



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
ELÉCTRICA – INSTRUMENTACIÓN

DESARROLLO DE UN SENSOR ÓPTICO PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO DE  
TUBERCULOSIS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
MILDRED SOCORRO CANO VELÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. JUAN ARNALDO HERNÁNDEZ CORDERO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM)

COMITÉ TUTOR  
DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA (CFATA)  
DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE  
FACULTAD DE CIENCIAS (FC)

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Augusto García Valenzuela  
Secretario: Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille  
1 er. Vocal: Dr. Juan Arnaldo Hernández Cordero  
2 do. Vocal: Dra. Luz María López Marín  
3 er. Vocal: Dr. Gabriel Eduardo Sandoval Romero

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), UNAM, Ciudad de México, México  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), UNAM, Querétaro, México  
University of California, Riverside (UCR), California, USA

**TUTOR DE TESIS:**

DR. JUAN ARNALDO HERNÁNDEZ CORDERO

-----  
**FIRMA**

*(Segunda hoja)*

*'Creo que todos tenemos un poco de esa bella locura que nos mantiene andando  
cuando todo alrededor es insanamente cuerdo'*

***Julio Cortázar***

*Versión original 22-01-2020*

*Versión revisada y corregida 28-05-2020*



# Agradecimientos



# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>v</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Tuberculosis: un problema de salud a nivel mundial . . . . .	1
1.2. En búsqueda de un diagnóstico eficiente de tuberculosis . . . . .	4
1.3. Inmunosensores para detección de tuberculosis . . . . .	7
1.3.1. Inmunosensores interferométricos Fabry-Pérot de fibra óptica .	9
1.4. Objetivo y propuesta . . . . .	11
<b>2. Polidimetilsiloxano (PDMS) con lípidos bioactivos como plataforma de inmunosensado</b>	<b>13</b>
2.1. Selección del complejo inmune y del sustrato a funcionalizar . . . . .	13
2.2. Obtención y caracterización de los lípidos bioactivos . . . . .	16
2.3. Caracterización de los anticuerpos específicos contra los lípidos bioactivos	18
2.4. Despliegue del complejo inmune en la plataforma de bioreconocimiento	21
2.5. Optimización y reutilización de la plataforma de bioreconocimiento .	23
<b>3. Desarrollo de un instrumento de inmunosensado basado en un Fabry-Pérot de fibra óptica (FPI-FO)</b>	<b>27</b>
3.1. Principio de operación . . . . .	28
3.2. Diseño y desarrollo del instrumento de inmunosensado . . . . .	29
3.2.1. Instrumentación virtual . . . . .	32
3.2.2. Análisis del patrón de interferencia . . . . .	33



3.3. Caracterización del instrumento de inmunosensado . . . . .	35
3.3.1. Comparación teórica-experimental . . . . .	35
3.3.2. Mediciones previas al inmunoensayo . . . . .	38
3.4. Resultados: Utilización del instrumento para el inmunosensado de anticuerpos asociados con tuberculosis . . . . .	42
3.4.1. Protocolo experimental para el inmunoensayo . . . . .	42
3.4.2. Comparación de la respuesta de las diferentes etapas del inmunoensayo . . . . .	46
3.4.3. Resultados del inmunoensayo para las diferentes muestras analizadas . . . . .	49
3.5. Evaluación del instrumento de inmunosensado como posible herramienta de diagnóstico de TB . . . . .	51
<b>4. Desarrollo de un inmunosensor FPI-FO en la punta de la fibra óptica</b>	<b>55</b>
4.1. Diseño y desarrollo del inmunosensor . . . . .	57
4.1.1. Instrumentación virtual . . . . .	58
4.1.2. Análisis del patrón de interferencia . . . . .	60
4.2. Fabricación y caracterización del inmunosensor . . . . .	62
4.2.1. Fabricación del sensor . . . . .	62
4.2.2. Comparación teórica-experimental . . . . .	67
4.2.3. Mediciones previas al inmunoensayo . . . . .	72
4.3. Resultados: Utilización del sensor para el inmunosensado de anticuerpos asociados con tuberculosis . . . . .	74
4.3.1. Protocolo experimental para el inmunoensayo . . . . .	74
4.3.2. Funcionalización del inmunosensor . . . . .	77
4.3.3. Resultados del inmunoensayo para las diferentes muestras analizadas . . . . .	78
4.4. Evaluación del inmunosensor como posible herramienta de diagnóstico de TB . . . . .	82
<b>5. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>87</b>

---

A. Protocolo para la realización del inmunoensayo enzimático (ELISA)	95
B. Solución amortiguadora de $pH = 3$ , $0.1M$	99
C. Protocolo de fijación de muestras biológicas con formalina	101
D. Otras aplicaciones del <i>Milmetrix</i>	103
E. Programas desarrollados	109
F. Productos: presentaciones y artículos.	117



# Índice de figuras

1.1. Esquema de la unión específica entre el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ac) y el ELISA directo. . . . .	6
1.2. Principio de operación del sistema de BLI. . . . .	10
2.1. TLC en dos dimensiones para la caracterización de los lípidos antigénicos purificados de <i>Mycobacterium fortuitum</i> . . . . .	17
2.2. Caracterización de los anticuerpos contra antígenos lipídicos provenientes de suero control ( $S_P$ ) e hiper-inmune ( $S_H$ ) a diferentes diluciones. . . . .	20
2.3. Detección de uniones antígeno-anticuerpo en PDMS: (a) para diferentes concentraciones de antígeno, manteniendo 1 : 100 como dilución sérica y (b) para diferentes diluciones de suero, manteniendo la concentración de antígeno depositada en $64(\mu g/100\mu L)$ . . . . .	23
2.4. Relación de señal a ruido, $SNR = DO_{SH}/DO_{SP}$ , calculada para tres ensayos ELISA consecutivos utilizando el mismo recubrimiento antigénico en PDMS. . . . .	26
3.1. Esquema básico del sistema de inmunosensado propuesto. . . . .	28
3.2. Implementación del <i>Milmetrix</i> : instrumento de inmunosensado basado en el esquema básico de un FPI-FO. . . . .	30
3.3. Método de fabricación de las membranas de PDMS. . . . .	31
3.4. Imágenes de la implementación del <i>Milmetrix</i> . . . . .	31
3.5. Esquema de las funciones físicas y virtuales que realiza el <i>Milmetrix</i> . . . . .	33

3.6. Comparación de la respuesta teórica (izquierda) y experimental (derecha) de la FFT del patrón de interferencia de un FPI de dos superficies reflejantes. . . . .	36
3.7. Comparación de la distancia entre la FO y el portamuestras, entre la indicada en las platinas motorizadas ( $L_{0,medida}$ ) y la calculada por medio del análisis de la FFT del interferograma ( $L_{0,calculada}$ ). . . . .	37
3.8. Representación de los experimentos realizados para la caracterización de los portamuestras y membranas de PDMS. . . . .	38
3.9. Comparación del comportamiento del camino óptico para el mismo portamuestras <b>modificando</b> $L_0$ y manteniendo la misma posición de lectura. . . . .	39
3.10. Comparación del comportamiento del camino óptico para el mismo portamuestras en <b>distintos puntos</b> a la misma separación entre FO y portamuestras ( $L_0 = 1.32mm$ ). . . . .	40
3.11. Comparación del comportamiento del camino óptico cuando la luz interactúa con una membrana de PDMS, <b>modificando</b> $L_0$ , en la misma posición de lectura. . . . .	41
3.12. Comparación del comportamiento del camino óptico cuando la luz interactúa con una membrana de PDMS en <b>distintos puntos</b> a la misma separación ( $L_0 = 1.32mm$ ). . . . .	41
3.13. Protocolo para la realización del inmunoensayo con el sistema de inmunosensado desarrollado . . . . .	43
3.14. Comparación del comportamiento del camino óptico en la plataforma de bioreconocimiento para los distintos casos de la Tabla 3.1, al evaluar suero hiper-inmune ( $S_H$ ), a una distancia de $L_0 = 1.32mm$ . . . . .	47
3.15. Comparación de la FFT que se obtiene de los interferogramas generados en la plataforma de bioreconocimiento para los distintos casos de la Tabla 3.1, al evaluar suero hiper-inmune ( $S_H$ ), a diferentes distancias entre la FO y la membrana de PDMS. . . . .	48

3.16. Comparación de la respuesta para la plataforma bloqueada (caso 4 de la Tabla 3.1) y con suero (caso 5 de la Tabla 3.1) de los inmunoensayos, realizados con una plataforma sin funcionalización ( $S_{SA}$ ) y plataformas funcionalizadas para el reconocimiento de anticuerpos en suero preinmune ( $S_P$ ) e hiper-inmune ( $S_H$ ). . . . .	50
4.1. Esquema básico del inmunosensor propuesto. . . . .	56
4.2. Diagrama experimental para la fabricación del sensor 'End-TB'. . . . .	59
4.3. Esquema de las funciones físicas y virtuales que realiza el arreglo experimental utilizado para la fabricación de los sensores End-TB. . . . .	60
4.4. Análisis del corrimiento espectral de los patrones de interferencia para cuantificar los cambios en la superficie del sensor. . . . .	61
4.5. Obtención de los mapas de colores para la visualización de la evolución temporal del patrón de interferencia. . . . .	62
4.6. Patrones de interferencia obtenidos durante el proceso de deposición del polímero en la punta de una fibra óptica. . . . .	63
4.7. (a) Imagen de uno de los sensores fabricados, indicando la medición de la altura $L_0$ . (b) Curva teórica del FSR en función del tamaño de la cavidad FP, así como el valor experimental medido del patrón de interferencia y el calculado considerando la $L_0$ medida de las imágenes adquiridas. . . . .	64
4.8. Patrones de interferencia durante el proceso de curado de la capa polimérica. . . . .	66
4.9. Simulación de la respuesta espectral para un sensor con una capa polimérica de $L_0 = 33.4\mu m$ cuando el SRI ( $n_2$ ) va de 1.3 a 1.5. . . . .	68
4.10. Respuesta teórica general de los sensores fabricados: Evolución del ER en función del SRI. . . . .	69
4.11. Respuesta espectral para tres sensores antes y después de ser sumergidos en agua destilada. . . . .	70

4.12. Curva teórica y valores medidos de índice de refracción ( $SRI = n_2$ ) en función de $ER$ . . . . .	71
4.13. Evolución temporal del patrón de interferencia durante un proceso de incubación. . . . .	72
4.14. Protocolo para la realización del inmunoensayo con el sensor fabricado. . . . .	76
4.15. Respuesta espectral del sensor durante su funcionalización con lípidos antigénicos. . . . .	78
4.16. Corrimiento espectral del patrón de interferencia ( $\Delta\lambda$ ) del sensor desarrollado durante la evaluación de los diferentes casos a analizar (Tabla 4.1) . . . . .	79
5.1. Esquema que muestra el concepto general del proyecto "Ventanas al cerebro: <i>Windows to the Brain (WttB)</i> ". . . . .	93
D.1. Imagen y esquema de una muestra de grafeno óxidado reducido por grabado láser. . . . .	104
D.2. Patrón de interferencia y su FFT para una muestra de óxido de grafeno, antes y después de su reducción vía grabado láser. . . . .	105
D.3. Imagen y esquema de una muestra de una guía de onda de PDMS. . . . .	106
D.4. FFT de los patrones de interferencia adquiridos haciendo un escaneo sobre la guía de onda con pasos de $1\mu m$ . . . . .	107

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Tuberculosis: un problema de salud a nivel mundial

La tuberculosis (TB) es una enfermedad con alta repercusión en el mundo, ya que actualmente es una de las diez principales causas de mortalidad a nivel mundial; es de hecho la primer causa de muerte debida a un agente infeccioso, por encima del VIH/SIDA. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) revelan que, en el 2018, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.5 millones murieron debido a esta enfermedad. Además, la TB constituye una de las causas principales de muerte en personas infectadas por el VIH, ocasionando el 35 % de las defunciones en este grupo, lo cual representó 251,000 muertes de personas con VIH durante 2018 [1,2].

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa causada por el bacilo de la *Mycobacterium tuberculosis* y, si bien es una enfermedad que es curable y se puede prevenir, la verdadera preocupación es su alto índice de contagio. La manera en que se transmite esta infección es a través del aire y el contagio se ocasiona cuando una persona simplemente inhala algunos bacilos expulsados por un enfermo de tuberculosis al toser, escupir o estornudar. Debido a esta simplicidad en la transmisión, la cantidad de personas que tienen tuberculosis latente asciende a una cuarta parte de la población mundial (1.7 billones de personas), quienes tienen un 10 % de probabilidad de desarrollar esta enfermedad a lo largo de su vida [1,2].



El que los síntomas de la tuberculosis (tos, fiebre, pérdida de peso, etc.) sean leves por meses o fácilmente atribuidos a otros motivos, provoca que los enfermos acudan a recibir atención médica mucho tiempo después de desarrollar la enfermedad. Este tratamiento no oportuno ocasiona que el enfermo de tuberculosis pueda contagiar de 10 a 15 personas a lo largo de un año [1]. Esto, junto con el gran porcentaje de la población portador del bacilo tuberculoso, provee a la tuberculosis su naturaleza altamente contagiosa y la posiciona como una enfermedad cuyo combate es prioritario a nivel mundial [1, 2]. En este sentido, al ser una enfermedad que es curable, las estrategias que se han desarrollado para el control de la tuberculosis han apostado por el diagnóstico eficiente como uno de sus pilares principales. Prueba de su importancia es que, de 2000 a 2018, 58 millones de personas fueron curadas de esta enfermedad mediante el diagnóstico y tratamiento oportuno [1, 2].

Actualmente existen dos técnicas principales de diagnóstico para la tuberculosis. La más antigua, con más de 145 años de uso y utilizada comúnmente hasta la fecha, es el cultivo rutinario de esputo. Esta técnica consiste en un examen de laboratorio que busca identificar a los microorganismos que causan la tuberculosis a través de analizar una muestra de esputo. Esta muestra se obtiene de hacer que la persona tosa profundamente y escupa en un recipiente cualquier material que provenga del pulmón [3]. Seguido a ello, la muestra se coloca en un plato de cultivo y se observa si hay proliferación de la bacteria causante de la tuberculosis [4]. El otro método de diagnóstico de tuberculosis es la prueba cutánea con tuberculina. En ésta, a la persona se le aplica una inyección de tuberculina (antígeno de la tuberculosis) bajo la piel y, si hay linfocitos presentes debido a exposición previa con la tuberculosis, el cuerpo tendrá una respuesta inmune que se manifestará como una roncha en el sitio de inyección. El tamaño, color y forma de esta roncha es evaluado para determinar si el paciente es portador de tuberculosis latente [5].

A pesar de que estas técnicas están consolidadas como pruebas de diagnóstico para la tuberculosis, ambas presentan ciertas limitaciones. En el caso del cultivo de esputo, aunque es considerada una prueba sencilla y de bajo costo, la prueba puede tardar varias semanas para generar una multiplicación bacteriana detectable. Además de que,

al no ser una prueba muy sensible, se necesitan de hasta tres muestras independientes para la confirmación del diagnóstico [6]. Por su parte, en la prueba cutánea con tuberculina, la lectura es subjetiva y el resultado positivo del examen cutáneo no siempre significa que una persona tenga tuberculosis activa, por lo que se tiene que hacer el cultivo rutinario de esputo para verificar la existencia de la enfermedad en el paciente [7]. En ambos casos, las dificultades que presentan estas técnicas implican un tiempo largo de espera para otorgar un diagnóstico al paciente, fomentando así la transmisión continua y una mayor morbilidad de la enfermedad. Sumado a ello, ambas pruebas deben efectuarse en laboratorios especializados (que cuenten con complejos sistemas de bioseguridad) y estar a cargo de personal capacitado, lo cual representa el uso de infraestructuras costosas, tanto de instalar como de mantener [1,2].

Debido a lo anterior, el cultivo de esputo y la prueba cutánea con tuberculina no proporcionan un diagnóstico eficiente, lo cual deriva en la detección de tan solo la mitad de los casos de tuberculosis a nivel mundial. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud ha enfatizado en la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico que representen una mejor opción ante los habituales [1,2]. Como ejemplo, en 2010 la OMS recomendó por primera vez el empleo de la prueba rápida *Xpert MTB/RIF*, la cual detecta de forma simultánea la tuberculosis y la resistencia farmacológica a esta enfermedad [1,2]. Esta prueba, mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), realiza la amplificación del ácido nucleico de forma automatizada e identifica secuencias de ácido nucleico específicas del genoma de tuberculosis a partir de muestras de esputo sin procesar [8]. Esta prueba brinda un diagnóstico rápido, en menos de 2 horas, y certero que permite iniciar el tratamiento apropiado de inmediato, combatiendo con ello la dificultad de los tiempos de espera y los falsos diagnósticos de las pruebas habituales. Sin embargo, este sigue siendo un método costoso, en donde el equipo de lectura más básico tiene un precio con descuento <sup>1</sup> que oscila entre los 17000 dólares [8], y diez cartuchos desechables de prueba cuestan aproximadamente 1200 dólares y son desechables [9].

---

<sup>1</sup>Descuento 50% en los instrumentos de diagnóstico y 75% en los reactivos para países en desarrollo o que tienen un gran número de enfermos de TB.

## 1.2. En búsqueda de un diagnóstico eficiente de tuberculosis

Como ya se ha mencionado, la existencia de pocas herramientas para el diagnóstico de tuberculosis junto con las limitantes que éstas presentan, conforman un problema al no propiciar un diagnóstico eficiente que constituya una base sólida para tratar y controlar los casos de esta enfermedad. En ese sentido, la OMS ha manifestado que el desarrollo de pruebas eficientes para el diagnóstico de la tuberculosis debe basarse en buscar cumplir con siete requerimientos [2, 10]:

1. Accesibilidad para las personas en riesgo de infección.
2. Sensibilidad adecuada, con pocos falsos negativos.
3. Especificidad, con pocos falsos positivos.
4. Uso y realización fácil, con requerimientos mínimos de capacitación.
5. Rapidez, para permitir el tratamiento oportuno.
6. Mínimos requerimientos (equipo y consumibles) para las pruebas.
7. Alta disponibilidad.

Tomando esto en cuenta, el desarrollo de los componentes de una plataforma que funcione como prueba de diagnóstico ASSURED<sup>2</sup> para la tuberculosis es de gran interés; no únicamente para solventar este problema de salud mundial, sino de cara a establecer un esquema de prueba generalizado que pueda diagnosticar enfermedades de índole similar, como la malaria, el dengue y la sífilis. Sin embargo, el conseguir una prueba que cumpla con todos estos requerimientos es una tarea bastante compleja, tanto que hasta la fecha no existe una técnica que lo haga. Esto se debe en gran medida a que es difícil hallar un equilibrio entre el costo, grado de complejidad, rapidez, riesgo biológico, y fiabilidad al momento de desarrollar este tipo de herramientas de diagnóstico [2].

---

<sup>2</sup>ASSURED por las siglas en inglés de los siete puntos descritos: Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid, Equipment-free, Delivered

De manera particular, la falta de este equilibrio en las principales técnicas utilizadas actualmente para el diagnóstico de tuberculosis (resumido en la Tabla 1.1) genera una creciente necesidad de buscar nuevas técnicas de diagnóstico que permitan mejorar las limitaciones que estos métodos de diagnóstico presentan. Dado esto, la OMS ha sugerido que el desarrollo de nuevas técnicas de inmunodiagnóstico, la miniaturización de los procesos convencionales y la no utilización de marcadores son factores fundamentales a tomar en cuenta en esta búsqueda [2]. En vías de satisfacer estos requerimientos, los inmunosensores han tomado gran importancia en los últimos años en el diagnóstico y detección de múltiples enfermedades y especies, ya que siguen esta sugerencia al mantener las ventajas del inmunodiagnóstico tradicional pero en sistemas que miniaturizan los procesos realizados en laboratorios clínicos, y en algunos casos sin la necesidad de utilizar marcadores [11].

<b>Diagnóstico por:</b>	<b>Costo</b>	<b>Complejidad</b>	<b>Rapidez</b>	<b>Riesgo</b>	<b>Fiabilidad</b>
Cultivo rutinario	Bajo	Media	Baja	Medio	Media
Tuberculina	Bajo	Baja	Baja	Bajo	Baja
Xpert MTB/RIF	Alto	Alta	Alta	Medio	Alta

Tabla 1.1: Comparación de las características de las técnicas actuales

Si bien, los inmunosensores podrían tener un gran potencial para el diagnóstico de TB, es importante primeramente entender qué es el inmunodiagnóstico. Un anticuerpo (Ac) es una proteína que es producida por el sistema inmune del cuerpo cuando éste detecta alguna sustancia dañina, llamada antígeno (Ag). Los ejemplos de antígenos abarcan microorganismos (tales como bacterias, hongos, parásitos y virus) y químicos. Cuando el Ac y Ag se unen, se dice que se ha producido una reacción inmunológica, la cual es altamente específica y representa el principio de cualquier técnica inmunológica [12], incluyendo el inmunodiagnóstico. La mayoría de las técnicas de inmunodiagnóstico se basan en la detección de uniones de anticuerpos específicos, contenidos en plasma o suero, con el respectivo antígeno propio de la enfermedad a diagnosticar. En este caso, si el sujeto ha estado expuesto a la enfermedad, habrá presencia de anticuerpos, por lo que habrá detección de uniones que formen los complejos Ag-Ac [6].

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) es un ejemplo de este tipo de técnicas, el cual se ha utilizado para el diagnóstico de varias enfermedades, incluyendo la detección de VIH. El ELISA directo es el ensayo ELISA más simple y rápido de todos, en donde un anticuerpo marcado con una enzima, ligada a un colorante, se une directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y cuantificación del mismo. Para poder identificar la presencia de las uniones Ag-Ac, es necesario agregar una sustancia auxiliar (sustrato), la cual al interactuar con la enzima de los anticuerpos adheridos al antígeno, produce una reacción colorimétrica. De esta manera, la solución de la prueba se torna de una tonalidad colorimétrica que es dependiente de la cantidad de complejos específicos formados [13]. En la Fig. 1.1 se muestra el esquema de la formación de la unión específica Ag-Ac y del principio de operación del ELISA directo para la detección y cuantificación de antígenos por medio de anticuerpos marcados como reactivo.

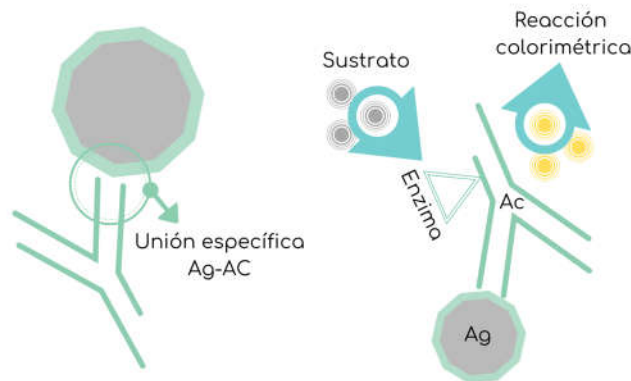


Figura 1.1: Esquema de la formación de la unión específica Ag-Ac y del principio de operación del ELISA directo para la detección y cuantificación de antígenos.

En el caso particular de la TB, en los años ochentas el ELISA se intentó introducir como técnica para la detección de tuberculosis activa, aunque su uso no pudo generalizarse como el de las técnicas descritas previamente. Esto se debió a que el ELISA tiene diversas dificultades en aplicaciones a gran escala, entre ellas: la necesidad de grandes cantidades de muestras, un procedimiento de múltiples etapas pobremente adecuado para escalas grandes, costos altos debido al uso de marcadores enzimáticos, equipo especializado y la necesidad de personal capacitado [14].

Para dar solución a algunas de estas dificultades, en los últimos años se ha buscado miniaturizar ésta y otras pruebas de inmunodiagnóstico, con apoyo de los microdispositivos y micro-tecnología, para formar una alternativa prometedora que facilite a los pacientes el acceso a estas herramientas y así ofrecer sistemas automatizados que provean a la persona una lectura de diagnóstico en cualquier lugar en el que se encuentre. Para el desarrollo de estas plataformas POC (Point-Of-Care) de inmunodiagnóstico, los inmunosensores han representado una solución prometedora [6, 11, 15–20].

