TOF para detectar IL-6.

Biosensor	Longitud de onda (nm)	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)
Biosensor 1	1270-1400	87.808	10.35	1.51
	1290-1380	96.79	1.89	1.17
	1300-1350	99.23	0.69	0.03
	1300-1360	98.98	0.64	0.32
Biosensor 2	1270-1400	54.76	35.18	7.45
	1290-1380	59.36	37.84	2.46
	1300-1350	87.074	12.47	0.26
	1300-1360	78.33	20.81	0.59
Biosensor 3	1270-1400	56.13	30.96	11.72
	1290-1380	65.35	26.08	7.34
	1300-1350	90.63	6.79	1.84
	1300-1360	82.26	13.84	2.46
Biosensor 4	1270-1400	99.46	0.47	0.04
	1290-1380	99.906	0.06	0.02
	1300-1350	99.96	0.02	0.008
	1300-1360	99.95	0.02	0.01
Biosensor 5	1270-1400	99.302	0.59	0.05
	1290-1380	99.77	0.15	0.05
	1300-1350	99.909	0.07	0.018
	1300-1360	99.87	0.08	0.04

Tabla B.7: Datos del PCA de los biosensores del 1 al 5 en las diferentes regiones de longitud de onda de Bio-TOF para detectar IL-10.

Biosensor	Longitud de onda (nm)	PC1 (%)	PC2 (%)	PC3 (%)
Biosensor 1	1270-1400	94.95	3.718	0.907
	1270-1350	97.56	1.83	0.309
	1300-1350	97.22	2.207	0.23
	1350-1400	92.66	6.82	0.31
Biosensor 2	1270-1400	84.79	14.31	0.49
	1270-1350	99.34	0.46	0.14
	1300-1350	99.31	0.61	0.041
	1350-1400	75.14	23.94	0.66
Biosensor 3	1270-1400	95.32	3.32	1.04
	1270-1350	99.102	0.72	0.14
	1300-1350	99.35	0.59	0.01
	1350-1400	94.24	5.10	0.28
Biosensor 4	1270-1400	85.74	13.31	0.81
	1270-1350	96.153	3.57	0.19
	1300-1350	95.89	3.95	0.08
	1350-1400	76.75	23.04	0.17
Biosensor 5	1270-1400	84.73	13.17	1.87
	1270-1350	87.36	12.24	0.207
	1300-1350	95.62	4.01	0.18
	1350-1400	85.35	14.12	0.43



# Bibliografía

- [1] A. D. L. Rosa, S. Velázquez, S. Garcilazo, E. Baraballe, and H. Giménez, “Accidente cerebrovascular,” Benos Aires: Ministerio de salud, Unidad de gestión de programas, 2017.
- [2] C. Iadecola and M. Alexander, “Cerebral ischemia and inflammation,” Current opinion in neurology, vol. 14, no. 1, pp. 89–94, 2001.
- [3] M. Zhang, Q. Liu, H. Meng, H. Duan, X. Liu, J. Wu, F. Gao, S. Wang, R. Tan, and J. Yuan, “Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets,” Signal Transduction and Targeted Therapy, vol. 9, no. 1, p. 12, 2024.
- [4] J. E. Anttila, O. S. Mattila, H. K. Liew, K. Mätlik, E. Mervaala, P. Lindholm, M. Lindahl, P. J. Lindsberg, K. Y. Tseng, and M. Airavaara, “Manf protein expression is upregulated in immune cells in the ischemic human brain and systemic recombinant manf delivery in rat ischemic stroke model demonstrates anti-inflammatory effects,” Acta Neuropathologica Communications, vol. 12, no. 1, p. 10, 2024.
- [5] D. Tao, X. Xia, X. Zhang, R. Yang, Y. Yang, L. Zhang, Y. Shi, D. Lv, P. Chen, B. He, and Z. Shen, “Integrated network pharmacology, molecular docking and pharmacodynamic study reveals protective effects and mechanisms of corilagin against cerebral ischemia-induced injury,” Experimental Neurology, vol. 374, p. 114697, 2024.
- [6] A. Ye, W. Li, L. Zhou, L. Ao, W. Fang, and Y. Li, “Targeting pyroptosis to regulate ischemic stroke injury: Molecular mechanisms and preclinical evidences,” Brain Research Bulletin, vol. 165, p. 146 – 160, 2020.
- [7] S. Suzuki, K. Tanaka, and N. Suzuki, “Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects,” Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, vol. 29, no. 3, pp. 464–479, 2009.
- [8] N. Montoya Fraga et al., “Evaluación morfológica y funcional de los efectos neuroprotectores del estradiol contra el daño cerebral inducido por hipoperfusión cerebral crónica, en ratas,” 2016.
- [9] L. Yaoa, J. Haob, YueWangc, H. Jid, and X. Zhange, “Estradiol on brain pathological changes in ovariectomized rats with chronic cerebral ischemia,” Revista Argentina de Clínica Psicológica, vol. 29, no. 4, p. 906, 2020.
- [10] F. L. Huerta, G. B. Perez, and R. P. Merino, “Fiber optic sensors for the ph measurement based on the absorption of the evanescent wave,” Optics InfoBase Conference Papers, 10 2005.
- [11] G. Beltrán-Pérez, F. López-Huerta, S. Muñoz-Aguirre, J. Castillo-Mixcóatl, R. Palomino-Merino, R. Lozada-Morales, and O. Portillo-Moreno, “Fabrication and characterization of an optical fiber ph sensor using sol-gel deposited tio2 film doped with organic dyes,” Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 120, no. 1, pp. 74–78, 2006.