### 1.3. Inmunosensores para detección de tuberculosis

Los inmunosensores son dispositivos biosensores basados en la afinidad y especificidad de las interacciones entre antígenos y anticuerpos. El principio de operación de los inmunosensores está basado en la detección de la reacción inmuno-química que se genera de forma específica cuando interactúan anticuerpos/antígenos suspendidos en una muestra (por ejemplo, sangre u orina) con antígenos/anticuerpos inmovilizados en un transductor [21]. Debido a la capacidad de sensar la dinámica de reacción de la unión antígeno-anticuerpo y a la mejora en la sensibilidad y la selectividad, en comparación con biosensores basados en otros mecanismos, el desarrollo de inmunosensores ha crecido drásticamente en las últimas décadas [22, 23]. Con el rápido desarrollo de reactivos inmunológicos y equipos de detección, la gama de sustancias y compuestos que se han podido identificar y cuantificar con los inmunosensores ha sido cada vez mayor. Esto, aunado a los avances en el desarrollo de sistemas fáciles de usar, económicos, confiables, con límites de detección reducidos y sensibilidades aumentadas, ha hecho que estos dispositivos incursionen ampliamente en análisis clínico, teniendo el potencial suficiente para revolucionar las técnicas convencionales de inmunodiagnóstico [22, 23].

Los inmunosensores, al igual que cualquier biosensor, de forma general constan de tres elementos fundamentales: el elemento biológico de reconocimiento, un transductor físico-químico, y una parte electrónica. En el caso de estos sensores, un complejo antígeno-anticuerpo sirve como elemento de reconocimiento. Este complejo es integra-

do o asociado al transductor con el objetivo de que este último permita transformar la respuesta física-química del bioreconocimiento en una señal eléctrica u óptica. Finalmente, la parte electrónica es usada para la detección y análisis de la señal obtenida por el transductor [24]. La literatura sugiere que un inmunosensor *ideal* debe cumplir con ciertas especificaciones: la habilidad para detectar antígenos o anticuerpos (según sea el caso), la capacidad de transformar los eventos de unión sin agregar agentes adicionales, el que permita repetir mediciones con el mismo dispositivo y la capacidad de detectar uniones específicas de antígeno-anticuerpo en muestras reales [21].

A pesar de que todos los inmunosensores se basan en reacciones inmunológicas, para detección de tuberculosis se han explorado inmunosensores que se basan en distintas técnicas de transducción, las cuales se engloban en la Tabla 1.2.

<b>Transductor</b>	<b>Técnica/Principio</b>
Electroquímico	Mediciones de potencia eléctrica Mediciones de corriente eléctrica Mediciones de impedancia
Basado en masa	Piezoeléctrico Magneto-elástico
Magnético	Resonancia magnética nuclear
Óptico	Espectroscopía Colorimetría Fotoluminiscencia Resonancia plasmónica de superficie (SPR) Quimiluminiscencia Fluorimetría

Tabla 1.2: Clasificación de los inmunosensores para detección de TB basado en el mecanismo de transducción [19, 25–29].

De entre todas estas técnicas, de forma general, los inmunosensores ópticos son los más utilizados para diagnóstico de múltiples enfermedades por ser de los más versátiles, siendo los dispositivos basados en SPR y en fibra óptica los más relevantes por proporcionar una detección libre de marcadores [21–23]. De forma particular, los inmunosensores ópticos que se han explorado para la detección de tuberculosis son los basados en: modificaciones en la onda evanescente [30], SPR (con muestras de sangre, esputo y orina) [29, 31], rejillas de difracción [32], espectroscopía de interferencia

reflectométrica [32] e interferometría en la punta de una fibra óptica [33]. A pesar de que todas estas técnicas son únicas en términos del complejo antígeno-anticuerpo a analizar, la especificidad y el procesamiento de las señales adquiridas, todas tienen en común que proporcionan una plataforma de sensado altamente sensible y libre de marcadores [29–33]. Sin embargo, los inmunosensores interferométricos basados en fibra óptica presentan ventajas adicionales como ser dispositivos *lab-on-tip* y requerimiento de muestras pequeñas, tanto para funcionalizar como para detectar [33].

### 1.3.1. Inmunosensores interferométricos Fabry-Pérot de fibra óptica

Los sensores interferométricos Fabry-Pérot (FPI, *Fabry-Pérot Interferometer*) de fibra óptica (FO), al ser versátiles y simples representan uno de los tipos de sensores de fibra óptica interferométricos de mayor uso y con mayor número de aplicaciones [34–36]. Los parámetros que se han podido sensar con estos dispositivos son numerosos, entre ellos: temperatura, vibración, presión, velocidad de flujo, humedad, concentración de gas, nivel de líquido, entre otros [34]. Sin embargo, estos sensores han destacado en la medición de índice de refracción ( $n$ ) y desplazamiento ( $L$ ), puesto que son los parámetros que están involucrados directamente con el camino óptico (*Optical Path*,  $OP = 2nL$ ) que experimenta la luz dentro de la cavidad que conforma el interferómetro. Este tipo de sensores se ha logrado implementar con diferentes métodos de fabricación como el micromaquinado, la fusión de fibras, el recubrimiento de la punta de la FO con algún material o la utilización de otro tipo de fibras ópticas (multimodo, de núcleo hueco o de cristal fotónico), por mencionar algunos [34]. La sencillez de su principio de operación, los múltiples parámetros que pueden monitorear y las diversos modos de implementación posibles, hacen que los sensores FPI-FO hayan incursionado en diversas ramas, siendo una de las destacables el inmunosensado [37].

Hasta la fecha, el único inmunosensor interferométrico en fibra óptica utilizado para el diagnóstico de tuberculosis es el basado en la Interferometría por Capa Biológica (BLI, *Bio-Layer Interferometry*) [33], la cual a su vez fundamenta su principio



de operación en un FPI-FO [38]. Sin embargo, este inmunosensor está destinado a la detección de tuberculosis renal, cuyo diagnóstico es diferente a la tuberculosis pulmonar abordada en este trabajo. Desde la introducción del primer sistema de BLI por la empresa *ForteBio* en 2005 hasta ahora, esta técnica ha tomado gran relevancia ya que con ella se ha podido monitorear eficientemente el proceso de asociación y disociación entre dos moléculas [39], la interacción específica de complejos antígeno-anticuerpo [40] y la subsecuente detección de anticuerpos en suero humano [41]. En esta técnica, el extremo de la fibra óptica es funcionalizada con una superficie biocompatible en la que se inmovilizan las moléculas a sensor. De esta manera la respuesta estará dada por dos interfaces, una entre la fibra óptica y la capa biocompatible, y una segunda entre esta última y la solución que se desea sensor. Cuando las moléculas se unen a la superficie del sensor, la segunda interface modifica sus características, cambiando con ello interferograma. Mediante el análisis del corrimiento espectral de los interferogramas, con y sin antígenos, el sistema BLI proporciona información respecto a estos eventos de unión (asociación-disociación), así como de la concentración de moléculas en la solución que se analiza [33,38]. En la Fig. 1.2 se muestra el principio de operación del sistema de BLI, así como ejemplos de las señales que se obtienen y su interpretación.

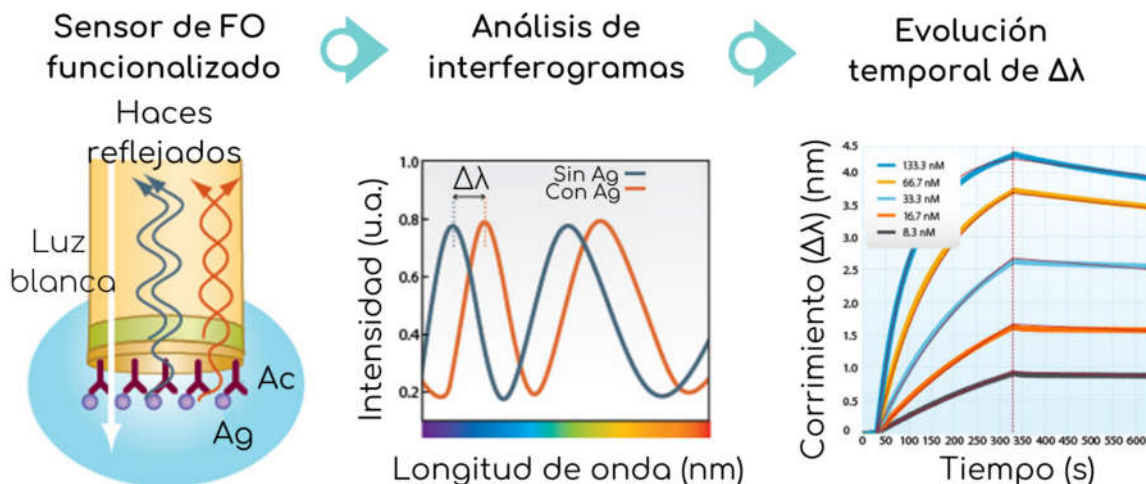


Figura 1.2: Principio de operación del sistema de BLI. El patrón de interferencia reflejado cambia debido a la formación de uniones antígeno-anticuerpo en la superficie del dispositivo, por lo que al analizar el corrimiento espectral del interferograma ( $\Delta\lambda$ ) es posible obtener información de estas uniones.

Las ventajas de la tecnología BLI son la detección sencilla, en tiempo real y sin marcadores. Por otro lado, la principal desventaja es que, para cada una de las especies que se deseen detectar, es necesario adquirir puntas funcionalizadas de manera diferente o hacer varias capas que auxiliien la unión. Además, las puntas deben conservarse en condiciones específicas para evitar su desfuncionalización, son desechables o difíciles de limpiar, elevando con ello el costo de esta técnica y disminuyendo su versatilidad [38]. A pesar de ello, considerando el avance que ha representado el desarrollo de esta tecnología en el diagnóstico para combatir TB renal y otras enfermedades, es evidente que el desarrollo e implementación de nuevos inmunosensores FPI-FO similares podría tener un gran impacto positivo en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar infecciosa.

## 1.4. Objetivo y propuesta

El objetivo general de este proyecto es el desarrollo e implementación de un inmunosensor FPI-FO que permitan el diagnóstico eficiente de la tuberculosis, tratando de subsanar las desventajas que presentan técnicas similares utilizadas actualmente. Siendo que ya se han estudiado diversos complejos antígeno-anticuerpo que han permitido el correcto diagnóstico de la TB [6], este proyecto se ha limitado a la utilización de uno de estos y se ha enfocado en tres objetivos particulares:

- La inmovilización del antígeno a utilizar en un material que permita la miniaturización de dispositivos inmunosensores de tipo FPI-FO.
- El desarrollo de inmunosensores FPI-FO basados en dos diferentes esquemas de sensado para hacer una comparación de su desempeño.
- La evaluación de los dispositivos desarrollados para concluir si son candidatos viables para el desarrollo de una nuevas herramientas que permitan el diagnóstico eficiente de la tuberculosis; así como determinar cuál de estos tiene mayor potencial para ello.

Para cumplir con estos objetivos se propone la inmovilización de glicolípidos en Polidimetilsiloxano (PDMS). El cóctel de glicolípidos a utilizar ha demostrado su gran potencial en el diagnóstico de tuberculosis [42] y el PDMS es de interés porque es el material más utilizado para el desarrollo de sensores miniaturizados debido a sus características [11, 43].

En cuanto a los esquemas de sensado a explorar en este proyecto, se propone implementar, como primera aproximación, un instrumento de inmunosensado basado en la configuración más simple de un FPI de FO [44], la cual consiste de una cavidad de aire formada entre el extremo de una fibra óptica y la superficie de la muestra a sensar. Y, para comparar con éste, se optó por el desarrollo de un inmunosensor que, al igual que con el único inmunosensor FPI-FO utilizado para diagnóstico de TB (BLI) [38], permita el inmunosensado en la punta de una fibra óptica. Este esquema propuesto de FPI de FO se basa en depositar una pequeña cantidad de polímero en la punta de una fibra óptica, para constituir una cavidad interferométrica FP [45]. Este último esquema se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sensores de diferentes parámetros físicos y químicos (índice de refracción de líquidos [45, 46], temperatura [47, 48], humedad [49], presión [50] y concentración [51]); sin embargo, su potencial como inmunosensor ha sido reportado en un solo trabajo [52]. La principal razón de la poca explotación de este tipo de dispositivos para inmunosensado es la complejidad en la inmovilización de antígenos o anticuerpos en los polímeros hasta ahora utilizados. En este sentido, el presente proyecto busca desarrollar un nuevo dispositivo que preserve las ventajas del inmunodiagnóstico óptico: ausencia de riesgo biológico, sencillez en la implementación, posibilidad de miniaturización y ser técnica sin marcadores, pero simplificando las técnicas de inmovilización utilizadas actualmente.

## Capítulo 2

# Polidimetilsiloxano (PDMS) con lípidos bioactivos como plataforma de inmunosensado

Tanto el instrumento de inmunosensado como el inmunosensor propuestos en este proyecto se basan en el esquema general de biosensado óptico, el cual consta de forma general de las etapas de bioreconocimiento, de transducción y de detección y análisis. En particular para este proyecto, en ambas propuestas se utilizará la plataforma de bioreconocimiento que se describe en este capítulo, la cual explota la inmovilización de lípidos bioactivos en el PDMS y podría ser utilizada como una plataforma general para el inmunosensado óptico de tuberculosis.

### 2.1. Selección del complejo inmune y del sustrato a funcionalizar

El interés en la utilización de lípidos bioactivos se debe a que estos son especialmente abundantes en las micobacterias, un género bacteriano que incluye el agente causal de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y a un centenar de especies que se encuentran en el medio ambiente [53,54]. Se sabe que una parte importante de los lípidos micobacterianos actúa como antígenos, y algunos de ellos se han propuesto

como reactivos de diagnóstico para buscar enfermedades micobacterianas a través de la búsqueda de anticuerpos específicos durante una infección [55]. En este sentido, para nuestros experimentos se purificó una mezcla de antígenos lipídicos extraídos de *Mycobacterium fortuitum*, la cual es una especie bacteriana utilizada previamente como fuente sustituta de antígenos para el diagnóstico de tuberculosis [56–58] y, a través de inoculaciones en conejos, se produjeron los anticuerpos anti-lípidos específicos.

En cuanto al sustrato seleccionado para la inmovilización de estos lípidos bioactivos, es bien sabido que los polímeros han tenido un gran interés en aplicaciones ópticas y fotónicas debido a que son materiales flexibles, con buenas propiedades mecánicas y ópticas, por lo que se optó por uno de los polímeros más utilizados para estas aplicaciones: el Polidimetilsiloxano (PDMS) [43]. El PDMS es un material polimérico ampliamente explorado en esta rama debido a que es ópticamente transparente y presenta baja dispersión óptica [59, 60]. Además, es un material de bajo costo, de fácil manejo, fácilmente moldeable, no tóxico, químicamente inerte, y no inflamable, por lo que su uso en laboratorio no tiene mayores implicaciones de seguridad o contraindicaciones que limiten su uso y ofrece un panorama amplio de técnicas de fabricación [11, 18, 43, 61–64]. Con todas estas ventajas, sumadas a que el PDMS es un material biocompatible y hemocompatible [43], es evidente el interés creciente en utilizar este polímero en el desarrollo de biosensores [18, 19].

Sin embargo, debido a que el PDMS tiene una hidrofobicidad alta [65] y a que la mayoría de los materiales biológicos utilizados en biosensores son moléculas hidrofílicas (células, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos o péptidos), varios métodos se han tenido que desarrollar para modificar el PDMS y promover la inmovilización de estas moléculas en este polímero, lo cual aumenta la complejidad de fabricación de biosensores. Por mencionar un ejemplo, el PDMS ha sido utilizado como sustrato para sensores miniaturizados de crecimiento celular, pero para que esto sea posible es necesario el uso de biomoléculas costosas, como las poli-L-lisina o fibronectina, que permiten la adhesión de las células al polímero [64, 66]. De forma alternativa, la funcionalización del PDMS mediante la unión de grupos aminos, que provean al polímero de segmentos hidrofílicos, también ha sido explorada para aplicaciones de biosensado

similares [20, 67, 68]. En contraste con la desventaja que representa la hidrofobicidad del PDMS para las herramientas convencionales (basadas en sistemas acuosos), el uso de este polímero tan versátil para la inmovilización de moléculas con total o parcial hidrofobicidad, como lo son las moléculas lipídicas, no había sido explorado hasta ahora. Es por ello que en este proyecto se exploró la inmovilización de lípidos bioactivos, que previamente han demostrado tener potencial para el diagnóstico de la tuberculosis, en PDMS por fisiorción<sup>1</sup>. Esta adsorción física es posible debido a que el cóctel lipídico se caracteriza por contener estructuras químicas anfipáticas. Estas estructuras se componen básicamente de una cabeza polar, que es la parte activa para el reconocimiento de un ligando afín, y una cola lipídica cuya estructura es hidrófoba y permite su unión a otros segmentos hidrófobos [69]. Es de esta manera que la parte hidrófoba de los lípidos bioactivos puede inmovilizarse en el PDMS, sin impedir que éstos sigan reconociendo los correspondientes ligandos solubles en agua (anticuerpos). Este tipo de fisiorción puede realizarse por medio de técnicas bastante sencillas, como la utilizada en este trabajo: recubrimiento por goteo (*drop-casting*, en inglés).

Considerando que los protocolos comunes para la inmovilización de lípidos dependen de la fijación de una cantidad muy pequeña de la sustancia lipídica en la superficie del material, es necesario un método altamente sensible para poder verificar la fijación de los lípidos antigénicos en el PDMS y evaluar si una vez fijados mantienen su capacidad para reconocer los anticuerpos respectivos. Dada la naturaleza antigénica de los lípidos utilizados en este trabajo, la realización de un ensayo inmune, como el ELISA indirecto, representa una buena opción para cumplir ese propósito [6]. Esto debido a que con este tipo de ensayos es posible medir el nivel de anticuerpos capturados por los antígenos, con lo cual se puede estimar si el antígeno está efectivamente unido a la superficie de PDMS.

---

<sup>1</sup>La fisiorción, o adsorción física, es el fenómeno por el cual un compuesto químico (agente adsorbente) se adhiere a una superficie, y en el que la especie adsorbida conserva su naturaleza química.

## 2.2. Obtención y caracterización de los lípidos bioactivos

Los extractos lipídicos bacterianos provenientes de *M. fortuitum* comprenden una mezcla de glicolípidos, también presentes en la pared celular de *M. tuberculosis*, en la cual están presentes la diaciltrealosa (DAT), triaciltrealosa (TAT), y el dimicolato de trealosa (DMT). Estos han demostrado ser lípidos de alta antigenicidad tanto en individuos tuberculosos como en modelos murinos de infección. Tienen además la capacidad de producir anticuerpos específicos y han permitido el diseño de métodos diagnósticos en los que se utilizan antígenos lipídicos purificados adsorbidos en una matriz sólida para la búsqueda de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes [42, 53, 70].

Para la obtención de los lípidos bioactivos, una mezcla de los tres antígenos lipídicos antes mencionados se purificó por cromatografía de adsorción en una columna abierta de Florisil eluida con cloroformo, acetona y metanol (3 volúmenes de cada uno). Posteriormente se realizó una extracción en fase sólida de la fracción acetónica en una columna Sep-Pak de gel de sílice. Para ello, la columna se lavó con cloroformo y se eluyó con acetona recién destilada. Los lípidos purificados se secaron bajo nitrógeno y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La presencia de los lípidos micobacterianos (DAT, TAT y DMT) en la fracción acetónica obtenida de *Mycobacterium fortuitum* se evaluó mediante un análisis de cromatografía de capa fina bidimensional (TLC 2D). Este método físico de separación es uno de los más utilizados para la separación de un gran número de compuestos, incluyendo mezclas de lípidos, que permite identificar compuestos que no pueden ser separados utilizando TLC de una sola dimensión [71, 72]. Brevemente, en la TLC 2D la muestra se coloca en una esquina de una placa cuadrada de capa fina y se desarrolla la separación de manera habitual con el primer solvente para posteriormente, extraer la placa, dejarla secar y colocarla en el segundo solvente para con ello desarrollar la segunda separación en dirección perpendicular a la primera. Para nuestra evaluación se utilizó  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:12:1) como solvente en la primera dirección, y  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10) como solvente para

la segunda dirección. Después se reveló la placa con una mezcla de 0.2% de antrona en ácido sulfúrico a 110°C durante 5 min. La Figura 2.1 muestra la placa de capa fina que se obtuvo como resultado. En esta placa se visualizan las manchas azules que corresponden a las reportadas previamente para el DAT, TAT y DMT [42, 53], por lo que se puede concluir que la mezcla de lípidos a utilizar en este proyecto está compuesta por la combinación de estos lípidos micobacterianos.

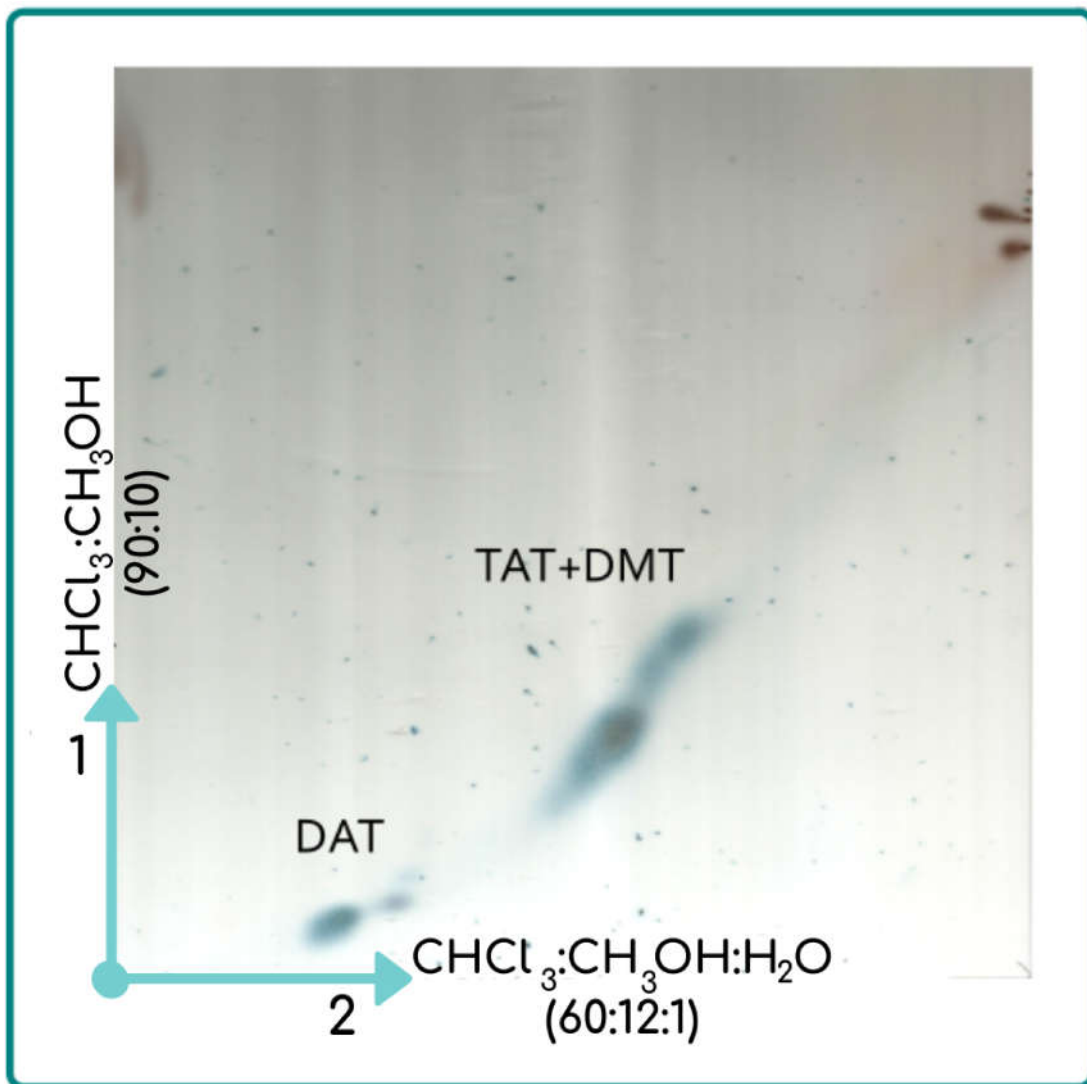


Figura 2.1: TLC en dos dimensiones para la caracterización de los lípidos antigénicos purificados de *Mycobacterium fortuitum*. La primera dirección (orientación vertical de la placa) fue realizada con  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10) como solvente y la segunda dirección (orientación horizontal de la placa) fue utilizando  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:12:1). La presencia de DAT, TAT y DMT es señalizada en las manchas respectivas.



## 2.3. Caracterización de los anticuerpos específicos contra los lípidos bioactivos

De forma independiente a este trabajo, para obtener ligandos específicos contra los lípidos bioactivos purificados, se generaron anticuerpos en dos conejos blancos de Nueva Zelanda (de 2 meses de edad). Para ello, brevemente, la fracción acetónica que contiene el antígeno fue suspendida en NaCl 0.85 % (10mg en 1.0mL) y mezclada con 1.0mL de adyuvante Freund completo. Cada conejo recibió una administración subcutánea de 1.0 mL del cóctel de lípidos antigénicos para su inmunización. Posteriormente, a los 15 y 30 días después de la inmunización, cada animal recibió refuerzos que consisten en una mezcla de antígeno de 3mg en 0.5mL en 0.85 % NaCl y 0.5mL de adyuvante de Freund incompleto, respectivamente. Antes de la inmunización se obtuvo una muestra de sangre de cada conejo para obtener el suero pre-inmune ( $S_P$ ), o de control, que es suero desprovisto de anticuerpos anti-lípidos. De igual manera, muestras de sangre fueron tomadas después de cada inmunización/refuerzo; y, finalmente, los conejos fueron desangrados totalmente el día 45 después de la inmunización. De esta última muestra fue obtenido el suero hiper-inmune ( $S_H$ ), el cual tiene un alto contenido de anticuerpos específicos.

La reactividad de los sueros ante la presencia de los lípidos bioactivos purificados se verificó mediante un ELISA indirecto, el cual es un protocolo estándar asistido por anticuerpos secundarios ligados a una enzima [55, 73]. En este caso, el ELISA se llevó a cabo en una placa de microtitulación de poliestireno (PS) de 96 pozos que tiene un recubrimiento hidrófobo que permite la adhesión de lípidos a la superficie. A continuación se describen brevemente los pasos que se realizaron como parte de este protocolo (para más detalles, consultar Anexo A):

1. 100 $\mu$ L del antígeno lipídico en hexano:etanol (1:1, v/v), con una concentración de 64( $\mu$ g/100 $\mu$ L), fueron depositados por goteo en cada pozo y la placa se colocó a 37 °C hasta que el solvente se evaporó por completo.
2. Los posibles sitios de unión, no cubiertos con antígeno, fueron bloqueados con albúmina de suero bovino (*BSA*, por sus siglas en inglés). Para ello, 200 $\mu$ L de

- BSA al 3 % fueron depositados en cada pozo y la placa se incubó durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se realizaron cinco lavados consecutivos con solución amortiguadora de fosfatos salinos (*PBS*, por sus siglas en inglés) para eliminar el exceso de BSA.
3. Se prepararon diferentes diluciones en serie (de 1 : 100 a 1 : 12800 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ) de cada suero (pre-inmune ( $S_P$ ) e hiper-inmune ( $S_H$ )) en *PBS*, y se depositaron 100 $\mu\text{L}$  de cada uno de estos en diferentes pozos. La placa se incubó durante toda la noche a 4 °C y, posterior a ello, los ligandos no adheridos específicamente en los antígenos se eliminaron mediante 5 lavados de *PBS*.
  4. La unión de los anticuerpos se evaluó agregando 100 $\mu\text{L}$  anti-inmunoglobulina (IgG) de conejo conjugada con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C, seguido de cinco lavados con BSA en *PBS* al 0.3 %.
  5. Finalmente, se agregaron 100 $\mu\text{L}$  de fosfato de p-nitrofenilo en dietanolamina (1mg/mL) a cada pozo para llevar a cabo la reacción colorimétrica y se realizaron mediciones de absorbancia a  $\lambda = 405\text{nm}$  utilizando un lector de placa de microtitulación.

De forma general, para un ELISA, un valor más alto de densidades ópticas significa un mayor cambio colorimétrico, lo cual está asociado directamente a la unión de más anticuerpos secundarios ligados a enzimas y, por ende, a mayor presencia de anticuerpos contra el antígeno inmovilizado. Considerando esto, se esperaría que el suero  $S_H$ , al estar hiper-inmunizado, presentara un mayor número de anticuerpos en comparación al suero  $S_P$ , el cual tiene un número de anticuerpos sustancialmente menor, al provenir de un sujeto de control que no fue inmunizado con el antígeno. De esta manera, si se transduce la presencia de anticuerpos a densidades ópticas (DO), se esperaría que la densidad óptica del suero pre-inmune ( $DO_{S_P}$ ) fuera menor que la del suero hiper-inmune ( $DO_{S_H}$ ) para cualquier dilución. Además, cuantitativamente, en un ensayo como este se considera que una diferencia en densidades ópticas de 0.2(u.a.) es necesaria para una correcta diferenciación de los sueros  $S_H$  y  $S_P$  [13].

Los resultados obtenidos para los experimentos con diferentes diluciones de suero, pre-inmune e hiper-inmune, se presentan en la Fig. 2.2. Primeramente, los resultados para el ELISA indirecto muestran una mayor reacción colorimétrica con  $S_H$  comparado con  $S_P$  para todas las diluciones analizadas. Además, el valor de DO disminuye para concentraciones menores, lo cual comprueba que los antígenos inmobilizados siguen siendo capaces de capturar los anticuerpos contenidos en los sueros (bioactividad) y que el grado de captura de anticuerpos depende directamente de la dilución. Además, al cuantificar la diferencia en DO entre los sueros  $S_H$  y  $S_P$ , esta es mayor a 0.2(a.u.) para las diluciones de suero que van de  $1\mu L : 100\mu L$  hasta  $1\mu L : 6400\mu L$ ; por lo que puede considerarse que en este rango se puede realizar una correcta diferenciación entre el suero control y el de alto contenido de anticuerpos.

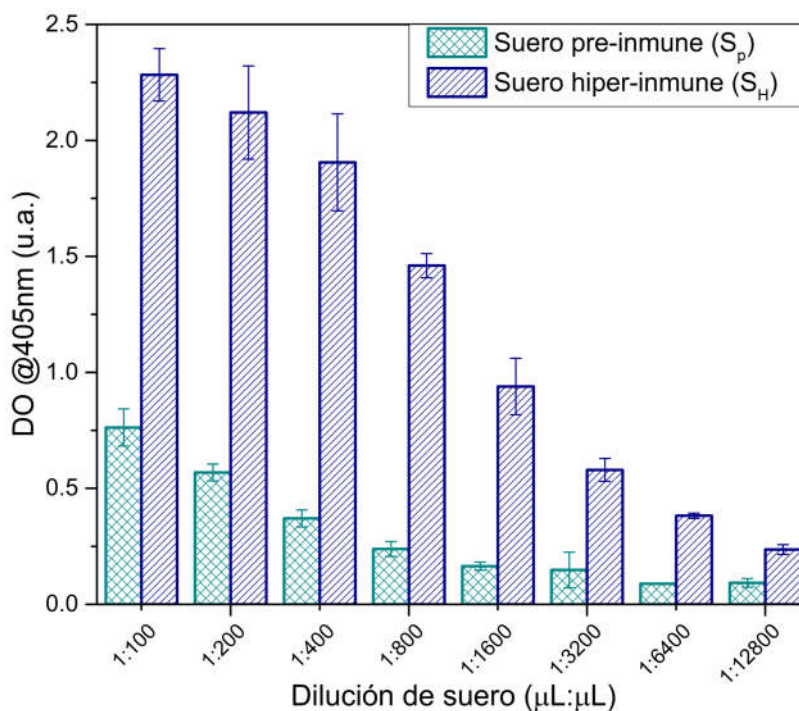


Figura 2.2: Caracterización de los anticuerpos contra antígenos lipídicos provenientes de suero control ( $S_P$ ) e hiper-inmune ( $S_H$ ) a diferentes diluciones. Cada barra representa el valor promedio del valor de DO  $\pm$  los errores estándar obtenidos de las mediciones por triplicado.

## 2.4. Despliegue del complejo inmune en la plataforma de bioreconocimiento

Una vez comprobada la bioactividad de los lípidos y caracterizados los sueros a utilizar, se realizaron pruebas de ELISA utilizando como sustrato al PDMS, en lugar del poliestireno, para evaluar la inmovilización del antígeno y el reconocimiento de los ligandos (anticuerpos) correspondientes. Para llevar a cabo estos experimentos se recubrieron con PDMS placas de microtitulación de 24 pozos, normalmente utilizados para cultivo celular. Se eligieron estas placas porque los pozos tienen un área más grande que permite que el antígeno únicamente interactúe con el PDMS y se evite que los lípidos entren en contacto con las paredes de los pozos.

Para recubrir las placas se depositaron 0.4 g de una mezcla de PDMS y curante (10:1 en peso) en cada uno de los pozos. Ambos componentes fueron mezclados vigorosamente y la placa fue degasada en un desecador para extraer el aire introducido durante el mezclado. Posteriormente, la placa se colocó en un horno eléctrico a 60°C durante 72 horas para asegurar la solidificación del polímero. Una vez que las placas quedaron recubiertas, se realizaron dos pruebas de ELISA siguiendo el mismo procedimiento descrito en la Sección 2.3, pero utilizando las cantidades mostradas en la Tabla 2.1, debido a la diferencia volumétrica de los pozos.

Reactivo ( $\mu L$ )	96 pozos (PS)	24 pozos (PDMS)
Antígeno lipídico en etanol-hexano	100	300
Bloqueo con BSA al 3 %	200	500
Suero ( $S_H$ o $S_P$ )	100	300
Anti-IgG de conejo	100	300
pNPP en dietanolamina	100	300
Lavados de PBS	350	1000

Tabla 2.1: Volúmenes de los reactivos utilizados para las diferentes placas: placa de 96 pozos de poliestireno (estándar) y placas de 24 pozos recubiertas con PDMS.

De los ensayos de ELISA, primeramente se exploró la funcionalización de la superficie de PDMS con diferentes concentraciones de antígeno lipídico (64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0 ( $\mu g/100\mu L$ )), manteniendo la dilución de suero fija (1 : 100 $\mu L/\mu L$ ). Y posteriormente, de forma similar, se probó la capacidad del PDMS funcionalizado de

capturar anticuerpos con diferentes diluciones de suero (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800  $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ), manteniendo la concentración de antígeno fija ( $64\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Para probar la inmovilización del antígeno lipídico en el PDMS, se utilizó el nivel de anticuerpos capturados (medidos por ELISA) para estimar si el antígeno se adhiere a la superficie del polímero. En este sentido, la hipótesis es que el PDMS debería interactuar con el lípido solamente a través de las partes hidrofóbicas de cada molécula. En ese caso, la parte bioactiva del lípido, de naturaleza hidrófila, debería estar libre para unirse al ligando correspondiente. Como se puede observar en la Figura 2.3 (a), los antígenos lipídicos micobacterianos permitieron la captura de anticuerpos específicos de conejo, lo cual es una prueba de que están inmovilizados en el PDMS, sin perder su capacidad de reconocimiento. Además en esta figura se muestra que la reactividad del suero hiper-inmune es hasta 2.4 veces mayor que la del suero no inmune, mostrando un comportamiento gaussiano dependiente de la cantidad de antígeno depositado en el PDMS. Con ello se puede concluir que el antígeno lipídico inmovilizado en este polímero mantiene su bioactividad y tiene la capacidad de permitirnos diferenciar los sueros analizados, lo que demuestra la idoneidad de utilizar el PDMS con antígenos lipídicos como plataforma de bioreconocimiento. Adicionalmente, los resultados muestran que las condiciones para las cuales se obtuvo una mejor diferenciación de los diferentes sueros es utilizando  $8\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  como concentración de antígeno.

Una vez comprobada la correcta inmovilización del antígeno en el PDMS, se probó la captura de anticuerpos presentes en suero a diferentes diluciones en la plataforma de bioreconocimiento (Figura 2.3 (b)). En esta figura puede observarse cómo a diluciones mayores o iguales a  $1 : 400\mu\text{L}/\mu\text{L}$  la tendencia en el valor de DO es similar a la de la placa de poliestireno (Fig. 2.2). Sin embargo, para concentraciones séricas más altas, la capacidad de unión disminuye, lo cual da lugar a un comportamiento gaussiano. El hecho de que el valor de DO alcance un valor máximo podría deberse a la saturación del recubrimiento de antígeno en PDMS que limita la cantidad de anticuerpos que pueden ser capturados. Sin embargo, los resultados obtenidos permitieron identificar las condiciones para las cuales se puede obtener un resultado dependiente de la dosis

(para diluciones de suero de  $1 : 12800\mu L/\mu L$  a  $1 : 400\mu L/\mu L$ ), y la dilución con la que se obtiene la captura máxima de anticuerpos en suero ( $1 : 400\mu L/\mu L$ ).

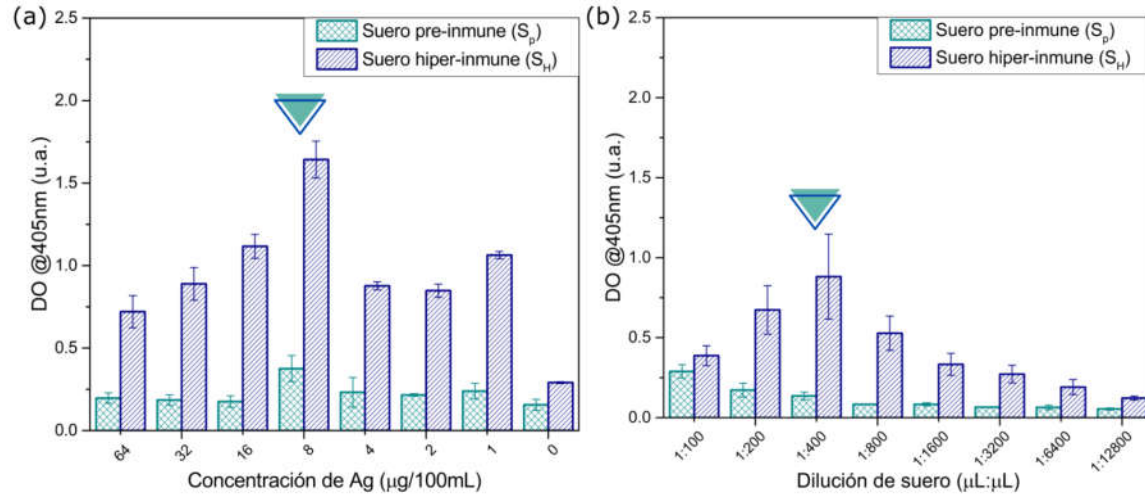


Figura 2.3: Detección de uniones antígeno-anticuerpo en PDMS: (a) para diferentes concentraciones de antígeno, manteniendo  $1 : 100$  como dilución sérica y (b) para diferentes diluciones de suero, manteniendo la concentración de antígeno depositada en  $64(\mu g/100\mu L)$ . En ambos experimentos se evaluó la captura de anticuerpos del suero control ( $S_P$ ) y del suero hiper-inmune, que contiene anticuerpos específicos ( $S_H$ ) de conejos inmunizados con lípidos. Las flechas indican la concentración de antígeno con la que se obtuvo una mejor diferenciación de los diferentes sueros ( $8\mu g/100\mu L$ ) como concentración y la dilución con la que se obtiene la captura máxima de anticuerpos en suero ( $1 : 400\mu L/\mu L$ ), respectivamente. Cada barra representa el valor promedio del valor de DO  $\pm$  los errores estándar obtenidos de las mediciones por triplicado.

## 2.5. Optimización y reutilización de la plataforma de bioconocimiento

Para la optimización de la plataforma de bioconocimiento formada por el PDMS funcionalizado con antígenos lipídicos, se deben tener en cuenta dos factores fundamentales, para cualquier ensayo biológico, en el contexto de la identificación de biomarcadores en los fluidos humanos. El primero es la sensibilidad de la prueba (es decir, la probabilidad de detectar esta pequeña cantidad de anticuerpos), la cual toma gran importancia al considerar que la mayoría de los biomarcadores son moléculas presentes en concentraciones muy pequeñas. El segundo factor es la especificidad, que es la medición de la proporción de negativos reales que se identifican correctamente

como tales. La importancia de este último radica en que los fluidos biológicos tienen un gran conjunto de moléculas bioactivas, que son propensas a unirse inespecíficamente a ligandos inmovilizados en cualquier sistema. En ese sentido, para este caso en particular, la especificidad se refiere a una medición de la proporción de muestras de suero control sin anticuerpos anti-lípidos que se identifican como negativos. Un criterio comúnmente utilizado para evaluar si una plataforma de bioreconocimiento satisface estos dos factores es la relación señal a ruido (*SNR*, *Signal to Noise Ratio*), ya que es un factor que permite cuantificar la diferenciación entre el suero control y el proveniente de un sujeto inmunizado. Para el presente estudio, la SNR se calculó utilizando las mediciones de DO obtenidas con suero de conejo pre-inmune e hiperinmune ( $DO_{SH}/DO_{SP}$ ). Partiendo de estos cálculos, los valores más altos de SNR, y las condiciones con las que se obtuvieron, se presentan en la Tabla 2.2.

Concentración de antígeno ( $\mu g/100\mu L$ )	Dilución sérica ( $\mu L/\mu L$ )	$DO_{SH}/DO_{SP}$
8	1:100	4.85
16	1:100	6.45
64	1:400	6.51
64	1:800	6.39

Tabla 2.2: Combinaciones de concentraciones de antígeno y diluciones séricas con las que se obtuvieron los valores más altos de SNR en los experimentos de ELISA indirecto en PDMS.

En base a esto, se repitieron los experimentos para las combinaciones entre las concentraciones óptimas de antígeno ( $8(\mu g/1\mu L)$  y  $16(\mu g/1\mu L)$ ) y suero ( $1 : 400(\mu L/\mu L)$  y  $1 : 800(\mu L/\mu L)$ ), obteniendo los valores de SNR mostrados en la Tabla 2.3. Como se esperaba, el uso de estas combinaciones, permitió la obtención de valores de SNR más altos (SNR de hasta 9.88) que los obtenidos antes del proceso de esta optimización (SNR de hasta 6.51). El valor más alto de SNR se obtuvo usando una concentración de antígeno de  $8(\mu g/1\mu L)$  con una dilución de suero de  $1 : 400(\mu L/\mu L)$ . Esto significa que con el uso de esta combinación, la reacción obtenida para el suero hiperinmune es casi 10 veces la que se obtiene con el suero control, por lo que la diferenciación entre sueros es más precisa.

De forma adicional, las concentraciones de antígeno y suero mostradas en la Tabla 2.3 se utilizaron para probar la reutilización de la plataforma de bioreconocimiento.

Concentración de antígeno ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ )	Dilución sérica ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ )	$DO_{SH}/DO_{SP}$
8	1:400	9.88
8	1:800	8.71
16	1:400	8.79
16	1:800	8.69

Tabla 2.3: Combinaciones de concentraciones de antígeno y diluciones séricas probadas para maximizar-optimizar los valores de SNR en los experimentos de ELISA indirecto en PDMS.

Este es un factor altamente deseable para el desarrollo de inmunosensores, ya que representa una ventaja directa en el decremento del costo del inmunosensor, incrementando así las posibilidades de producirlos en masa. Para probar la capacidad de reutilización del PDMS funcionalizado con antígenos lipídicos se realizaron tres ELISA indirectos consecutivos en las mismas superficies de PDMS funcionalizadas. Para ellos, después de realizar cada ensayo, todos los anticuerpos ligados a los antígenos unidos a la placa PDMS se eliminaron a través de cinco lavados con una solución amortiguadora de  $pH = 3$  (ver detalles en el Anexo B). Este proceso de lavado permite el desprendimiento de biomoléculas de naturaleza proteica unidas de forma no covalente, incluyendo los ligandos involucrados en los ELISA, en particular, anticuerpos.

La Figura 2.4 muestra los resultados para los tres ensayos y para todas las combinaciones óptimas de concentración de antígeno-dilución sérica de la Tabla 2.3. En esta gráfica puede apreciarse que después de tres ensayos, a pesar de que los resultados muestran una disminución en el SNR obtenido originalmente (que va de 0.93 a 2.88), el recubrimiento de antígeno se conserva en la placa (aunque no de forma intacta), y mantiene su capacidad de capturar anticuerpos y diferenciar entre los sueros correctamente, con un SNR mínimo de 5.82.

Con los resultados obtenidos en este capítulo se ha probado que el PDMS con antígenos lipídicos inmovilizados en su superficie puede funcionar correctamente como una plataforma de bioreconocimiento capaz de diferenciar sueros con diferente contenido de anticuerpos. Por lo tanto, los siguientes capítulos se centran en aprovechar el uso y adaptación de esta plataforma en el sistema de inmunosensado y en el inmunosensor en la punta de una fibra óptica propuestos.



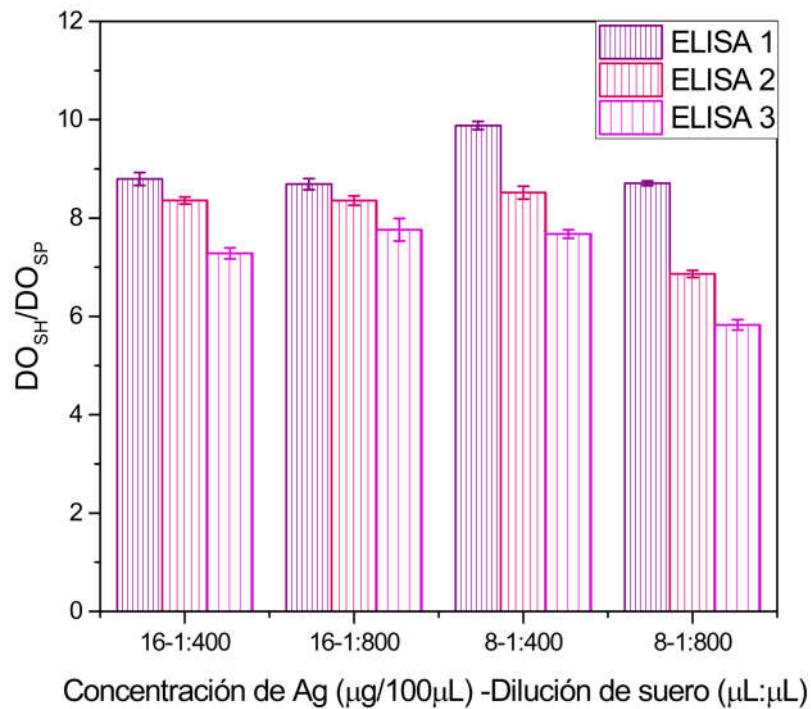


Figura 2.4: Relación de señal a ruido,  $SNR = DO_{SH}/DO_{SP}$ , calculada para tres ensayos ELISA consecutivos utilizando el mismo recubrimiento antigénico en PDMS. La gráfica muestra los resultados para las combinaciones de concentraciones de antígeno y suero óptimas presentadas en la Tabla 2.3. Cada barra representa el valor promedio del valor de SNR  $\pm$  los errores estándar obtenidos de las mediciones por triplicado.

# Capítulo 3

## Desarrollo de un instrumento de inmunosensado basado en un Fabry-Pérot de fibra óptica (FPI-FO)

El instrumento de inmunosensado que se propone está basado en un interferómetro Fabry-Pérot de fibra óptica (FPI-FO) simple, el cual es una cavidad formada por dos superficies reflejantes, en donde una superficie corresponde al extremo de una fibra óptica y la otra a la superficie de la muestra [37]. De esta manera, la luz proveniente de una fuente es guiada por la fibra óptica para incidir en la muestra, quedando confinada dentro de la cavidad Fabry-Pérot (FP) y generando un patrón de interferencia que puede detectarse con un Analizador de Espectros Ópticos (OSA, *Optical Spectrum Analyzer*). El esquema general para la implementación de este tipo de FPI-FO, así como los elementos y parámetros correspondientes a la cavidad FP asociada, se muestran en la Fig. 3.1. En la Fig. 3.1 (a), además de los elementos que son necesarios para la implementación del FPI-FO (Fuente de luz, OSA, circulador y fibra óptica), se indican las etapas que correspondientes al uso de este esquema de FPI-FO como instrumento de inmunosensado. En este sentido, la muestra a analizar sería la plataforma de bioreconocimiento y, los cambios en el índice de refracción ( $n$ ) o espesor de ésta ( $L$ ) se traducirían en cambios en el interferograma que es adquirido por el OSA para su posterior análisis.