- [12] R. Delgado-Macuil, K. González-León, and G. Beltrán-Pérez, “Neurotrophin (ng2) detection in the brain tissue of a murine model using long period fiber grating (lpfg),” Optics & Laser Technology, vol. 139, p. 106972, 2021.
- [13] V. Epitacio-Reyes, G. Beltrán-Pérez, S. Muñoz-Aguirre, and J. Castillo-Mixcoatl, “Long period fiber gratings to detect organic vapor,” Frontiers in Optics 2010/Laser Science XXVI, p. JTUA13, 2010.
- [14] J. Rodríguez-Garciapiña, G. Beltrán-Pérez, J. Castillo-Mixcoatl, and S. Muñoz-Aguirre, “Application of the principal components analysis technique to optical fiber sensors for acetone detection,” Optics & Laser Technology, vol. 143, p. 107314, 2021.
- [15] K. González-León, G. Beltrán-Pérez, S. Muñoz-Aguirre, V. López-Gayou, J. Castillo-Mixcoatl, V. Alatraste, and R. Delgado-Macuil, “Experimental characterization of a biosensor based on a tapered optical fiber for kisspeptin detection,” Applied Optics, vol. 59, no. 13, pp. D131–D137, 2020.
- [16] E. T. Ramírez and A. M. Albores, “Biosensores enzimáticos,” Revista Digital Universitaria, vol. 15, pp. 1–8, 11 2014.
- [17] S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O’Kennedy, “Antibodies and antibody-derived analytical biosensors,” Essays in biochemistry, vol. 60, no. 1, pp. 9–18, 2016.
- [18] L. Shuhan, Z. Wu, X. Shi, and Q. Wu, “Optical fiber biosensors for protein detection: A review,” Photonics, vol. 9, p. 987, 2022.
- [19] F. Galeotti, M. Pisco, and A. Cusano, “Self-assembly on optical fibers: A powerful nanofabrication tool for next generation ”lab-on-fiber” optodes,” Nanoscale, vol. 10, pp. 22673–22696, 11 2018.
- [20] R. N. Ondarza, Biología Moderna. Trillas, 12a ed., 2017.
- [21] A. O. Ramírez, R. Delgado-Macuil, M. Rojas-López, V. L. Gayou, and A. O. Díaz, “Self-assembled monolayer as optical transducers using spiropyran photochromic material,” Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, vol. 8011, p. 80111W, 08 2011.
- [22] A. Ortiz-Ramírez, P. Zaca-Moran, E. Jaramillo-Flores, A. Orduña-Díaz, O. Zaca-Moran, V. Gayou, and R. Delgado-Macuil, “Homogenization of self-assembled optical transducer using spiropyran polymer,” Current Analytical Chemistry, vol. 11, no. 3, pp. 159–167, 2015.
- [23] D. R. Walt, “Fiber optic array biosensors,” BioTechniques, vol. 41, pp. 529, 531, 533, 12 2006.
- [24] W. Xu-dong and O. Wolfbeis, “Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2015-2019),” Analytical Chemistry, vol. 2019, pp. 1–51, 10 2019.
- [25] W. Yu, T. Lang, J. Bian, and W. Kong, “Label-free fiber optic biosensor based on thin-core modal interferometer,” Sensors and Actuators, B: Chemical, vol. 228, p. 322 – 329, 2016.
- [26] X. Zhang, B. Liu, H. Zhang, X. Zhang, B. Song, J. Wu, and S. Duan, “Label-free detection of dna hybridization utilizing dual s-tapered thin-core fiber interferometer,” Journal of Lightwave Technology, vol. 37, no. 11, p. 2762 – 2767, 2019.
- [27] S. Cao, R. Chen, Q. Yang, X. He, F. Chiavaioli, Y. Ran, and B.-O. Guan, “Point-of-care diagnosis of pre-eclampsia based on microfiber bragg grating biosensor,” Biosensors and Bioelectronics, vol. 249, p. 116014, 2024.