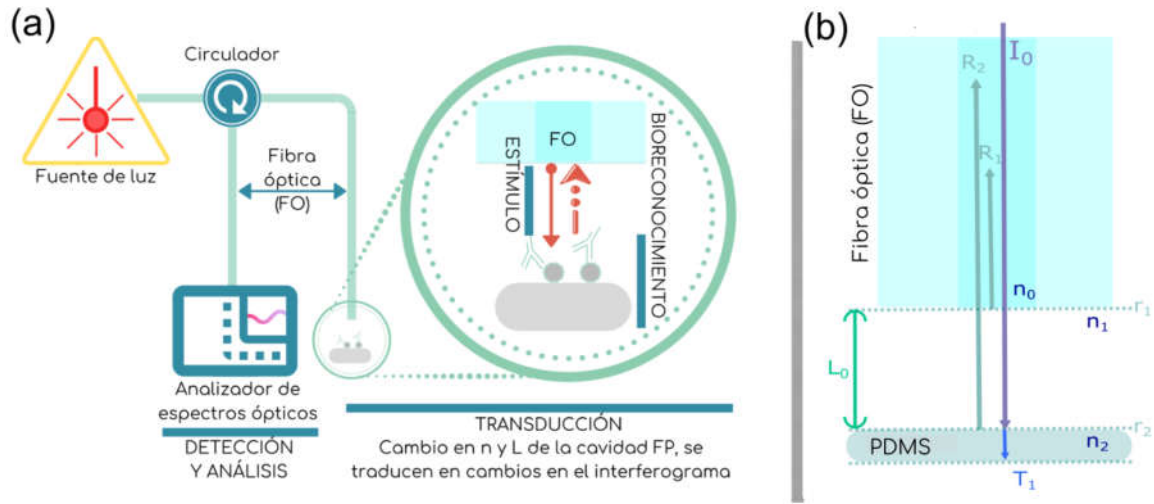


Figura 3.1: Esquema básico del sistema de inmunosensado propuesto: (a) Diagrama experimental para su implementación. (b) Indicación de las superficies reflejantes, el extremo de una FO y la superficie de la muestra, así como los parámetros que conforman el interferómetro FP.

### 3.1. Principio de operación

Desde el punto de vista teórico, la respuesta espectral del FPI puede representarse utilizando un modelo de *reflexiones múltiples*. Este modelo involucra la superposición coherente del efecto de un número arbitrario de superficies planas, parcialmente reflejantes, libres de absorción, de grosor nulo y colocadas de forma paralela. Dicho modelo facilita, entre otras cosas, los cálculos numéricos que con otros métodos son más complejos y extensos [74].

Partiendo de este modelo de múltiples reflexiones, la expresión que representa el patrón de interferencia reflejado por el FPI de dos superficies ( $I_R$ ) está dada por la ecuación [52, 75]:

$$I_R = \frac{r_1^2 + 2r_1r_2 \cos(\theta) + r_2^2}{1 + 2r_1r_2 \cos(\theta) + r_1^2r_2^2} \quad (3.1)$$

en donde los coeficientes de reflexión están dados por  $r_1 = \frac{n_1 - n_0}{n_0 + n_1}$ ,  $r_2 = \frac{n_2 - n_1}{n_1 + n_2}$ ; y la diferencia de fase entre las señales puede calcularse como:

$$\theta = \frac{4\pi n_1 L_0}{\lambda} \quad (3.2)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz que incide en el interferómetro,  $L_0$  es la longitud de la cavidad y  $n_0$ ,  $n_1$  y  $n_2$ , representan los índices de refracción de la fibra óptica, el medio que conforma la cavidad, y el de la superficie de la muestra a sensar, respectivamente (ver Figura 3.1 (b)).

El patrón de interferencia depende de la separación entre superficies ( $L_0$ ), las reflectividades de éstas ( $r_i$ ), que a su vez depende de los índices de refracción involucrados, y la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz incidente [52, 74, 75]. Tomando esto en cuenta, para el caso particular de los sistemas de inmunosensado propuestos en este proyecto, se analizarán los cambios en el patrón de interferencia de los FPI-FO para obtener información de cómo se modifica la superficie del PDMS durante el inmunoensayo (desde la funcionalización hasta la detección de anticuerpos en sueros con diferente contenido de éstos), la cual está directamente asociada únicamente a los cambios en la longitud de la cavidad y en el índice de refracción de la superficie del PDMS ( $n_2$ ).

## 3.2. Diseño y desarrollo del instrumento de inmunosensado

*Milmetrix* es el nombre que se le asignó al instrumento de inmunosensado desarrollado. La implementación de este instrumento se diseñó y adaptó partiendo del esquema presentado en la Fig. 3.1 y se muestra en la Fig. 3.2. En esta implementación, la cavidad FP está conformada por la superficie de una fibra óptica y la superficie de la muestra a analizar; y, en lugar de un OSA, se utiliza un interrogador, cuyo principio de funcionamiento se explica un poco más adelante. En cuanto a la fibra óptica, para poder controlar la posición en donde la luz incide sobre la muestra y asegurar que la incidencia sea normal a la superficie, se optó por colocar un cable de fibra óptica monomodal (con conector plano) en un goniómetro, el cual a su vez fue soportado en un set de platinas motorizadas en 3 ejes ( $x$ ,  $y$  y  $z$ ) (Thorlabs, MTS50-Z8). Para la otra superficie que conforma el interferómetro, se fabricaron membranas de PDMS para ser usadas como plataforma de bioreconocimiento.

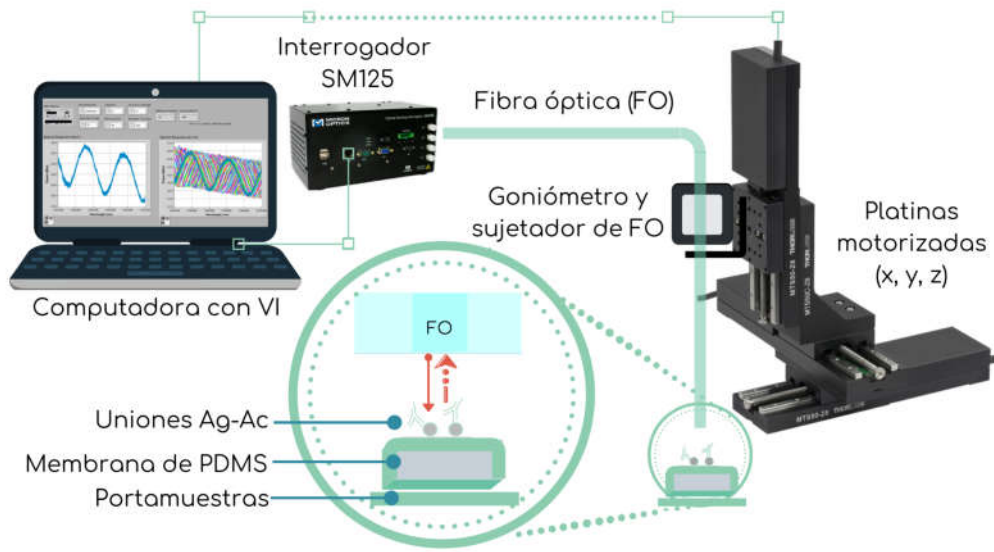


Figura 3.2: Implementación del *Milmetrix*: instrumento de inmunosensado basado en el esquema básico de un FPI-FO.

Las membranas de PDMS fueron fabricadas siguiendo un método sencillo, el cual se muestra en la Fig. 3.3. En este método se utiliza un portaobjetos de vidrio limpio al cual se le colocan micas autoadheribles para formar un molde cuadrado de un espesor deseado ( $\approx 320\mu m$ ). Posteriormente, una combinación del polímero y agente curante (10:1 en peso, Sylgard 184), mezclado y degasado es vaciado en el molde. Después se coloca otro portaobjetos limpio en la superficie para retirar el exceso y garantizar la obtención de una membrana de espesor homogéneo, lo cual es de suma importancia ya que el patrón de interferencia depende directamente del espesor de la membrana. Posteriormente la muestra se coloca en un horno eléctrico a  $60^{\circ}C$  por  $48hrs$  para asegurar la solidificación del polímero y una vez concluido el proceso se retiran las micas autoadheribles para poder hacer el desmoldeado de las membranas de PDMS.

Finalmente, para hacer la evaluación de la membrana de PDMS, ésta es soportada en un portamuestras, el cual es un espejo, y el cable de fibra óptica es colocado a  $1mm$  de la superficie de la membrana, para evitar el contacto, y es conectado a un interrogador (Micron Optics SM125). El interrogador es un equipo de adquisición de señales ópticas compacto que incluye un láser infrarrojo sintonizable, continuo y de baja potencia, y un detector, el cual permite la adquisición del patrón de interferencia

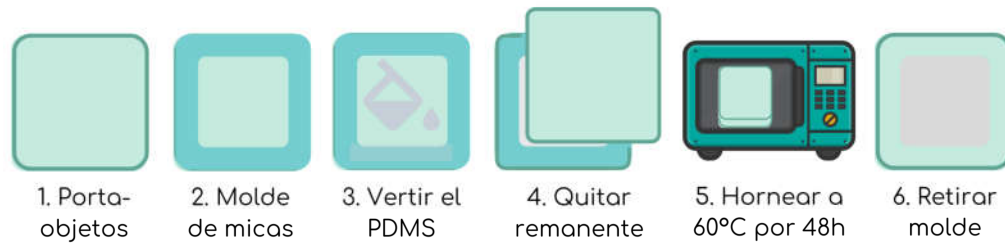


Figura 3.3: Método de fabricación de las membranas de PDMS.

reflejado por el dispositivo, en un rango de longitudes de onda que va de 1520 – 1570nm y en tiempo real. Es importante señalar que las membranas son mucho más grandes que el núcleo de la fibra óptica utilizada para analizarlas, de tal manera que es necesario hacer mediciones en diferentes puntos de la muestra para analizar si su comportamiento es el mismo en toda la superficie. La Fig. 3.4 muestra imágenes del instrumento implementado, señalando los elementos que lo conforman.

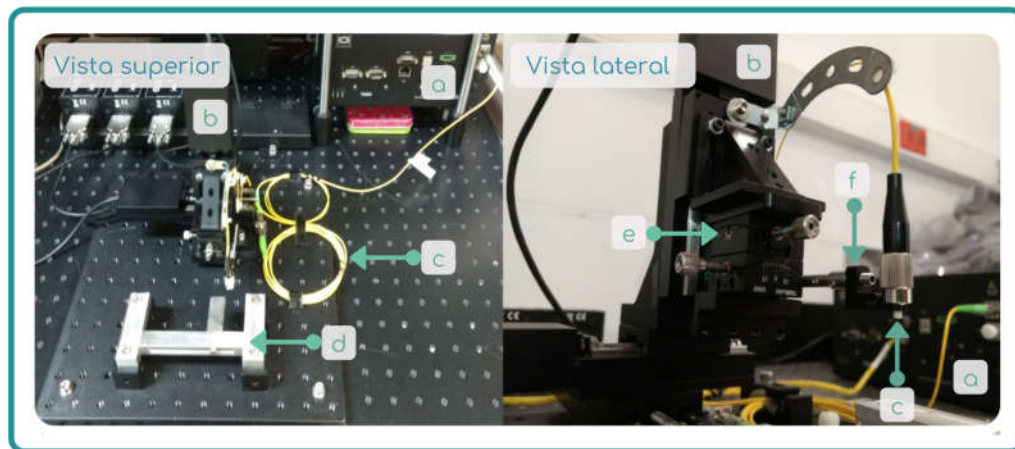


Figura 3.4: Imágenes de la implementación del *Milmetrix*, vista lateral y superior. Los elementos que se muestran son: (a) interrogador, (b) platinas motorizadas (x,y,z), (c) cable de fibra óptica, (d) portamuestras, (e) goniómetro y (f) sujetador de la punta del cable de FO.

Otro aspecto importante a señalar es que el instrumento está diseñado para realizar mediciones en muestras sólidas. La razón principal de ello es que, de hacerse las mediciones en muestras líquidas, la distancia entre la fibra y la superficie de la muestra ( $L_0$ ) no sería constante y las mediciones adquiridas no serían bajo las mismas

condiciones. Esto se debe a que, si se deposita una gota de la muestra en la superficie de la membrana de PDMS, la evaporación del líquido causaría una variación en la altura de ésta, variando con ello  $L_0$  y la respuesta espectral del instrumento.

### 3.2.1. Instrumentación virtual

Como puede observarse, la implementación del *Milmetrix* es relativamente sencilla; sin embargo, se decidió desarrollar un instrumento virtual (VI) que pudiera controlar y automatizar el instrumento de inmunosensado desarrollado. Este instrumento virtual está diseñado con la intención de cumplir las siguientes funciones:

- Comunicación, control y sincronización del hardware: Adquisición automática del patrón de interferencia registrado por el interrogador, control de la posición de la fibra con las platinas motorizadas y sincronización de estos eventos.
- Mediciones a distintas distancias en el eje  $z$ : Para poder discriminar el efecto que tiene la distancia  $L_0$  en la respuesta del FPI.
- Mediciones en cinco puntos de la muestra: Separados a una distancia indicada por el usuario, con el objetivo de observar la respuesta en diferentes zonas de la muestra analizada.
- Almacenamiento: Guarda automáticamente el interferograma en tiempo real para su posterior procesamiento.

Para mostrar como es la integración entre la implementación del *Milmetrix* y el instrumento virtual desarrollado para su automatización, la Fig. 3.5 muestra esquema general de las funciones, tanto físicas como virtuales del Milmetrix, y la interacción entre éstas. En esta figura puede apreciarse como el *software* se encarga de adquirir el patrón de interferencia y posicionar la punta del cable de fibra óptica por medio de la comunicación, control y sincronización del interrogador y las platinas motorizadas. Así mismo, se señala que, una vez adquiridos los patrones de interferencia, el instrumento virtual es capaz de analizar éstos por medio de la Transformada Rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform*, FFT), como se explica más adelante.

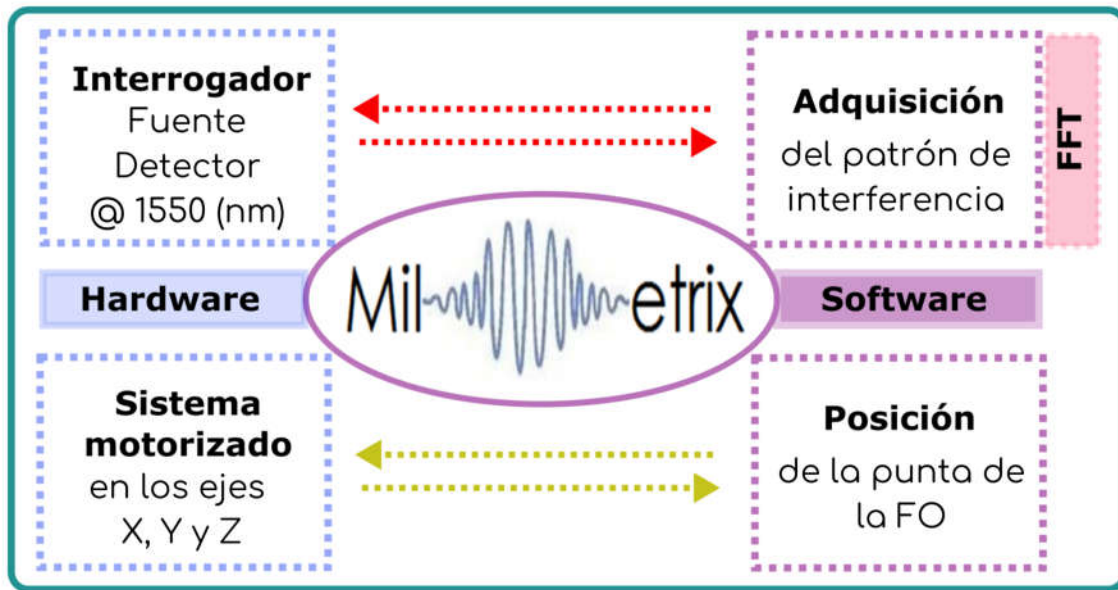


Figura 3.5: Esquema de las funciones físicas y virtuales que realiza el *Milmetrix*, así como su interacción.

### 3.2.2. Análisis del patrón de interferencia

A pesar de que el diseño del FPI-FO básico contempla una sola cavidad, en el instrumento desarrollado la respuesta espectral depende de dos cavidades: una entre la fibra óptica y la superficie de la plataforma de bioreconocimiento y otra debido a la membrana de PDMS por sí misma. Esta configuración produce que el patrón de interferencia sea una señal modulada, producida por la superposición de los interferogramas respectivos a cada una de las cavidades de forma individual [74, 76, 77]. Si bien los cambios en los índices de refracción ( $n$ 's) y los espesores de las cavidades ( $L$ 's) puede ser calculado a través de la separación entre máximos del interferograma (*Free Spectral Range*,  $FSR = \frac{\lambda^2}{nL}$ ), el que sea una señal modulada dificulta el poder discernir los máximos correspondientes a cada uno de los patrones de interferencia de forma individual [74, 76, 77]. Debido a esto, los datos adquiridos se analizaron utilizando la Transformada Rápida de Fourier (FFT), ya que con este análisis se pueden identificar las contribuciones que cada una de las cavidades tiene en la respuesta espectral del instrumento, a diferencia de con el método de conteo de franjas (cálculo de FSR) con el que únicamente se puede caracterizar una sola cavidad [74, 76–78].



El análisis de los patrones de interferencia por medio de la FFT se basa en considerar que la longitud de las cavidades es independiente y que puede ser determinada por la Ecuación 3.3 [76, 77]:

$$OP = 2n_i L_i = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} f_{FFT,i} = A f_{FFT,i} \quad (3.3)$$

donde  $f_{FFT,i}$  es la frecuencia de la FFT aplicada al interferograma que corresponde a la cavidad  $i$ ,  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  corresponden a la longitud de onda inicial y final del espectro adquirido y  $A = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1}$ . Considerando que todos los patrones de interferencia de este trabajo fueron adquiridos en el mismo rango espectral,  $A = 47.73 \mu m$  ya que  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son  $1520 nm$  y  $1570 nm$ , respectivamente. Dado esto, para la comparación teórica-experimental del instrumento, presentar los resultados de la FFT aplicada en el interferograma para mostrar la ubicación de las  $f_{FFT,i}$  y ejemplificar el análisis utilizado en este trabajo. Y, en cuanto a los resultados correspondientes a los experimentos realizados, los resultados se muestran en función del camino óptico ( $OP_i = 2n_i L_i$ ). Para este fin, es importante señalar que en este análisis se aprovechan las siguientes propiedades de la transformada de Fourier y su interpretación experimental [74, 78]:

- **Linealidad:** El número de cavidades ( $i$ ) determina el número de caminos ópticos que la luz puede experimentar dentro del FPI; cada uno de éstos se ve representado como una componente en la FFT ( $f_{i,FFT}$ ). Dada esta característica, es posible diferenciar, en el interferograma transformado, las componentes debidas a distintas cavidades, así como las contribuciones debidas a la componente directa y al ruido del instrumento de adquisición (Interrogador), las cuales están agrupadas en la componente ubicada en el cero de la FFT.
- **Escalado:** Significa que la posición de los máximos de la FFT aplicada al patrón de interferencia ( $f_{FFT,i}$ ), es proporcional al camino óptico que la luz experimenta dentro de la cavidad (siguiendo la Ec. 3.3). De esta manera, el aumento en índice de refracción o longitud de la cavidad provocará un aumento del camino óptico y con ello un corrimiento del máximo de la FFT hacia valores mayores (hacia la derecha), siempre y cuando  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  se mantengan constantes.

### 3.3. Caracterización del instrumento de inmunosensado

#### 3.3.1. Comparación teórica-experimental

Primeramente, para verificar que la respuesta experimental obtenida por el *Milmetrix* correspondiera a la esperada teóricamente, experimentalmente se analizó el caso de una sola cavidad, que corresponde a cuando la luz únicamente interactúa con el portamuestras (espejo) y debería apegarse a la ecuación 3.3, correspondiente al dominio de la frecuencia. Para este análisis, a pesar de que las membranas funcionalizadas no son utilizadas, para la simulación y los experimentos, se consideró como separación inicial  $L_0 = 1.32mm$  (que corresponde al espesor de la membrana ( $\approx 320\mu m$ ) sumada a  $1mm$  que se deja de espacio para no estar en contacto con las muestras biológicas) con el objetivo de que esto sirva de referencia para los experimentos de inmunosensado. Partiendo de esta posición inicial, la separación  $L_0$  se incrementó, es decir la fibra óptica se alejó del portamuestras, en pasos de  $100\mu m$  hasta completar diez mediciones, siendo así  $L_0 = 2.22mm$  la última posición. En la Fig. 3.6 es posible observar la evolución de la FFT de la respuesta espectral, tanto teórica (derecha) como experimental (izquierda), del FPI conforme la fibra óptica se va alejando del portamuestras ( $L_0 \uparrow$ ).

Partiendo de los resultados de esta comparación y después de ver la gran similitud entre las respuestas puede concluirse que el modelo teórico representa adecuadamente las mediciones realizadas con el instrumento implementado, para cuando el FPI es de una cavidad. Siendo así, los mismos datos experimentales mostrados en la Fig. 3.6 se utilizaron para obtener la contribución que tiene  $L_0$  en la respuesta espectral, ya que es el único parámetro que puede afectar la FFT aplicada a los interferogramas obtenidos en esta configuración, en donde el índice de refracción permanece constante ( $n_{aire}$ ). Para ello, se rastreó la posición del pico de mayor amplitud de la FFT para las diferentes posiciones de la FO y se calcularon las longitudes asociadas para cada paso despejando  $L_{0,calculada}$  de la expresión  $L_0 = \frac{A}{2} f_{FFT}$ , que deriva de la Ec. 3.3 y considera a  $n = n_{aire} = 1$  y  $A = 47.73\mu m$ .

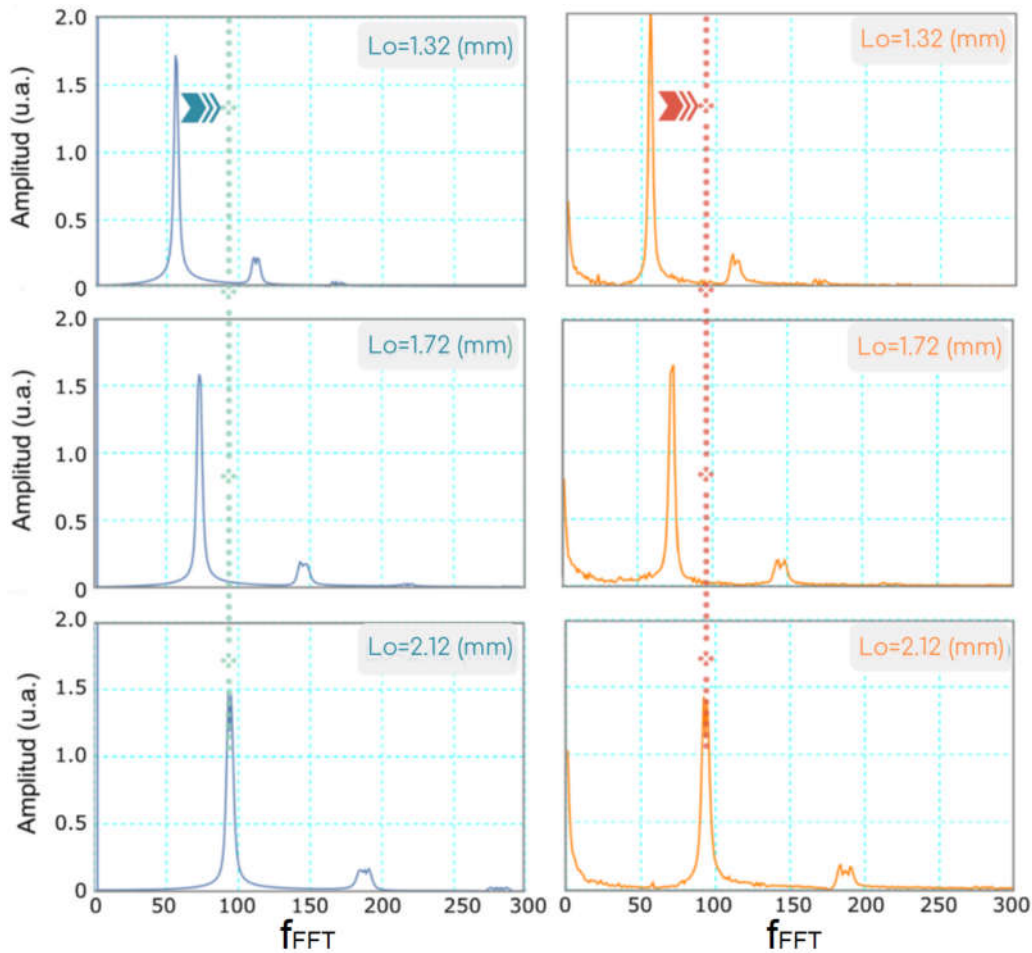


Figura 3.6: Comparación de la FFT de la respuesta espectral teórica (izquierda) de un FPI de dos superficies reflejantes y la respuesta espectral experimental (derecha) del *Milmetrix* para la cavidad formada por la fibra óptica y la superficie totalmente reflejante del portamuestras. La línea punteada junto con la flecha indican el corrimiento que experimentan las transformadas de Fourier de ambas respuestas espectrales (teórica y experimental).

La gráfica de este comportamiento se muestra en la Fig. 3.7, en la cual se compara la distancia de la FO al portaobjetos ( $L_{0,medida}$ ), que es la indicada al *software* de las platinas motorizadas para posicionar la fibra, y el tamaño de la cavidad calculada por medio del análisis de la FFT experimental ( $L_{0,calculada}$ ). En esta figura se puede observar un comportamiento lineal en donde, conforme  $L_0$  aumenta, la posición del máximo tiene un corrimiento a la derecha, lo cual corresponde a lo observable en la Fig. 3.6 y cumple con el principio de escalado de la FFT. Además, se puede apreciar que, el valor de  $L_{0,calculada}$  se ajusta correctamente a la  $L_{0,medida}$  proporcionada por las

platinas motorizadas, tanto para la posición inicial ( $L_{0,medida} = 1.32mm$ ), como para los incrementos de  $100\mu m$  realizados a esta distancia. Así mismo, el ajuste a la curva obtenida muestra que la expresión utilizada ( $L_0 = \frac{\lambda}{2} f_{FFT}$ ) describe correctamente el comportamiento experimental, teniendo un error de 1.5% y 0.8% con respecto a la ordenada al origen y a la pendiente, respectivamente.

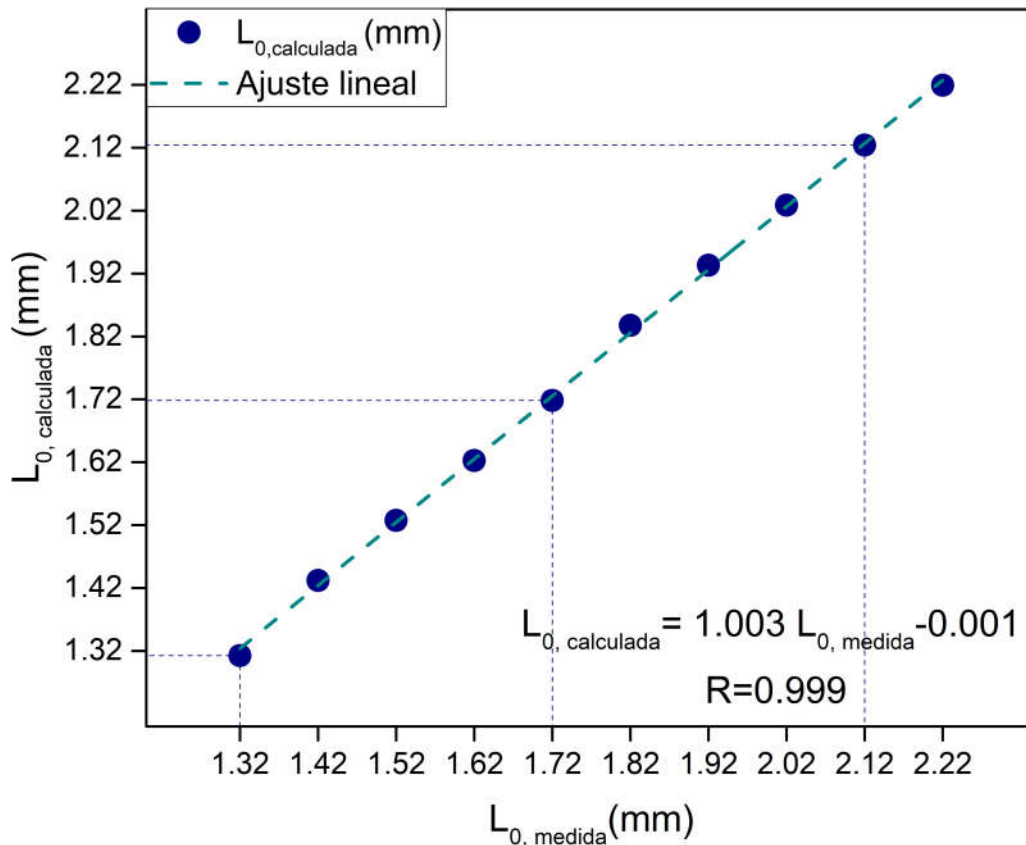


Figura 3.7: Comparación de la distancia entre la FO y el portamuestras, entre la indicada en las platinas motorizadas ( $L_{0,medida}$ ) y la calculada por medio del análisis de la FFT del interferograma ( $L_{0,calculada}$ ). Los puntos señalizados con líneas punteadas permiten visualizar de mejor manera la coincidencia entre ambos valores (medido y calculado).

Debido a que para cada medición se parte de este esquema FO-portamuestras, esta será la curva para realizar la calibración del *Milmetrix*. Es decir que, cada que sea quiera verificar que el instrumento está calibrado, bastará con verificar que a una separación determinada ( $L_0$ ) por las platinas motorizadas, se obtenga el valor correspondiente con el análisis por FFT, como se muestra en la gráfica de la Fig. 3.7.

### 3.3.2. Mediciones previas al inmunoensayo

Antes de medir las plataformas de bioreconocimiento durante el inmunoensayo, es importante realizar una caracterización de los distintos portamuestras y membranas de PDMS para poder identificar, y así discriminar, su contribución. Para ello se realizaron dos tipos de experimentos, los cuales se representan en la Fig. 3.8. El primero consistió en realizar mediciones modificando la distancia entre la FO y el portamuestras en pasos de  $0.1\text{mm}$ , iniciando en  $L_0 = 1.32\text{mm}$ , y manteniendo la punta de la FO posicionada en el centro del portamuestras. Para el segundo experimento, la altura se mantuvo una separación constante ( $L_0 = 1.32\text{mm}$ ) entre el portamuestras y la FO y ésta se colocó en cinco diferentes posiciones sobre el portamuestras, como se muestra en la Fig. 3.8 (b).

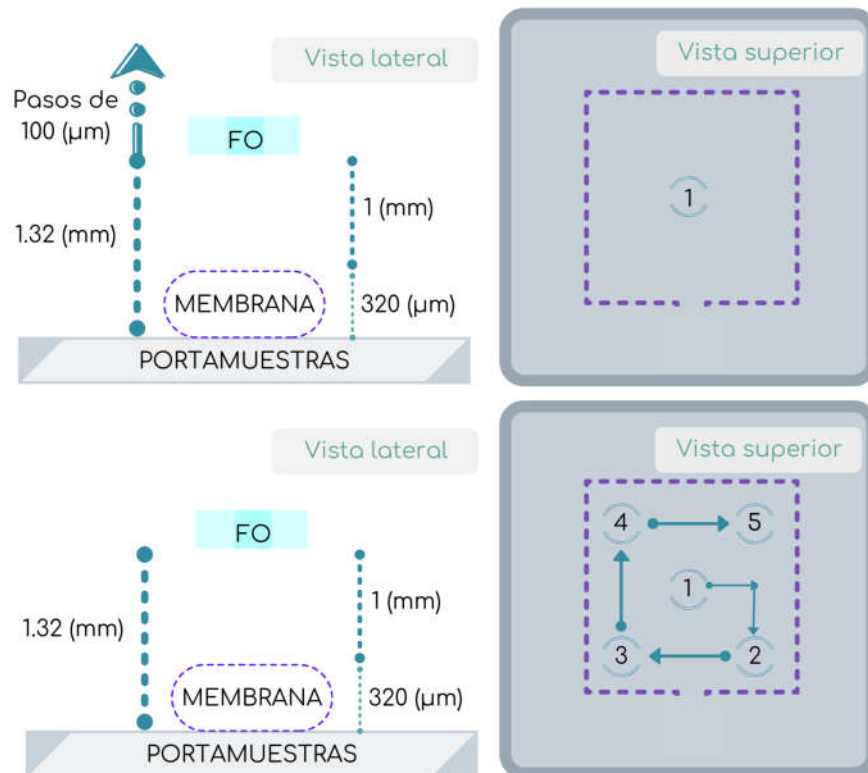


Figura 3.8: Representación de los experimentos realizados para la caracterización de los portamuestras y membranas de PDMS: (a) modificando separación entre FO y portamuestras ( $L_0 \uparrow$ ) y manteniendo la misma posición de lectura y (b) a la misma separación entre FO y portamuestras ( $L_0 = 1.32\text{mm}$ ) y en distintas posiciones de lectura.

Primeramente se verificó que el comportamiento de la respuesta para la medición del portamuestras cumpliera con lo descrito en la sección anterior. Para ello, en la Fig. 3.9 se muestra cómo, midiendo en el mismo punto del portamuestras, al separar más la FO del portamuestras ( $L_0 \uparrow$ ) se obtiene un corrimiento de las componentes de la FFT hacia la derecha. Posteriormente con el segundo experimento, cuyo objetivo es corroborar que la respuesta no es dependiente de la posición en la que se realice la lectura, se obtuvo la Fig. 3.10. Con esta figura puede concluirse que el portamuestras es bastante homogéneo, pues la respuesta espectral medida en los diferentes puntos es bastante similar.

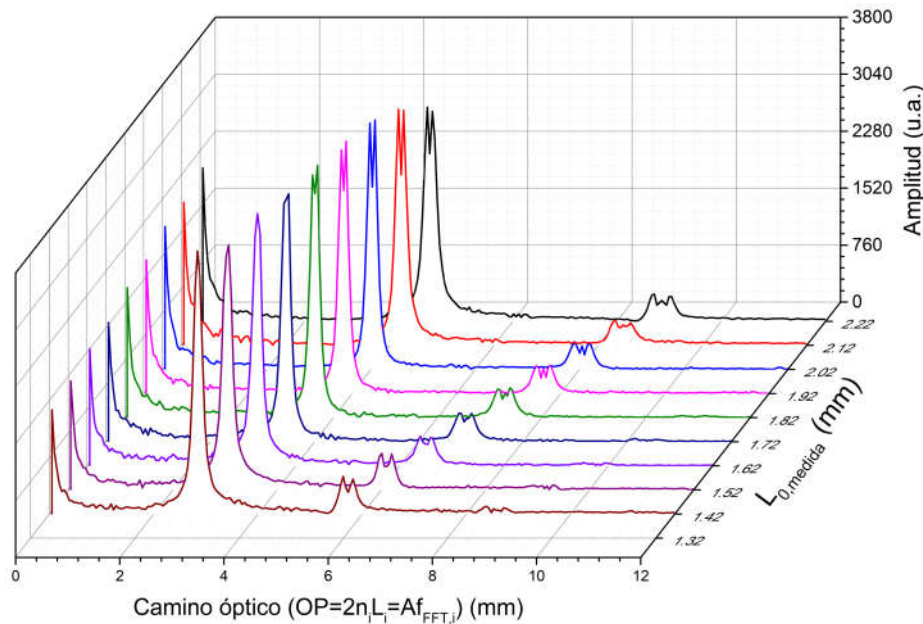


Figura 3.9: Comparación del comportamiento del camino óptico para el mismo portamuestras **modificando**  $L_0$  y manteniendo la misma posición de lectura.

En cuanto a la contribución de las membranas de PDMS, se repitieron los dos experimentos mostrados en la Fig. 3.8 pero colocando las membranas de PDMS. En la Fig. 3.11 se observa el comportamiento del camino óptico para las mismas condiciones que en la Fig. 3.9 pero poniendo una membrana de PDMS sobre el portamuestras. En esta figura se comprueba la propiedad de linealidad de la FFT ya que, hay un incremento en el número de componentes que conforman la señal. Lo cual se debe a que ahora se trata de un FPI de tres superficies parcialmente reflectivas, es decir,

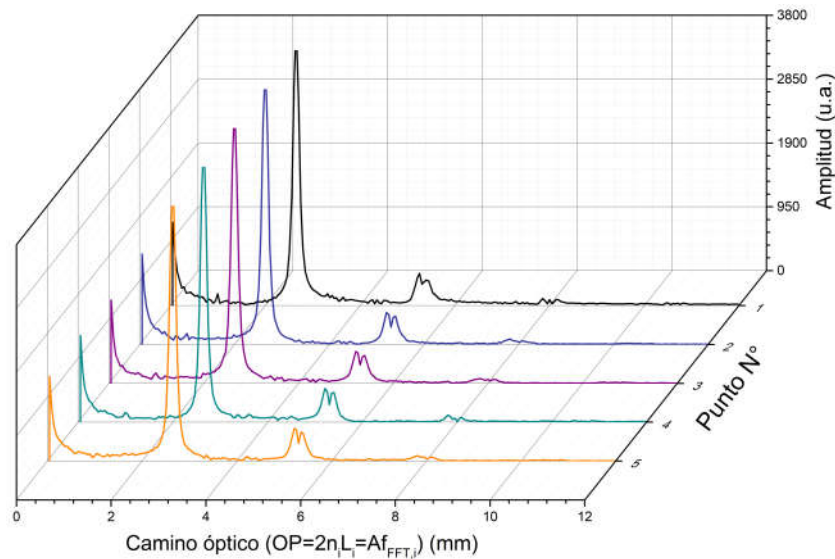


Figura 3.10: Comparación del comportamiento del camino óptico para el mismo portamuestras en **distintos puntos** a la misma separación entre FO y portamuestras ( $L_0 = 1.32mm$ ).

que involucra dos cavidades resonantes. De estos resultados, tomando en cuenta la señal obtenida para el portamuestras y el efecto acumulativo de nuevas cavidades, se concluyó que las nuevas componentes que aparecen son los característicos de la membrana de PDMS.

Finalmente, para verificar homogeneidad del espesor e índice de refracción de las membranas de PDMS, se compararon los resultados de las mediciones realizadas en cinco puntos distintos de las membranas, obteniendo la comparación mostrada en la Fig. 3.12. En esta figura se puede apreciar que las membranas son bastante homogéneas en espesor e índice de refracción ya que los picos están centrados en posiciones similares para los cinco puntos. Siendo  $OP_1 = 3.13 \pm 0.02(nm)$  y  $OP_2 = 2.65 \pm 0.01(nm)$ , que corresponden al pico de la membrana y el portaobjetos; y cuyas amplitudes medias son de  $4213.46(a.u.)$  y  $3550.44(a.u.)$ , con un error estándar de  $21.02(a.u.)$  y  $19.05(a.u.)$ , respectivamente. Cabe señalar que, a pesar que las respuestas no son del todo idénticas entre cada uno de los portamuestras y las membranas, el haber adquirido las mediciones para cada uno de éstos permite hacer un sistema referenciado en donde sus efectos pueden ser discriminados de las mediciones posteriores que se adquieran como parte del inmunoensayo en donde estos sean utilizados.

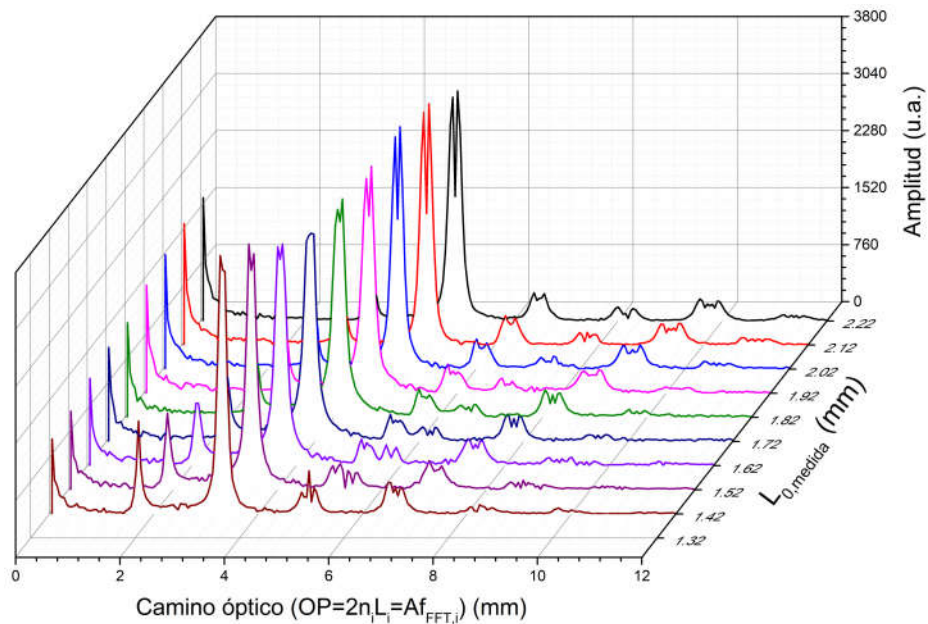


Figura 3.11: Comparación del comportamiento del camino óptico cuando la luz interactúa con una membrana de PDMS, **modificando**  $L_0$ , en la misma posición de lectura.

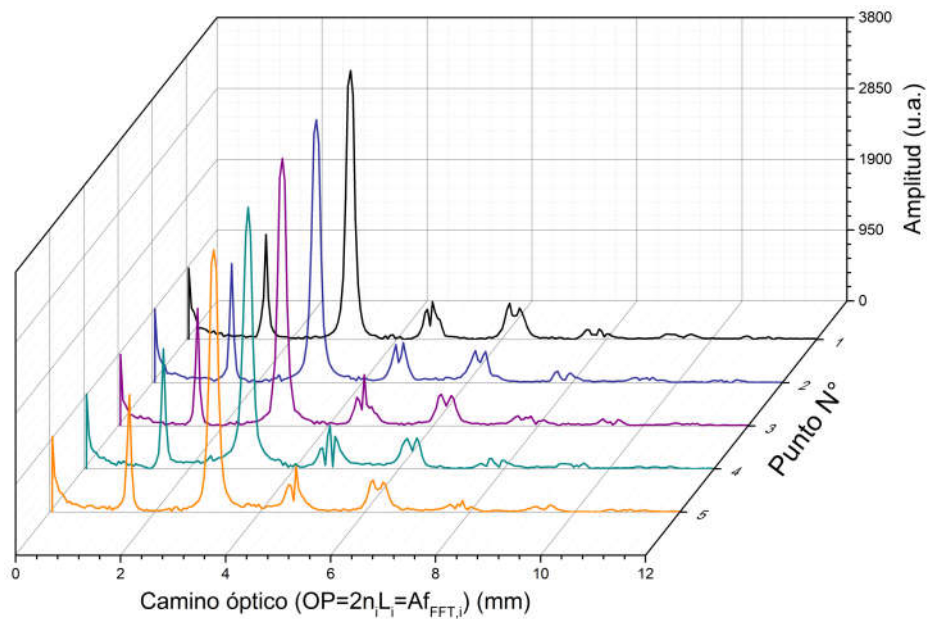


Figura 3.12: Comparación del comportamiento del camino óptico cuando la luz interactúa con una membrana de PDMS en **distintos puntos** a la misma separación ( $L_0 = 1.32mm$ ).



## 3.4. Resultados: Utilización del instrumento para el inmunosensado de anticuerpos asociados con tuberculosis

### 3.4.1. Protocolo experimental para el inmunoensayo

Una vez que las membranas fueron fabricadas, se siguió un proceso similar al protocolo de ELISA indirecto, descrito en la Sección 2.3, para funcionalizarlas y evaluar su comportamiento como plataforma de bioreconocimiento; sin embargo, en este ensayo modificado no es necesario un marcador enzimático (Ac secundario conjugado a fosfatasa) como en el ELISA indirecto. Primeramente cada membrana es colocada en un pozo de una placa de 24 pozos, como las descritas en la Sección 2.4, y posteriormente se realiza el procedimiento mostrado en la Fig. 3.13 y que se describe brevemente a continuación:

1. Inmovilización del antígeno: Para inmovilizar lípidos bioactivos en la superficie de la membrana de PDMS, se colocaron  $300\mu L$  de una mezcla hexano-etanol (1:1, v/v) con una concentración de antígeno de  $8(\mu g/100\mu L)$  en la superficie de ésta y se prosiguió a secar los solventes a  $37^{\circ}C$ .
2. Bloqueo: Los posibles sitios libres fueron bloqueados colocando  $500\mu L$  de 3% BSA en el pozo e incubando la placa por  $120min$  a  $37^{\circ}C$ .
3. Lavados: Para remover todo el material que no está adherido a la superficie de la membrana, se colocó  $1mL$  de PBS en cada pozo y se retiró con una pipeta por la orilla de éste sin entrar en contacto con la membrana, tres veces consecutivas.
4. Incubación de suero: La unión de los anticuerpos a los antígenos fue evaluada colocando  $300\mu L$  de suero (pre-inmune ( $S_P$ ) o hiper-inmune ( $S_H$ )), en una dilución de 1 : 400( $\mu L/\mu L$ ) e incubándolo por una noche a  $4^{\circ}C$ .
5. Lavados: Los lavados se realizan como se describe en el paso 3.
6. Fijación de los anticuerpos: Debido a que las proteínas se desnaturalizan si no están en un medio acuoso y a que el instrumento está diseñado para medir

muestras sólidas, fue necesario recubrir las muestras con paraformaldehído para que las proteínas no sufrieran modificaciones.

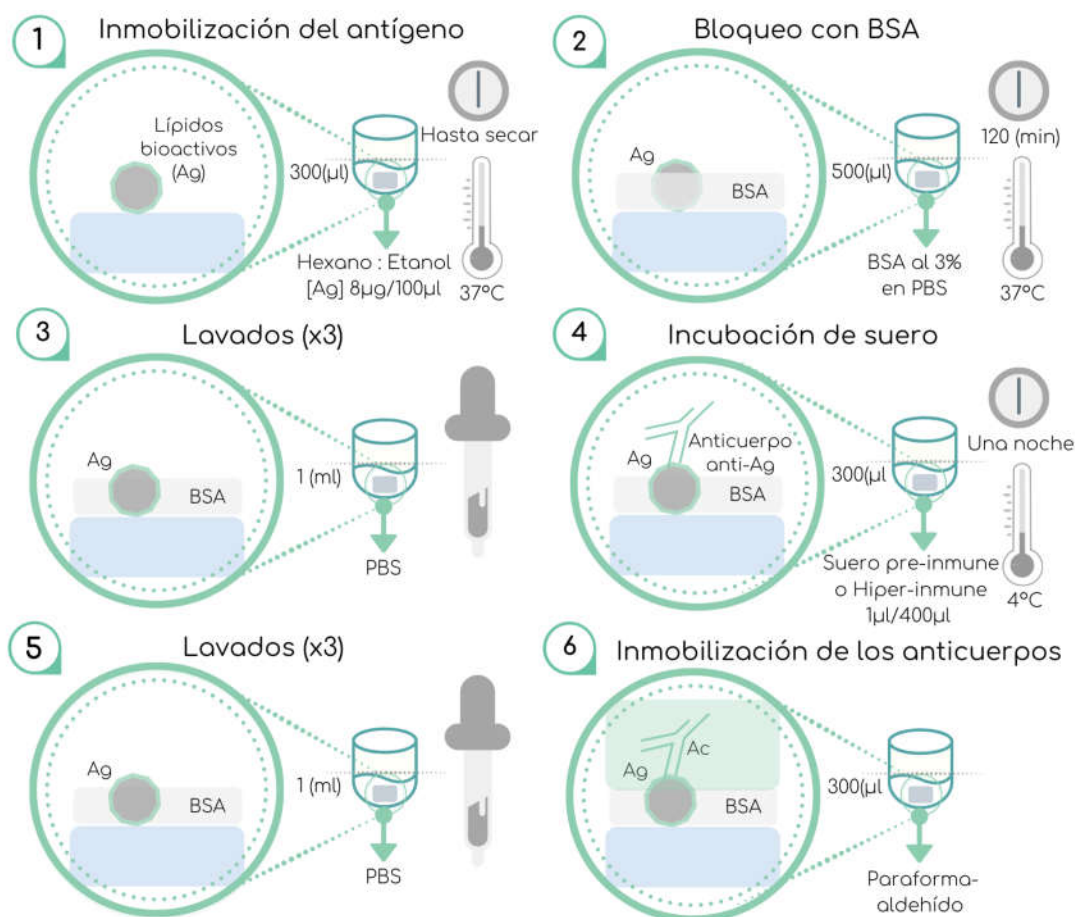


Figura 3.13: Protocolo para la realización del inmunoensayo con el sistema de inmunoensayo desarrollado (ver texto para más detalles).