- [28] Z. Wang, J. Hefflin, K. V. Cott, R. H. Stolen, S. Ramachandran, and S. Ghalmi, “Biosensors employing ionic self-assembled multilayers adsorbed on long-period fiber gratings,” Sensors and Actuators, B: Chemical, vol. 139, no. 2, p. 618 – 623, 2009.
- [29] T. M. Battaglia, J.-F. Masson, M. R. Sierks, S. P. Beaudoin, J. Rogers, K. N. Foster, G. A. Holloway, and K. S. Booksh, “Quantification of cytokines involved in wound healing using surface plasmon resonance,” Analytical Chemistry, vol. 77, no. 21, pp. 7016–7023, 2005.
- [30] S. Shi, Q. Nie, S. Jiang, S. Wu, B. Tang, and M. Zhao, “Biosensor based on dual-resonance long-period fiber gratings for detection of h9n2 subtype avian influenza virus,” Guangxue Xuebao/Acta Optica Sinica, vol. 42, no. 1, 2022.
- [31] H. S. Haddock, P. Shankar, and R. Mutharasan, “Evanescence sensing of biomolecules and cells,” Sensors and Actuators, B: Chemical, vol. 88, no. 1, p. 67 – 74, 2003.
- [32] E. Ramírez-Sánchez, S. Muñoz-Aguirre, J. Castillo-Mixcóatl, K. González-León, M. Rodríguez-Torres, L. Hernández-Guerrero, and G. Beltrán-Pérez, “A comparative study between pcr and pls in a tapered optical fiber sensor for acetone detection,” Optics & Laser Technology, vol. 181, p. 111838, 2025.
- [33] B. E. A. Saleh and M. C. Teich, Fundamentals of photonics. John Wiley & sons, second ed., 2019.
- [34] V. Bhardwaj, K. Kishor, and A. C. Sharma, “Tapered optical fiber geometries and sensing applications based on mach-zehnder interferometer: A review,” Optical Fiber Technology, vol. 58, p. 102302, 2020.
- [35] H. Kandori, “History and perspectives of light-sensing proteins,” in Optogenetics (H. Yawo, H. Kandori, and A. Koizumi, eds.), pp. 3–16, Tokyo: Springer, 2015.
- [36] S. Bandyopadhyay, P. Biswas, F. Chiavaioli, T. K. Dey, N. Basumallick, C. Trono, A. Giannetti, S. Tombelli, F. Baldini, and S. Bandyopadhyay, “Long-period fiber grating: a specific design for biosensing applications,” Applied Optics, vol. 56, no. 35, pp. 9846–9853, 2017.
- [37] S. W. James, S. Korposh, S.-W. Lee, and R. P. Tatam, “A long period grating-based chemical sensor insensitive to the influence of interfering parameters,” Optics Express, vol. 22, no. 7, pp. 8012–8023, 2014.
- [38] N. Jackson, “Principles of interferometry,” Jets from Young Stars II: Clues from High Angular Resolution Observations, pp. 193–218, 2008.
- [39] L. Hernández-Guerrero, J. Castillo-Mixcóatl, S. Muñoz-Aguirre, M. Rodríguez-Torres, E. Ramírez-Sánchez, and G. Beltrán-Pérez, “Projection to latent structures regression and its application to mach-zehnder interferometer optical fiber sensors for acetone detection,” Optics and Lasers in Engineering, vol. 184, p. 108689, 2025.
- [40] L. I. Smith, “A tutorial on principal components analysis,” tech. rep., Cornell University, USA, February 26 2002.
- [41] J. Shlens, “A tutorial on principal component analysis,” CoRR, vol. abs/1404.1100, 2014.
- [42] S. I. G. S., Álgebra Lineal. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., sexta ed., 2008.
- [43] S. Ghosh, A. Dasgupta, and A. Swetapadma, “A study on support vector machine based linear and non-linear pattern classification,” p. 24 – 28, 2019.
- [44] C. J. Burges, “A tutorial on support vector machines for pattern recognition,” Data mining and knowledge discovery, vol. 2, no. 2, pp. 121–167, 1998.

- [45] H. Han and X. Jiang, "Overcome support vector machine diagnosis overfitting," Cancer informatics, vol. 13, pp. 145–158, 2014.
- [46] O. Montes-Narváez, M. García-Juárez, G. Beltrán-Pérez, C. Espinosa-García, O. González-Flores, and R. J. Delgado-Macuil, "Atr-ftir spectroscopy to evaluate serum protein expression in a murine cerebral ischemia model," Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, vol. 326, p. 125261, 2025.
- [47] X. Fu, P. Lu, W. Ni, H. Liao, D. Liu, and J. Zhang, "Phase demodulation of interferometric fiber sensor based on fast fourier analysis," Optics Express, vol. 25, no. 18, p. 21094 – 21106, 2017.
- [48] K. González-León, R. Delgado-Macuil, B. Vertti-Cervantes, S. Muñoz-Aguirre, J. Castillo-Mixcóatl, M. García-Juárez, O. Montes-Narvaez, E. Ramírez-Sánchez, and G. Beltrán-Pérez, "Application of support vector machine technique to optical fiber biosensors for neuroprotector (il-10) detection in serum samples of murine model," Optics & Laser Technology, vol. 186, p. 112629, 2025.