Hasta la fecha no se tienen precedentes que relacionen la interferometría óptica propuesta en este proyecto con las modificaciones ocasionadas por cada uno de los materiales biológicos a utilizar durante el inmunoensayo (Ag, Ac, PBS, BSA). Debido a esto es importante analizar cada uno de los pasos de dicho ensayo para observar la contribución de cada etapa por separado y así poder considerar discriminarlas de las modificaciones que son de nuestro interés: uniones antígeno-anticuerpo.

Para hacer la diferenciación de las contribuciones de los distintos materiales, lo ideal sería realizar la medición interferométrica durante cada una de las etapas del

procedimiento mostrado en la Fig. 3.13, para lo cual sería necesario mantener la plataforma siempre en un medio acuoso para que los anticuerpos, así como otras proteínas, no se desnaturalicen y se pueda continuar el ensayo hasta la última etapa. Sin embargo, como ya se ha mencionado, el instrumento de inmunosensado desarrollado no está diseñado para la medición en muestras líquidas. Debido a esto, a pesar de que el antígeno utilizado es un glicolípido y no una proteína (por lo que no se necesita tenerlo en un medio acuoso y puede secarse), las etapas subsecuentes no podrían medirse en seco pues las proteínas se desnaturalizarían impidiendo con ello continuar el ensayo. Ante esta dificultad, se optó por recubrir las muestras con paraformaldehído para que las proteínas no sufrieran modificaciones y con ello poder monitorear las distintas etapas del inmunosensado (ver Anexo C).

Cabe señalar que este protocolo de fijación no permite que la misma muestra se utilice en la etapa subsecuente del inmunoensayo, ya que el paraformaldehído cubre por completo al material adherido a la membrana de PDMS, impidiendo con ello cualquier posible interacción con algún agente externo. Debido a esto, se necesitan muestras distintas para analizar los diferentes casos de interés (Tabla 3.1). El análisis y comparación de todas estos casos permitirá discriminar la aportación que tiene cada uno de los componentes biológicos en el inmunoensayo. A todas estas muestras analizadas por interferometría óptica, se les realizaron 3 mediciones en 5 puntos diferentes de la membrana para comprobar su homogeneidad. Y, en cada uno de estos puntos, se realizaron mediciones a 10 alturas diferentes de la FO para observar el efecto que tiene este parámetro en la respuesta espectral.

Caso	Materiales involucrados
1	Portamuestras (PM)
2	PM + membrana de PDMS
3	PM + PDMS + Antígeno inmovilizado (Ag) (Paso 1 de la Fig. 3.13)
4*	PM + PDMS+ Ag+ BSA (Paso 2 de la Fig. 3.13)
5*	PM + PDMS+ Ag+ BSA + Suero (Paso 6 de la Fig. 3.13)

Tabla 3.1: Casos a analizar con el instrumento de inmunosensado. Para los casos marcados con \*, las mediciones interferométricas se realizaron después de fijar la muestra con paraformaldehído.

Cada uno de los casos mostrados en la Tabla 3.1 se analizaron bajo tres condiciones diferentes, mostradas en la Tabla 3.2. La tercera condición ( $S_{SA}$ ) se analizó con el objetivo de verificar que los resultados obtenidos con plataformas funcionalizadas expuestas a ambos sueros son debidos únicamente a la interacción antígeno-anticuerpos y que por ende la funcionalización del polímero es indispensable para el reconocimiento de los anticuerpos. De esta manera, se espera que la membrana de PDMS sin antígeno no permita la detección de anticuerpos, mientras que las plataformas funcionalizadas reconozcan más anticuerpos con el suero  $S_H$  que con el  $S_P$  y permitan así su diferenciación. Todas estas pruebas se realizaron por triplicado, como se hace en un ELISA convencional, por lo que 36 muestras fueron analizadas (3 condiciones ( $S_{SA}$ ,  $S_H$ ,  $S_P$ ) x 4 casos (Tabla 3.1, exceptuando el caso 1) x 3 muestras).

Condición	Plataforma	Suero
$S_P$	Funcionalizada	$S_P$
$S_H$	Funcionalizada	$S_H$
$S_{SA}$	No funcionalizada	$S_H$

Tabla 3.2: Casos a analizar con el instrumento de inmunoensayo.

Como consideraciones previas a la realización de las mediciones, se tomó en cuenta que es posible que las muestras se contaminen debido a los residuos que pudieran quedar en el portamuestras, por lo que se utilizó un portamuestras diferente para cada uno de los casos analizados. De esta manera, cada portamuestras está únicamente en contacto con muestras que involucran los mismos materiales correspondientes a cada uno de los casos, minimizando con ello el riesgo de contaminación. De igual manera, antes de colocar la membrana de PDMS en el portamuestras se realizó el proceso de calibración descrito anteriormente. Para iniciar, se posicionó la fibra a  $320\mu m$  del portamuestras, que es el espesor aproximado de las membranas, y se elevó  $1mm$  más para garantizar que, aún con la adherencia de los distintos materiales biológicos, se realicen lecturas sin contacto. Una vez calibrada la distancia, se ajustó la inclinación de la FO con el goniómetro hasta maximizar la amplitud del interferograma. Esta condición se busca con el fin de garantizar que la luz incide perpendicularmente en la muestra. Una vez calibrado el instrumento como se ha descrito y caracterizados los portamuestras, se realizaron las mediciones sobre las 36 membranas a analizar.

### 3.4.2. Comparación de la respuesta de las diferentes etapas del inmunoensayo

Para la comparación de la respuesta de las diferentes etapas del inmunoensayo, la lógica del análisis de las muestras se basa en asociar la contribución de cada uno de los materiales biológicos a cambios en la FFT del patrón de interferencia adquirido experimentalmente. Esto fundamentado en que cada material biológico agregado a la membrana de PDMS genera modificaciones en el espesor e índice de refracción de la superficie de ésta, lo cual provoca cambios en el camino óptico que experimenta la luz dentro del FPI. Considerando que el procedimiento del inmunoensayo involucra la adición de un material biológico diferente en cada una de sus etapas, se espera observar en la FFT una respuesta que sea el resultado acumulativo de estas contribuciones.

Tomando en consideración que se desconoce la mínima concentración de anticuerpos que el instrumento implementado es capaz de sensar, se decidió comenzar con el análisis las muestras de suero hiper-inmune ( $S_H$ ). Esta elección es con el objetivo de poder garantizar la existencia de un número considerable de anticuerpos en el suero y con esto colocarse en el caso donde la detección sería más factible. Dado que las membranas son homogéneas, para el análisis primero se consideraron únicamente las mediciones realizadas en un solo punto. Así mismo, para hacer una primera aproximación, en todos los casos los experimentos se realizaron manteniendo constante la separación entre la FO y la membrana ( $L_0 = 1.32mm$ ). Los resultados se muestran en la Fig. 3.14, en donde se aprecia que efectivamente el camino óptico que la luz experimenta es diferente para cada caso, lo cual se asocia a los distintos materiales biológicos que se involucran en cada una de ellos.

Al tener dos cavidades, una formada por la fibra y la superficie de la membrana y la otra por la membrana en sí, una forma de discriminar la aportación de la primera cavidad es modificando su longitud. Para ello, se varió la distancia entre la fibra y la membrana ( $L_0$ ), obteniendo el resultado que se muestra en la Fig. 3.15. En ésta se puede observar que, de forma similar a cuando la luz sólo interactúa con el portamuestras (Fig. 3.9), sigue habiendo un corrimiento hacia la derecha, sin embargo,

a diferencia de cuando el FPI es de una cavidad, comienzan a existir interacciones entre las diferentes componentes de la FFT que complican el análisis de estas señales.

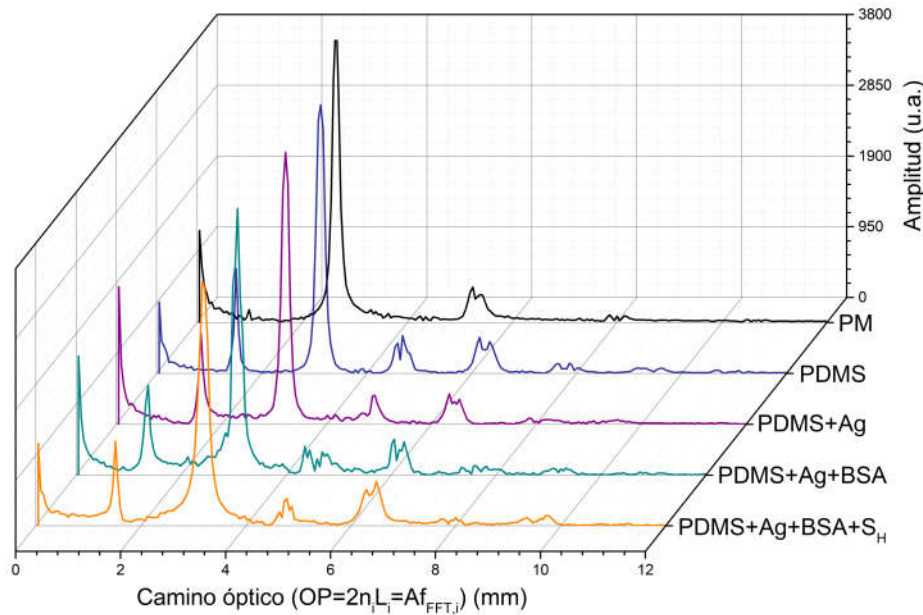


Figura 3.14: Comparación del comportamiento del camino óptico en la plataforma de bioconocimiento para los distintos casos de la Tabla 3.1, al evaluar suero hiperinmune ( $S_H$ ), a una distancia de  $L_0 = 1.32mm$ .

Con los resultados obtenidos no es posible identificar cuantitativamente el efecto de cada material biológico adherido a la plataforma en función del camino óptico, ya que se crean diferentes cavidades, cuyas respuestas interactúan entre sí (como indican las flechas de la Fig. 3.15) formando múltiples componentes que no pueden ser atribuidas a un material en específico. Sin embargo, aunque el análisis cuantitativo no es trivial, hay que destacar que estos resultados preliminares permiten hacer un análisis cualitativo, bajo el cual se puede concluir que:

- Los materiales biológicos utilizados sí tienen un efecto en las propiedades de la membrana de PDMS funcionalizada, ya que las respuestas que se obtienen con las membranas para las diferentes etapas del ensayo no son iguales y tampoco se asemejan a la señal obtenida con la membrana original.
- Sí hay una diferencia significativa entre las respuestas obtenidas para cuando la plataforma sólo tiene inmovilizado el Ag y cuando se ha agregado el suero

con anticuerpos. Esto se puede apreciar mejor en la Figura 3.15 (b), (d) y (e), en donde se muestra la comparación directa entre algunas de las componentes espectrales que cambian al agregar el suero hiperinmune.

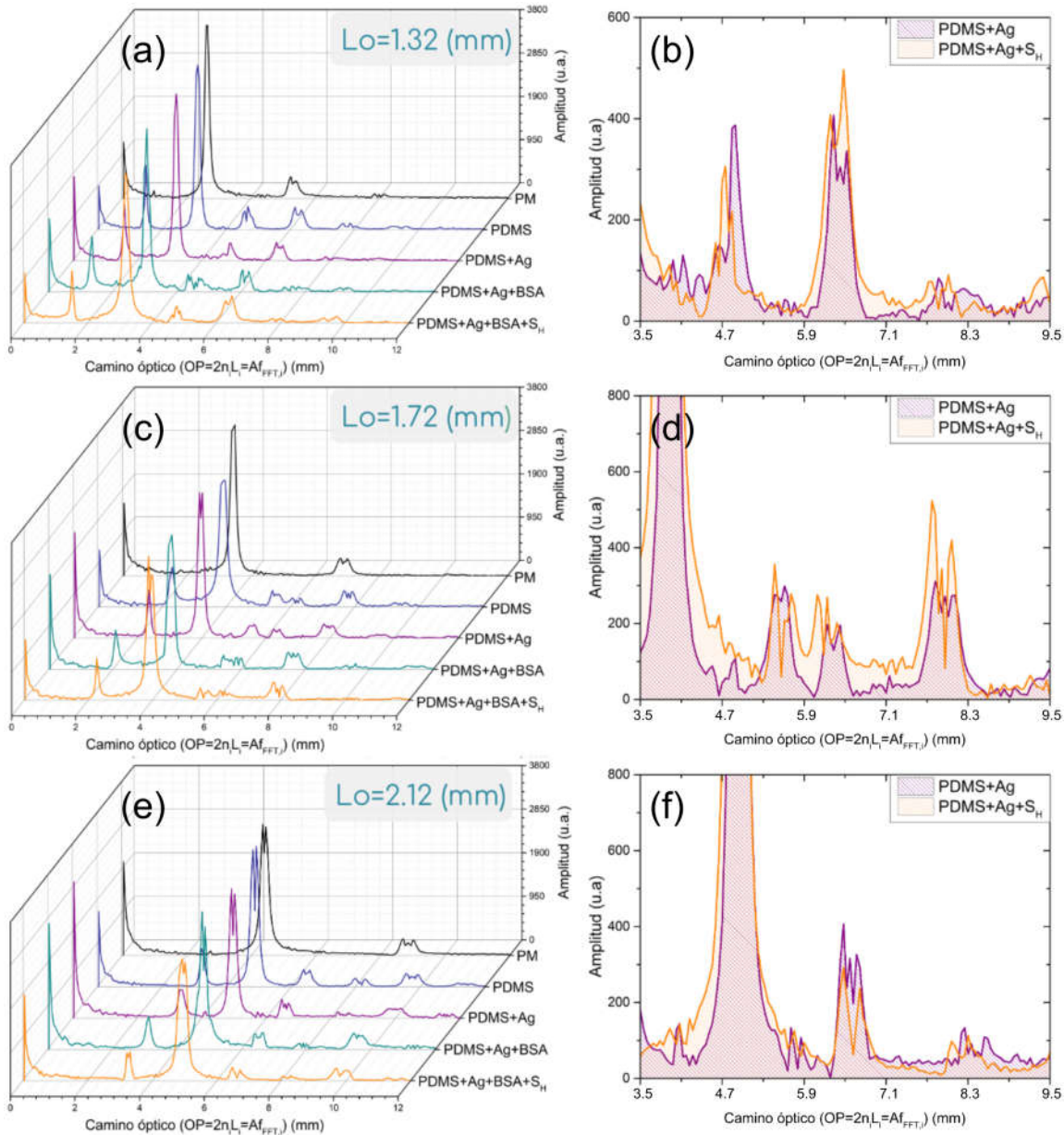


Figura 3.15: Comparación de la FFT que se obtiene de los interferogramas generados en la plataforma de bioreconocimiento para los distintos casos de la Tabla 3.1, al evaluar suero hiper-inmune ( $S_H$ ), a diferentes distancias entre la FO y la membrana de PDMS (gráficas a,c,d). Comparación directa entre las señales obtenidas para la plataforma de PDMS+Ag antes y después de agregar el suero hiperinmune, para ejemplificar el efecto que el suero tiene (gráficas b,d y f).

- Existe una distancia  $L$  en donde el compromiso entre el efecto cruzado entre las cavidades y la identificación correcta de las aportaciones de cada material se optimiza; en este caso es  $L_0 = 1.32mm + 0.4mm = 1.72(mm)$  en donde, como se muestra en la Fig. 3.15 (d), se pueden apreciar las componentes sin estar traslapadas y maximizan la diferencia entre las señales respectivas a cuando hay ausencia y presencia de suero.

Partiendo de estas conclusiones obtenidas con el análisis de las muestras con  $S_H$ , en el que la detección de anticuerpos debería ser más factible, se procedió a hacer el análisis estadístico de todas las muestras medidas para cada uno de los casos a analizar ( $S_{SA}, S_P, S_H$ ) a una distancia  $L = 1.72mm$ .

### 3.4.3. Resultados del inmunoensayo para las diferentes muestras analizadas

Para cada uno de los casos se analizaron 3 muestras y las mediciones realizadas en 5 puntos diferentes de cada una de éstas, a una  $L = 1.72mm$ , para poder apreciar cada una de las componentes sin que se traslapen. Posteriormente, se calculó el promedio y el error estándar para cada condición de la Tabla 3.2 ( $S_{SA}, S_P, S_H$ ). En la Fig. 3.16 se muestran los resultados de los inmunoensayos realizados para dichas condiciones. Para comprobar que el resultado final se debe únicamente a la interacción antígeno-anticuerpo y no a materiales adheridos en etapas previas, en esta figura se incluyen los resultados correspondientes a la etapa previa (Caso 4\*).

Primeramente, en la Fig. 3.16 puede observarse que la respuesta obtenida para cuando la plataforma ha sido bloqueada con BSA, antes y después de ser expuesta a las muestras de suero (caso 4 y 5 de la Tabla 4.1, respectivamente), presenta un corrimiento hacia la derecha independientemente del caso analizado para cuando el suero ha sido agregado. Esto se debe a la generación de una capa adicional en la plataforma de bioreconocimiento, la cual se debe a la incorporación de sueros y su posterior fijación con paraformaldehído, los cuales incrementan el tamaño de la cavidad. Aunque este desplazamiento es apreciable en toda el rango representado, el análisis se



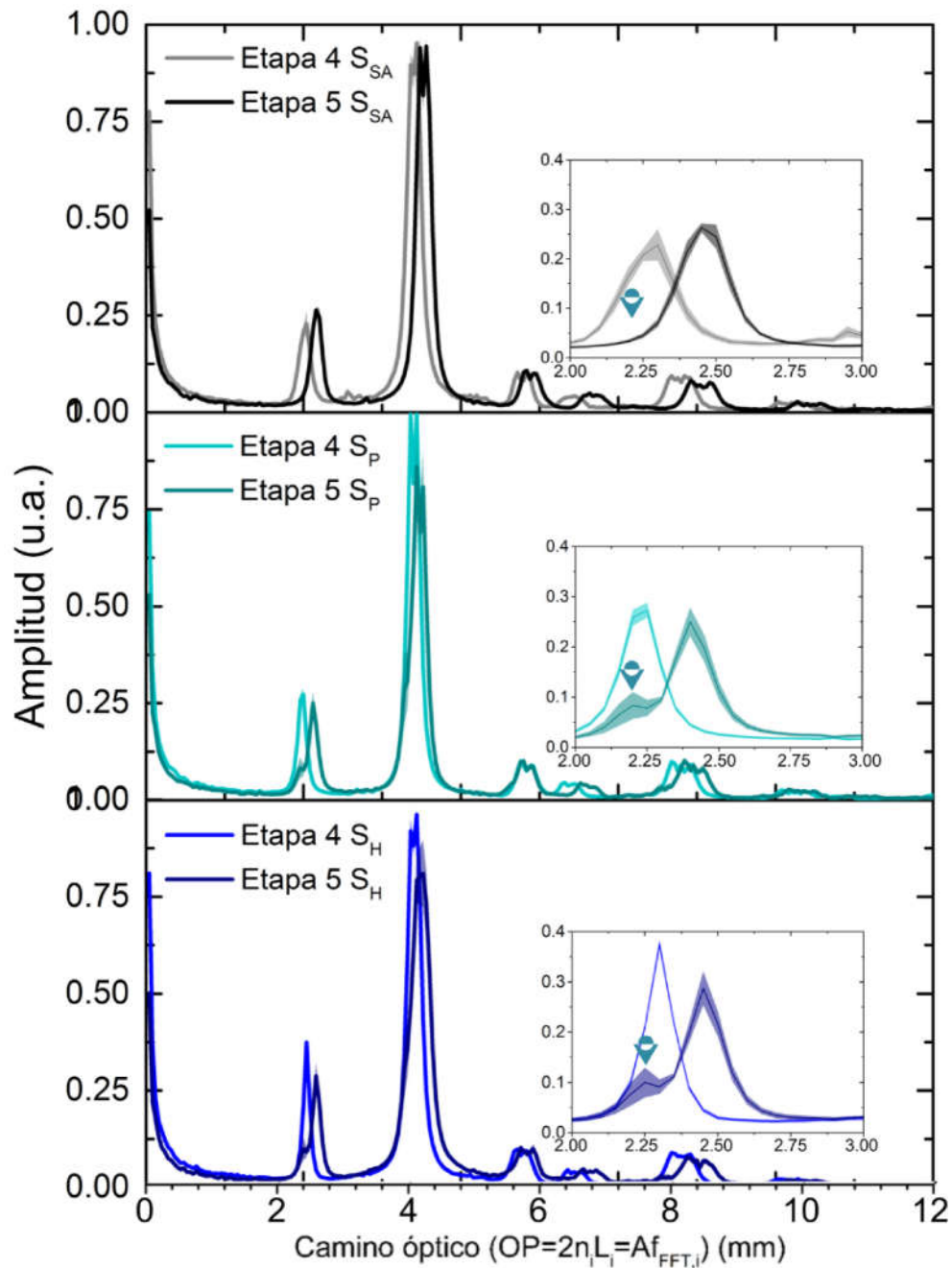


Figura 3.16: Comparación de la respuesta para la plataforma bloqueada (caso 4 de la Tabla 3.1) y con suero (caso 5 de la Tabla 3.1) de los inmunoensayos, realizados con una plataforma sin funcionalización ( $S_{SA}$ ) y plataformas funcionalizadas para el reconocimiento de anticuerpos en suero pre-inmune ( $S_P$ ) e hiper-inmune ( $S_H$ ). Las gráficas muestran el promedio y el error estándar de las mediciones en 5 puntos para 3 muestras analizadas a una  $L = 1.72\text{mm}$ . Los recuadros muestran de forma más clara las componentes que sufren mayor cambio, las cuales se encuentran en el rango de  $2 - 3\text{mm}$ ; y las flechas indican la generación de nuevas componentes.

enfocó en la primera componente de la FFT (pico cercano a  $OP = 2.55mm$ ), ya que es la debida a la membrana de PDMS y a que las demás componentes son armónicos e interacciones de las otras componentes principales. Al analizar esta componente, además del desplazamiento presente en todos los casos, es evidente que para los casos de  $S_P$  y  $S_H$  existe una componente adicional del lado izquierdo, lo cual se indica con las flechas incluidas en la Fig. 3.16, la cual no está presente en el caso en el que la membrana de PDMS que no ha sido funcionalizada con el antígeno. La generación de esta nueva componente podría asociarse al reconocimiento de los anticuerpos por parte de los antígenos inmovilizados en el polímero. Esto podría corroborarse al no existir esta componente para cuando el PDMS no ha sido funcionalizado. Considerando este resultado se puede concluir que la componente adicional presente en las señales obtenidas para  $S_P$  y  $S_H$  son debidas únicamente a la interacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, a pesar de que el inmunosensor desarrollado es capaz de detectar correctamente la presencia de suero con anticuerpos, al comparar las señales obtenidas para  $S_P$  y  $S_H$  no hay un cambio significativo en ninguna de las figuras cuantificables (las más representativas se muestran en la Tabla 3.3), por lo cual la diferenciación de sueros de manera adecuada no es posible.

Parámetro	$S_P$	$S_H$	$ (S_P - S_H/S_P) x100$
$OP_1, OP_2$ (mm)	2.20, 2.40	2.25, 2.45	2.3 %, 2.08 %
$Amplitud_1, Amplitud_2$ (u.a.)	0.09, 0.25	0.1, 0.28	11 %, 12 %
Corrimiento de $OP_2^*$ (nm)	0.17	0.15	11 %

Tabla 3.3: Comparación de los parámetros cuantificables en la Etapa 5 para la posible diferenciación entre sueros pre e hiper-inmune. El \* indica que este valor es con respecto a la Etapa 4.

### 3.5. Evaluación del instrumento de inmunosensado como posible herramienta de diagnóstico de TB

Evaluando el desempeño del instrumento de inmunosensado implementado, es posible decir que, a pesar de que es posible medir cambios relativos durante el proceso del inmunoensayo, los resultados finales prueban que el instrumento no permite la diferenciación de los sueros pre-inmune e hiper-inmune (que en conejo modelan la diferencia

entre un individuo sano y uno infectado con TB), por lo que no podría ser utilizado para el correcto diagnóstico de tuberculosis con el diseño originalmente propuesto. Estas dificultades para la diferenciación de los sueros, se deben primordialmente a que las mediciones que se realizan en las diferentes posiciones de las membranas son muy puntuales. Esto es una dificultad debido a que, considerando que el área de la muestra con la que la luz interactúa es muy pequeña ( $\approx 544\mu m$ ) y que la funcionalización de la membrana no se realiza de manera homogénea, las mediciones podrían estarse realizando en lugares en donde no hay antígenos, y por ende no habría reconocimiento de anticuerpos. Una manera de mejorar este inconveniente sería buscando otro método para depositar los lípidos bioactivos en la superficie de PDMS que asegure una mayor homogeneidad en la funcionalización; sin embargo, esto implicaría un procedimiento más complejo que el recubrimiento por goteo. Otra posible mejora en la detección podría lograrse realizando un escaneo en toda la muestra para asegurar la detección de complejos antígeno-anticuerpo; pero esto no es una solución atractiva debido a que implica el uso de más recursos computacionales y más tiempo de lectura. También podrían utilizarse fibras con núcleo más grande (multimodales) para incrementar el área en el que la luz interactúa con la muestra. Sin embargo, eso significaría modificar por completo la adquisición y análisis de los patrones de interferencia, para lo cual se necesitaría implementar el *Milmetrix* utilizando de una fuente de luz blanca, un OSA y fibras multimodales. Ante estos inconvenientes, puede concluirse que la mayor limitante del instrumento de inmunosensado desarrollado es su resolución espacial (por encima de la necesaria) y que no hay una alternativa que asegure o incremente la detección de uniones Ag-Ac que pueda ser implementada fácilmente.

Aunado a esta limitación, hay varios aspectos generales sobre el instrumento que permitirían mejorar su desempeño en aplicaciones de inmunosensado. Primeramente, si bien es cierto que el diseño y desarrollo de este inmunosensor son sencillos, el análisis de la respuesta espectral obtenida no es tan simple. Esto se debe a que, en un principio se consideró un modelo con una sola cavidad; sin embargo, el que el PDMS sea un material transparente produce otra cavidad adicional que no fue contemplada durante el diseño del instrumento. Debido a esto, se tiene una serie de componentes

adicionales en la transformada de Fourier (debido a los armónicos y las interacciones de la componentes fundamentales) que no permiten discernir correctamente el efecto de cada uno de los elementos biológicos involucrados en el inmunoensayo. De esta manera el instrumento permite un análisis cualitativo, pero no permite cuantificar, y con ello discriminar, los efectos que no se produzcan por la interacción antígeno-anticuerpo. En este sentido, es importante decir que una forma de mejorar esta desventaja es considerar que existe una distancia  $L$  en donde el compromiso entre el efecto cruzado entre las cavidades y la identificación correcta de las aportaciones de cada material se optimiza. Así mismo, el desarrollo de un modelo teórico con más cavidades que permita entender de mejor manera las señales obtenidas podría ayudar significativamente al entendimiento de las respuestas espectrales obtenidas.

Otro aspecto que podría explorarse es la modificación del instrumento de inmunosensado para que pueda realizar mediciones en líquido y en tiempo real. Con esto podría evitarse la fijación con paraformaldehído que, si bien minimiza las modificaciones que pudieran sufrir los anticuerpos en las muestras sólidas (secas), es un material que genera una cavidad adicional en las mediciones interfiriendo con ello en el inmunosensado. Para esta alternativa podría diseñarse una pieza en la que se coloque la fibra óptica y que permita la lectura dentro de las placas de pozos en donde se hace el inmunoensayo. Sin embargo, la placa de pozos por sí misma, el recubrimiento que ésta tiene y la superficie en donde se soporte, serían más cavidades adicionales a las debidas a los materiales biológicos; complicando con ello aún más el análisis de los resultados. Así mismo, no se podrían hacer mediciones controlando o modificando la posición de la fibra ya que varios de los pasos del inmunoensayo involucran incubación, por lo que sería necesario introducir todo el instrumento (a excepción del interrogador) dentro de la incubadora, la cual no es una alternativa viable.

Si bien el instrumento desarrollado presenta algunos inconvenientes para realizar inmunosensado, la concordancia entre los resultados teóricos y experimentales del caso cuando la cavidad está formada por la fibra óptica y el portamuestras, así como la calibración realizada para esta configuración, permiten concluir que el instrumento funciona correctamente para el diseño original en el que se miden muestras sólidas

(de una o más cavidades FP). Debido a esto, el *Milmetrix* podría ser utilizado para hacer mediciones de espesor e índice de refracción de superficies, que involucran configuraciones similares. Prueba de ello es que, a la par del proyecto presentado en este trabajo, el instrumento de inmunosensado desarrollado ha sido utilizado en otras aplicaciones, como lo son la evaluación del efecto de la escritura láser sobre superficies de grafeno oxidado y la caracterización de guías de onda de PDMS; las cuales se muestran brevemente en el Anexo D.

Considerando toda esta evaluación, es posible decir que este esquema básico implementado no cuenta con las características necesarias para brindar un diagnóstico de tuberculosis; sin embargo, ha sido un buen precedente para validar el principio de operación de un inmunosensor FP y analizar los factores a mejorar para que permita la correcta diferenciación de sueros. En este sentido, ha quedado evidenciado que para que esto suceda, un mejor diseño del inmunosensor debe considerar:

- Evitar tener cavidades adicionales a la que representa el inmunosensor. El tener una sola cavidad facilitará el análisis y entendimiento de las señales obtenidas durante el inmunoensayo.
- Permitir realizar mediciones en líquido, para con ello poder hacer un monitoreo en tiempo real y evitar la desnaturalización de los anticuerpos y la necesidad de fijarlos.
- Que la plataforma de bioreconocimiento esté integrada a la fibra óptica. Esto, además de proporcionar un dispositivo de dimensiones pequeñas, permitiría monitorear los pocesos dentro de la incubadora y solventaría el problema de la resolución.

Tomando estos aspectos en cuenta, se decidió que el realizar un inmunosensor depositando una pequeña cantidad de PDMS en en el extremo de una fibra óptica, sería una alternativa con gran potencial para cumplir con las mejoras planteadas. Comparación de los parámetros cuantificables en la Etapa 5 para la posible diferenciación entre sueros pre e hiper-inmune.

# Capítulo 4

## Desarrollo de un inmunosensor

### FPI-FO en la punta de la fibra óptica

Hasta ahora, el método de fabricación más simple para crear un FPI en la punta de una fibra óptica es hacer un depósito polimérico en ésta, por medio de una técnica recubrimiento por inmersión (*'dip-coating', en inglés*). Estos sensores, también denominados *'end-capped'*, han mostrado tener buen potencial para mediciones de índice de refracción y temperatura del medio en el que sean sumergidos [45, 45, 47–51]. Por esto y por la facilidad con la que pueden ser fabricados, se decidió tomar este concepto para el diseño y desarrollo del inmunosensor que se presenta en este capítulo.

Para la fabricación de este tipo de sensores, la fibra óptica se sumerge de forma vertical en una gota de polímero y se extrae a una velocidad constante para obtener un depósito semiesférico en la punta de la fibra. Posteriormente, el polímero se solidifica de tal forma que la cavidad interferométrica queda formada por esta capa polimérica [45]. En la Fig. 4.1 se muestra una representación esquemática general de los elementos necesarios para la implementación de un inmunosensor *'end-capped'* (a), así como una representación de los elementos que conforman el FPI-FO fabricado en la punta de la fibra óptica (b). En la Fig. 4.1 (a), puede apreciarse que para la interrogación, detección y análisis de los patrones de interferencia producidos por el sensor se requieren los mismos elementos que para el instrumento de inmunosensado presentado en el capítulo anterior (Fig. 3.1); siendo la única diferencia el sensor utili-

zado. En la última parte de la figura (Fig. 4.1 (b)) puede apreciarse que la cavidad FP está formado por dos superficies reflejantes: el extremo de la fibra óptica y la superficie del depósito del polímero (con coeficientes de reflexión  $r_1$  y  $r_2$  respectivamente). Ambas superficies están separadas por la capa de polímero, con una longitud  $L_0$  e índice de refracción  $n_1$ . Considerando este arreglo, el patrón de interferencia reflejado por estará dada por las Ecuaciones 3.1 y 3.2, presentadas en la Sección 3.1.

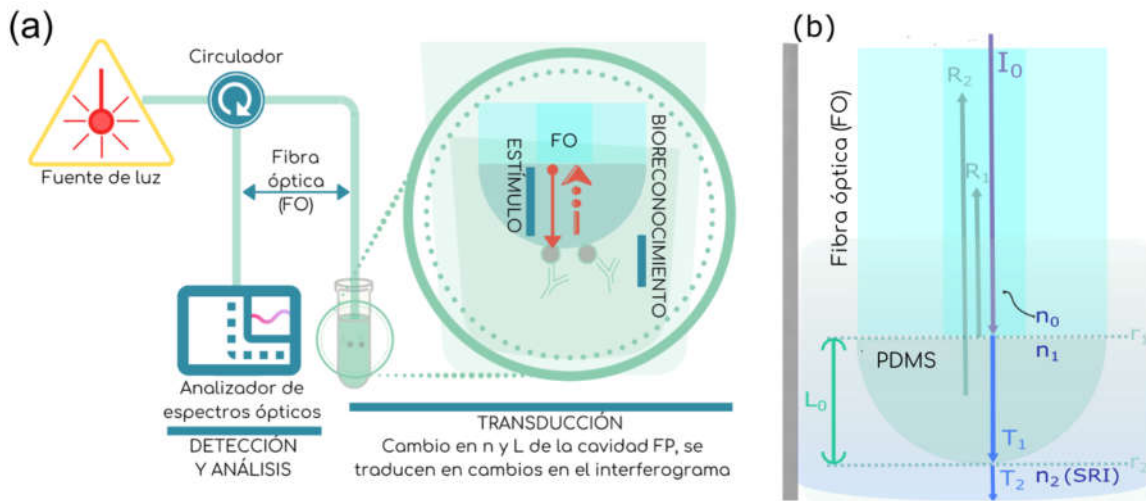


Figura 4.1: Esquema básico del inmunosensor propuesto: (a) Diagrama experimental para su implementación e (b) indicación de las superficies reflejantes, el extremo de una FO y la superficie de la muestra, así como los parámetros correspondiente al interferómetro FP.

De acuerdo a estas ecuaciones y al arreglo experimental propuesto, el patrón de interferencia únicamente dependerá del cambio en el tamaño e índice de refracción de la capa de polímero depositada ( $L_0, n_1$ ), y del índice de refracción del medio en el que el sensor sea sumergido ( $n_2$ ). En este sentido, para el uso de este dispositivo como inmunosensor, los parámetros a analizar son el cambio en la longitud ( $\Delta L_0$ ), y el cambio en el índice de refracción ( $\Delta n_2$ ), el cual cambia el coeficiente de reflexión de la superficie del polímero, ya que son los que pueden ser modificados debido a la adhesión de los materiales biológicos utilizados durante el inmunoensayo.

## 4.1. Diseño y desarrollo del inmunosensor

Para la fabricación de este tipo de sensores, la literatura reporta un método de recubrimiento por inmersión horizontal. En este método típicamente se utilizan dos fibras ópticas, una mojada con el polímero y la otra en la que se desea hacer la cavidad FP, las cuales se alinean de frente de forma horizontal y se ponen en contacto el número de veces necesario para obtener el tamaño de cavidad deseado [45,45,47–51]. Con este método existen varios efectos que complican la obtención de sensores con dimensiones repetibles; un ejemplo son los efectos térmicos, que provocan que la gota de polímero se desplace a lo largo de la fibra óptica por el efecto Marangoni [75]. Teniendo esto en consideración, a pesar de que sí hay algunos reportes en los que el PDMS es el polímero depositado, la mayoría de sensores basados en este principio están fabricados con polímeros curables con luz UV, ya que al solidificar de forma casi inmediata reducen los efectos antes mencionados. De esta manera, el reto para esta aplicación es la fabricación de sensores depositando PDMS en la punta de una fibra óptica de manera controlada para obtener sensores con características similares; es decir, establecer una metodología de fabricación que proporcione resultados repetibles. Esto es de suma importancia ya que la respuesta espectral depende de la longitud de la capa polimérica ( $L_0$ ), por lo que si se obtienen dispositivos con dimensiones similares es posible obtener un patrón de interferencia específico, el cual pueda considerarse como característico para todos los sensores fabricados. En el caso particular del inmunosensado, es importante que  $L_0$  se mantenga constante para que los cambios debidos a los materiales biológicos puedan ser evaluados y discriminados de la misma manera para todos los dispositivos. Para lograr dicha condición, en este trabajo se propone un nuevo método de fabricación en el cual se incrementa la viscosidad del PDMS para poder hacer un recubrimiento por inmersión de forma vertical y controlado.

En este método de fabricación se utiliza una mezcla de PDMS con curante que se prepara siguiendo el mismo procedimiento que en experimentos previos (10:1 en peso, mezclado y sin burbujas) para hacer el recubrimiento por inmersión. Para au-



mentar la viscosidad del polímero y evitar el efecto Marangoni, la mezcla preparada de (PDMS+curante) se somete a un proceso de pre-curado. Este proceso se realiza colocando una gota del polímero en un portaobjetos de vidrio colocado en una plancha térmica con temperatura controlada. La mezcla se calienta a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos y posteriormente se realizó el recubrimiento polimérico en la punta (cortada y limpia) de una fibra óptica monomodal estándar (SMF-28), sumergiendo ésta de forma vertical en la gota de PDMS pre-curado. El recubrimiento por inmersión se realizó con un sistema controlado por computadora para el posicionamiento y extracción de la fibra, así como para establecer las velocidades apropiadas para mover la punta de la fibra hacia adentro y hacia afuera del PDMS pre-curado. Basado en experimentos previos para el análisis de líquidos en puntas de fibra óptica [75], la velocidad de desplazamiento de la fibra se ajustó a  $1.7\text{mm/s}$ , con lo que se pudo obtener una capa de PDMS semiesférica en la punta de la fibra óptica. Finalmente, el sensor con el recubrimiento polimérico se colocó verticalmente en un horno a  $180^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos para solidificar el PDMS. En la Fig. 4.2 se muestra un diagrama con el arreglo experimental utilizado para la fabricación de los sensores (de aquí en adelante denominado 'End-TB'). Como puede observarse en esta figura, además del control de temperatura y el sistema motorizado para el proceso de pre-curado y el posicionamiento de la fibra ya mencionados, se utilizó un sistema de visualización y el interrogador SM125 para monitorear, el espesor y el índice de refracción del recubrimiento polimérico durante el proceso de fabricación, por medio de imágenes y patrones de interferencia, respectivamente. Adicionalmente, en este diagrama experimental se utilizó un sujetador de FO fijado en un goniómetro para asegurar que la fibra se sumergiera de forma perpendicular en la gota de PDMS pre-curado.

#### 4.1.1. Instrumentación virtual

Para poder llevar a cabo el proceso de fabricación y el monitoreo de los sensores, se realizó un instrumento virtual que pudiera controlar y sincronizar los diferentes sistemas que conforman el arreglo experimental. Este instrumento virtual está diseñado para cubrir las siguientes funciones:

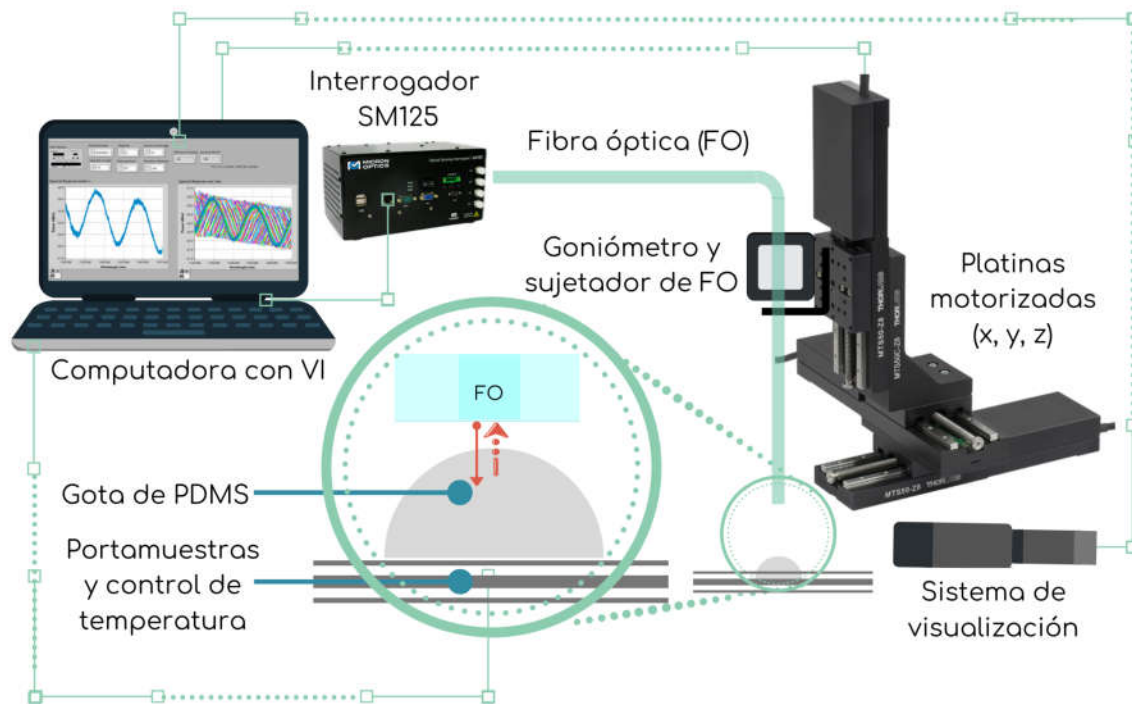


Figura 4.2: Diagrama experimental para la fabricación del sensor 'End-TB' (ver más detalles en el texto)

- Comunicación, control y sincronización de todos los sistemas del arreglo experimental (motores, visualización, adquisición de la respuesta espectral y control y monitoreo de la temperatura).
- Control automatizado de los motores para mover la fibra óptica a la posición deseada con una velocidad determinada, para recubrir las puntas de fibra óptica con el polímero.
- Adquisición y almacenamiento automáticos y en tiempo real de los patrones de interferencia e imágenes del sensor durante el proceso de fabricación.
- Control de temperatura para pre-curar el PDMS a la temperatura y por el tiempo deseados, así como para mantener la temperatura constante mientras se realizan las mediciones que así lo requieran.
- Adquisición y almacenamiento automáticos de los patrones de interferencia durante los experimentos de sensado.

En la Fig. 4.3 se muestra el esquema general de las funciones, tanto físicas como virtuales del arreglo experimental, y la interacción entre éstas.

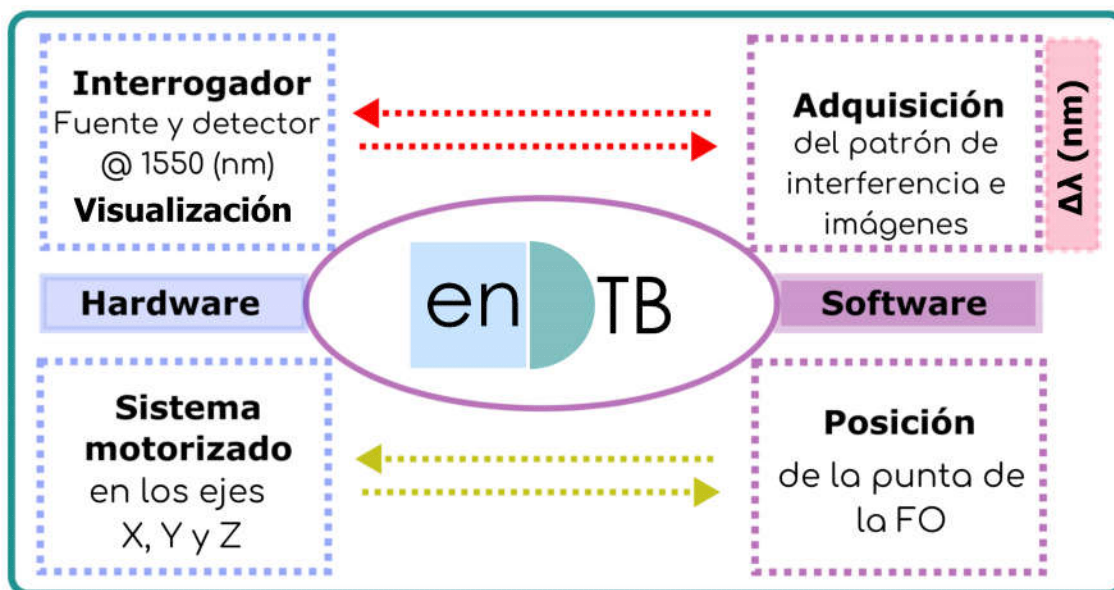


Figura 4.3: Esquema de las funciones físicas y virtuales que realiza el arreglo experimental utilizado para la fabricación de los sensores *End-TB*.

#### 4.1.2. Análisis del patrón de interferencia

Debido a que el sensor desarrollado consta de una sola cavidad, a diferencia del análisis realizado para los patrones de interferencia adquiridos con el *Milmetrix*, no es necesario realizar la *FFT* para discernir entre contribuciones debidas a diferentes cavidades. Es por ello que, considerando que los cambios en la superficie del sensor ocasionarán un incremento en el camino óptico y con ello un corrimiento espectral, se utilizó la correlación cruzada para obtener el desplazamiento espectral ( $\Delta\lambda$ ). La correlación cruzada mide la similitud entre dos señales y es comúnmente utilizada para obtener el retardo entre éstas con respecto al eje  $x$ . En este caso en particular, la correlación cruzada se utilizó para medir el  $\Delta\lambda$  entre el patrón de interferencia de referencia ( $t = 0$ ) y el tomado a un tiempo distinto. Para los experimentos realizados, el cálculo se realizó en *Matlab*, considerando muestras adquiridas cada 30 segundos para así obtener una gráfica de  $\Delta\lambda$  en función del tiempo. La Fig. 4.4 muestra el  $\Delta\lambda$

de los patrones de interferencia y un ejemplo de la variación de este parámetro en función del tiempo.

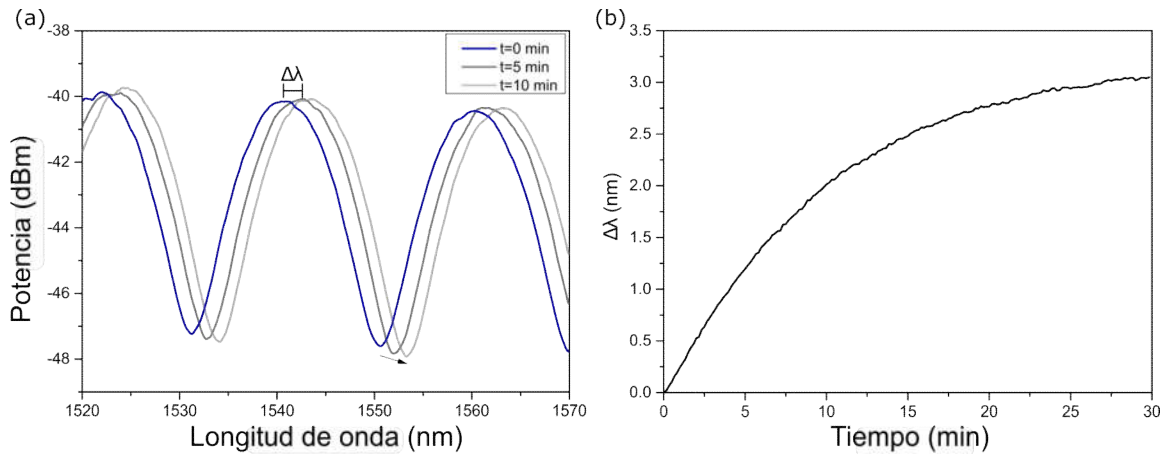


Figura 4.4: Análisis del corrimiento espectral de los patrones de interferencia para cuantificar los cambios en la superficie del sensor: (a) patrones de interferencia adquiridos para distintos tiempos y (b) evolución del corrimiento espectral obtenido por correlación cruzada.

Para poder tener una mejor visualización de cómo varía el patrón de interferencia en función del tiempo se obtuvieron mapas de colores. El mapa de colores corresponde a la vista superior de la gráfica 3D ( $\lambda$  (nm), potencia (dBm), tiempo (min)) generada con los patrones de interferencia obtenidos a lo largo del tiempo. La Fig. 4.5 ejemplifica la gráfica 3D obtenida de apilar los patrones de interferencia en función del tiempo (a) y el mapa de colores asociado a la vista superior de esta gráfica 3D (b). Estos mapas de color permiten visualizar de manera más simple la evolución temporal del patrón de interferencia. Como puede apreciarse en la Fig. 4.5 (b), del mapa de color obtenido de la gráfica en 3D se pueden obtener los perfiles horizontales deseados, que correspondería al patrón de interferencia en ese instante (mosaico superior), o los perfiles verticales, los cuales proporcionan la evolución de la potencia en función del tiempo (mosaico lateral derecho); facilitando con ello la exploración de los datos.

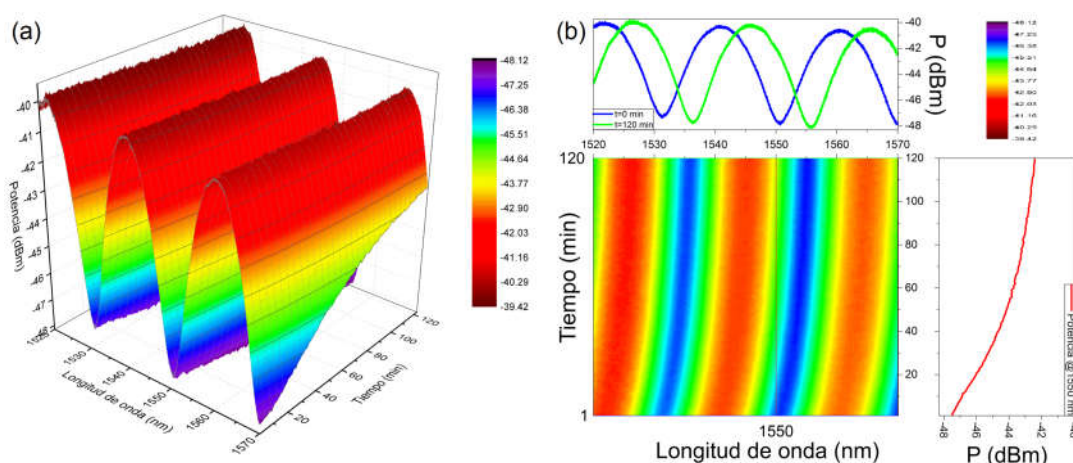


Figura 4.5: Obtención de los mapas de colores para la visualización de la evolución temporal del patrón de interferencia: (a) gráfica 3D ( $\lambda$  (nm), potencia (dBm), tiempo (min)) generada con los patrones de interferencia obtenidos a lo largo del tiempo y (b) mapa de colores asociado a la vista superior de esta gráfica 3D.

## 4.2. Fabricación y caracterización del inmunosensor

### 4.2.1. Fabricación del sensor

Como parte de los experimentos, primeramente se analizó la evolución de la capa de polímero al ser depositada en la punta de la fibra óptica, para evaluar la repetibilidad del procedimiento de fabricación. Para ello, la respuesta espectral de tres sensores fue adquirida durante las diferentes etapas de fabricación (cuando la fibra está inmersa en el PDMS, después de haber realizado el proceso recubrimiento, y la respuesta final del sensor cuando el polímero está completamente solidificado). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 4.6. En esta figura puede apreciarse que cuando la fibra óptica está sumergida en el PDMS no se obtiene un patrón de interferencia, debido a que aún no existe una cavidad FP. El patrón de interferencia surge después de haber depositado la capa polimérica en la punta de la fibra. Por último, se puede observar que el patrón de interferencia cambia cuando el PDMS se ha solidificado, lo cual se debe a los cambios en las dimensiones y en el índice de refracción del polímero, son apreciables en la imagen final del sensor (ver Fig. 4.6, en la esquina inferior derecha). Es importante señalar que la desviación estándar obtenida para la respuesta espectral de los tres sensores es muy pequeña ( $\pm 0.01$  dB), por

lo que se puede concluir que, bajo las mismas condiciones de pre-curado del PDMS y velocidad de extracción de las fibras ópticas, la reproducibilidad de los dispositivos fabricados es adecuada para el propósito de este trabajo.

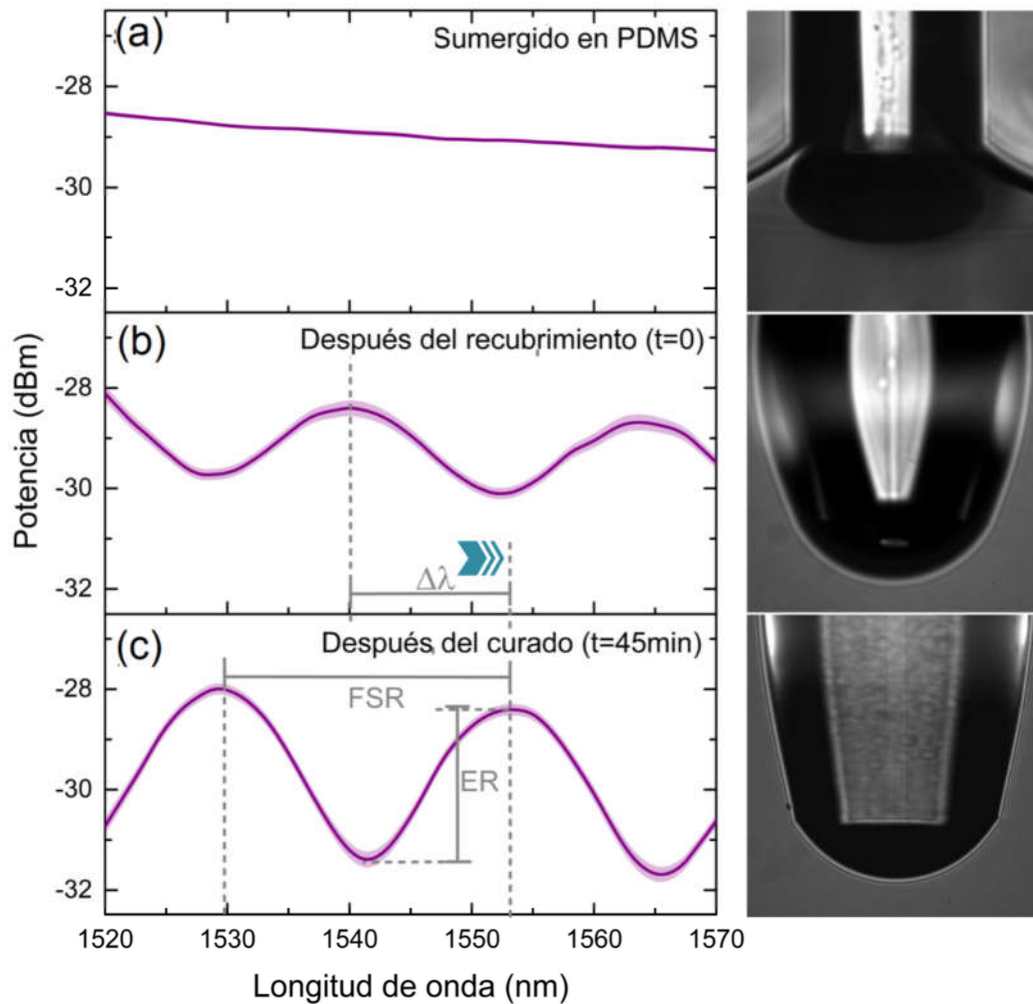


Figura 4.6: Patrones de interferencia obtenidos durante el proceso de deposición del polímero en la punta de una fibra óptica. Los espectros mostrados incluyen los resultados obtenidos para tres sensores diferentes fabricados con la misma velocidad de inmersión y extracción. Las imágenes muestran la punta de la fibra durante la inmersión (a), después de la extracción del PDMS (b) y después del curado (c). En los patrones de interferencia se indican el corrimiento espectral ( $\Delta\lambda$ ), el rango espectral libre ( $FSR$ ) y la razón de extinción ( $ER$ ). Las curvas mostradas representan el promedio y el error estándar (sombreado) del interferograma de los tres sensores.

Además de este análisis cualitativo, tomando en cuenta que el rango espectral libre ( $FSR$ , *Free Spectral Range*) de los patrones de interferencia depende del índice

de refracción y del espesor de la capa polimérica, se calculó este último parámetro como medida cuantitativa. Para ello se consideró la ecuación  $FSR = \frac{\lambda^2}{2nL_0}$ , en donde  $\lambda = 1550nm$ , que es la longitud de onda central a la que se realizó el experimento, y  $n = 1.3997$  [79] es el índice de refracción para el PDMS curado a esta  $\lambda$ . El FSR medido en los patrones de interferencia de los sensores fabricados es de  $24.84 \pm 0.02nm$ , que corresponde a un tamaño de capa polimérica de  $33.42 \pm 0.03\mu m$ .

Para corroborar las mediciones de  $L_0$  obtenidas a través del patrón de interferencia, se realizaron mediciones, utilizando el software *ImageJ*, de la altura de la capa polimérica ( $L_0$ ) en las imágenes adquiridas. En la Fig. 4.7 (a) se muestra una imagen de uno de los sensores fabricados indicando la altura de la capa polimérica. De este análisis se obtuvo  $L_0 = 33.46 \pm 0.04\mu m$ . En la Fig. 4.7 (b) se presenta la curva teórica del FSR en función del tamaño de la cavidad FP, así como el valor experimental obtenido del patrón de interferencia y de las imágenes adquiridas. En esta figura puede observarse que los datos obtenidos experimentalmente, con ambos métodos, coinciden con la curva teórica y son bastante similares (con una diferencia de  $40nm$ ).

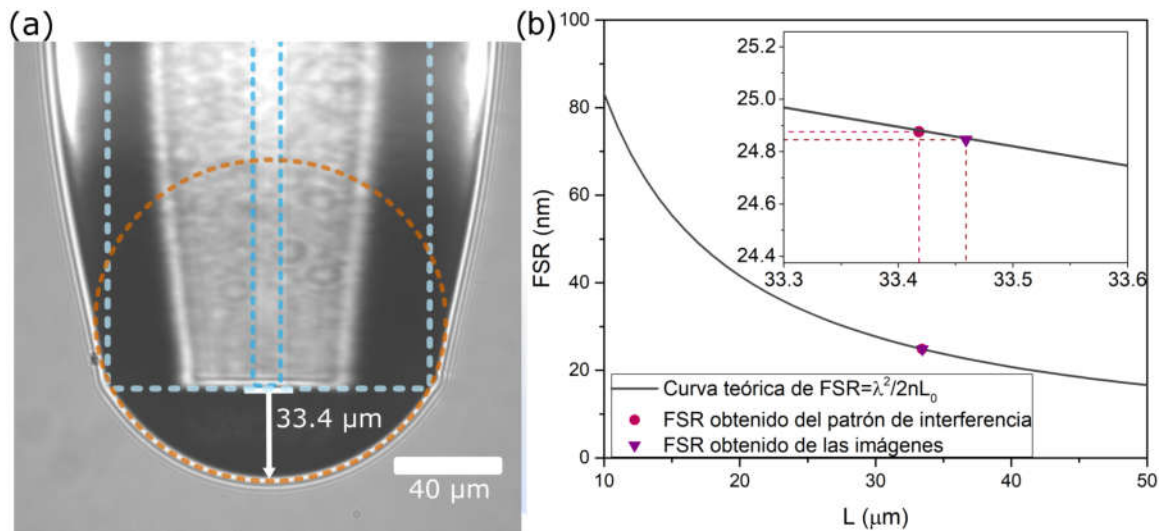


Figura 4.7: (a) Imagen de uno de los sensores fabricados, indicando la medición de la altura  $L_0$ . (b) Curva teórica del FSR en función del tamaño de la cavidad FP, así como el valor experimental medido del patrón de interferencia y el calculado considerando la  $L_0$  medida de las imágenes adquiridas. El recuadro incluido en (b) hace énfasis en la zona en la el FSR obtenido del patrón de interferencia y de las imágenes es comparado. Las barras de error de las mediciones presentadas (mencionadas en el texto), no son apreciables debido a que los valores son muy bajos.

Para entender completamente el proceso de fabricación, es importante conocer lo que ocurre durante el proceso de solidificación de la película polimérica; es por esto que se analizó la respuesta espectral adquirida a lo largo de esta etapa. En la Fig. 4.8 se muestra el mapa de colores correspondiente a la evolución del patrón de interferencia a lo largo del tiempo. Al analizar los máximos (en rojo) y mínimos (en azul) de este mapa se pueden apreciar diferentes tendencias asociadas a las diferentes etapas del proceso de fabricación (1 a 3). En la gráfica superior, se muestran los patrones de interferencia para los tiempos en los que ocurren las transiciones entre estas etapas que pueden describirse como sigue.

- Etapa 1: En los primeros minutos de haber colocado el sensor dentro del horno ocurre un corrimiento del patrón de interferencia a la izquierda. Este corrimiento implica que el camino óptico que la luz recorre es menor, por lo que este comportamiento puede atribuirse a una reducción en el tamaño de la capa polimérica (lo cual puede apreciarse en las imágenes de la Fig. 4.6). Además del corrimiento espectral, al observar los patrones de interferencia correspondientes al minuto 0 y 2.5, se aprecia un cambio en la razón de extinción ( $ER = P_{max} - P_{min}$ , *Extinction Ratio*), es decir un aumento en la amplitud de la señal, el cual aumenta como resultado un incremento en el índice de refracción del polímero debido al proceso de curado térmico [45].
- Etapa 2: Del minuto 2.5 hasta el minuto 22, el patrón de interferencia sufre un corrimiento a la derecha que corresponde a un incremento en el camino óptico que la luz experimenta en la cavidad FP. Esto se debe principalmente al coeficiente de expansión térmica del PDMS ( $3.2 \times 10^{-4} C^{-1}$ ), el cual provoca un incremento en  $L_0$  [45]. En cuanto al índice de refracción, al comparar los patrones de interferencia para el minuto 2.5 y 22, muestran que el ER se mantiene constante, por lo que no hay un cambio aparente en el índice de refracción.
- Etapa 3: El patrón de interferencia se mantiene constante, lo cual quiere decir que el interferómetro FP no experimenta más cambios. Esto podría significar que la capa está totalmente solidificada y ha llegado a su máxima expansión.



Comparando las respuestas espectrales para el minuto 22 y el 45, se aprecia que ambos son prácticamente iguales, por lo que se puede concluir que después de 22 minutos el sensor no sufre cambios.

Con estos resultados es evidente que el proceso de fabricación propuesto es bastante reproducible pues permite obtener longitudes  $L_0$  muy similares para todos los dispositivos fabricados. En las secciones siguientes se describen los procedimientos que se siguieron para calibrar los sensores y su respuesta a cambios en temperatura.

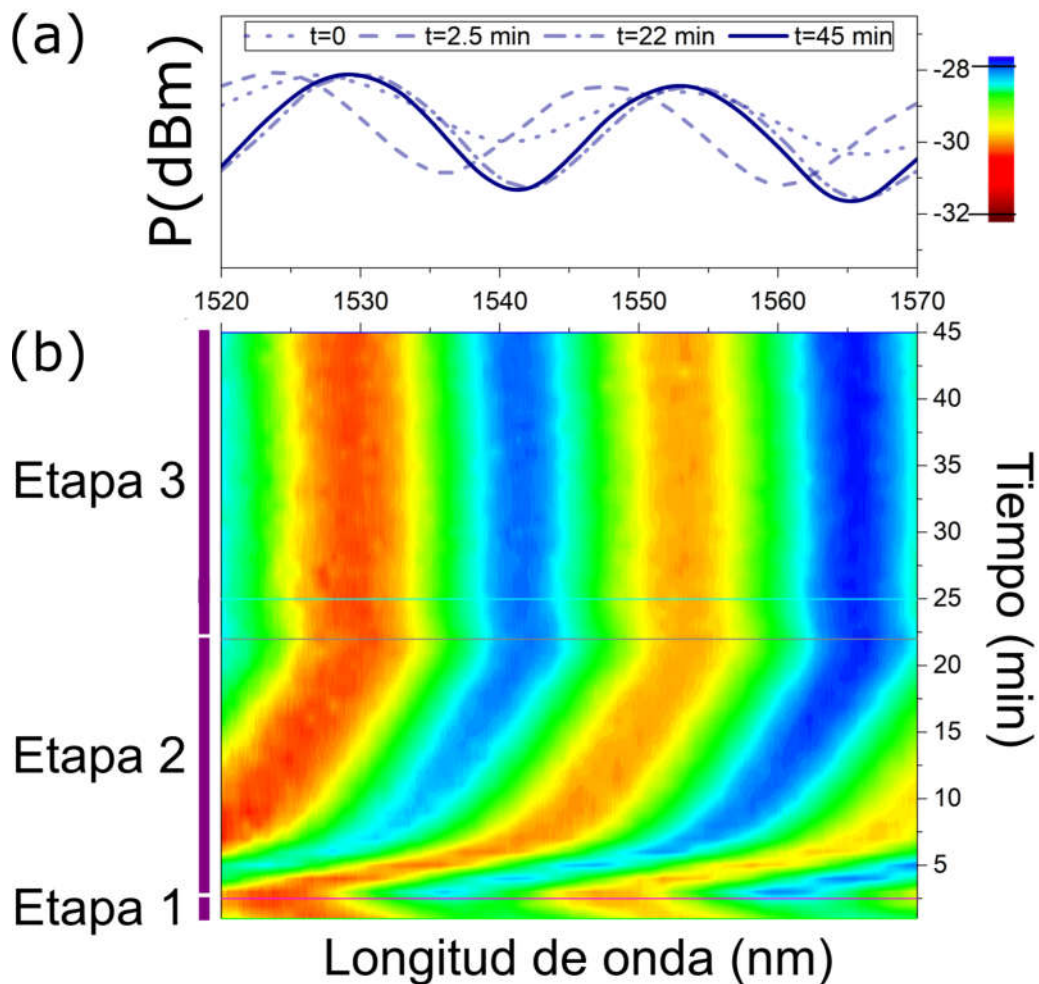


Figura 4.8: Patrones de interferencia durante el proceso de curado de la capa polimérica. Patrones de interferencia para los tiempos de transición entre las etapas (a) y vista superior de la gráfica 3D de la matriz ( $\lambda$  (nm),  $P$  (dBm),  $t$  (min)) (b).

### 4.2.2. Comparación teórica-experimental

Debido a que las dimensiones de los sensores fabricados son las mismas, se puede afirmar que las características espectrales del patrón de interferencia varían solo debido a cambios en el índice de refracción del medio en el que el sensor sea sumergido ( $\Delta n_2$ ); siempre y cuando se mantengan a temperatura constante, para evitar la expansión térmica del polímero [45, 52, 75]. Como resultado de esto, es posible obtener una caracterización espectral de los sensores en función de una sola variable: el índice de refracción circundante (SRI, *Surrounding Refractive Index*) ( $n_2$ ). Para hacer la comparación teórica-experimental, la respuesta espectral teórica general del sensor se simuló con la Ecuación 4.1, la cual corresponde a la Ecuación 3.1 cuando se incluyen las pérdidas debidas al paso de la luz por la cavidad ( $\alpha$ ) y a las debidas a la transmisión que ocurre en la segunda superficie reflejante ( $A$ ), y expresada en potencia [45, 80].

$$P_R(dBm) = 10 \log_{10} \left[ \frac{r_1^2 + 2Mr_1r_2 \cos(\theta) + M^2r_2^2}{1 + 2Mr_1r_2 \cos(\theta) + M^2r_1^2r_2^2} \right] \quad (4.1)$$

donde  $M = (1 - \alpha)(1 - A_1)$  es el factor de pérdidas,  $\alpha = 0.02$  y  $A = 0.4$  [45].

Los resultados calculados se obtuvieron manteniendo  $L_0 = 33.42 \mu m$  y variando  $n_2$  en un rango de 1.3 – 1.5, que es en el que se encuentran la mayor parte de los solventes y otros líquidos utilizados en ensayos biológicos [81].

La Fig. 4.9 muestra los resultados de esta simulación, en la cual se observa claramente que la razón de extinción ( $ER$ ) es la que se ve mayormente afectada debido al cambio en el SRI ( $n_2$ ). El cambio más drástico en el desplazamiento espectral ( $\Delta\lambda$ ) se observa entre los valores de  $n_2$  que están por encima del índice de refracción del PDMS ( $n_{PDMS} = n_1 = 1.3997$ ), en comparación a los que están por debajo de éste. Esto se puede apreciar claramente en el mosaico superior de la Fig. 4.9, en la cual también se observa que cuando  $n_2 = n_{PDMS}$  no existe patrón de interferencia; esto significa que no es posible medir SRI cercanos al índice de refracción del polímero utilizado.

Una vez obtenida la respuesta teórica, se calculó la diferencia entre el pico y el valle de cada uno de los patrones de interferencia para obtener los valores de ER respectivos a cada SRI. Para facilitar este cálculo, se obtuvo la variación en la potencia a las dos longitudes de onda que corresponden a los máximos/mínimos ( $1542nm$  y  $1553nm$ ), como se observa en las gráficas colocadas al lado derecho de la Fig. 4.9. De esta manera, al restar ambos perfiles, se puede obtener una curva de ER en función de  $n_2$ , como se observa en la Fig. 4.10, en la cual se aprecian ambos perfiles ( $P(\lambda_1), P(\lambda_2)$ ) y el ER resultante ( $P(\lambda_1) - P(\lambda_2)$ ). Esta curva es de suma importancia porque representa la respuesta teórica general para todos los sensores fabricados, y es la que permite estimar el índice de refracción del líquido en el que el sensor se sumerge a partir de la medición del ER del patrón de interferencia adquirido experimentalmente.

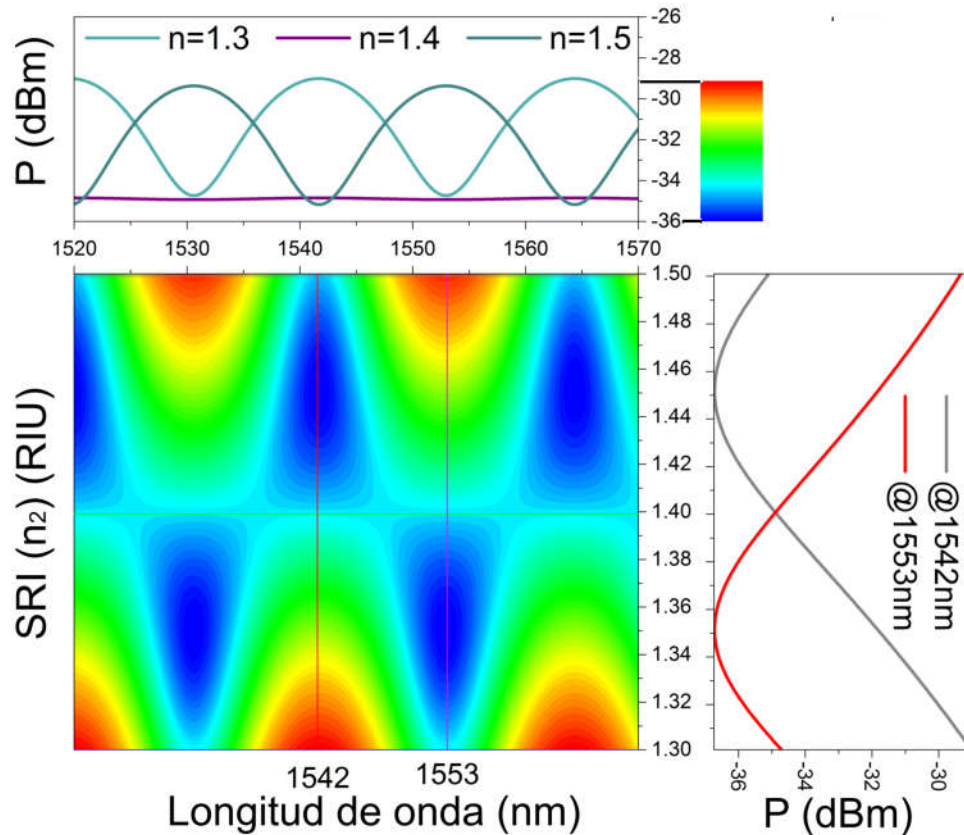


Figura 4.9: Simulación de la respuesta espectral para un sensor con una capa polimérica de  $L_0 = 33.4 \mu m$  cuando el SRI ( $n_2$ ) va de 1.3 a 1.5.

Finalmente, para poder hacer la comparación teórica-experimental, la parte experimental se realizó mediante la medición del índice de refracción de diferentes líquidos: agua destilada, isopropanol, etanol, acetona y glicerina. Para estos experimentos, se colocó el líquido a medir en un vial y el sensor fue sumergido en éste de manera controlada, de tal forma que se posicionó a  $1\text{cm}$  por debajo de la superficie del líquido. La adquisición de la respuesta se realizó cada segundo durante 1 minuto, antes y después de sumergirse en el líquido, y cada prueba se realizó por triplicado. Durante todo el experimento la temperatura se mantuvo controlada a temperatura ambiente ( $T = 23^\circ\text{C}$ ), para con ello evitar la expansión térmica del PDMS y así mantener constante  $L_0$ . Para estos experimentos se evaluó el comportamiento de tres sensores.

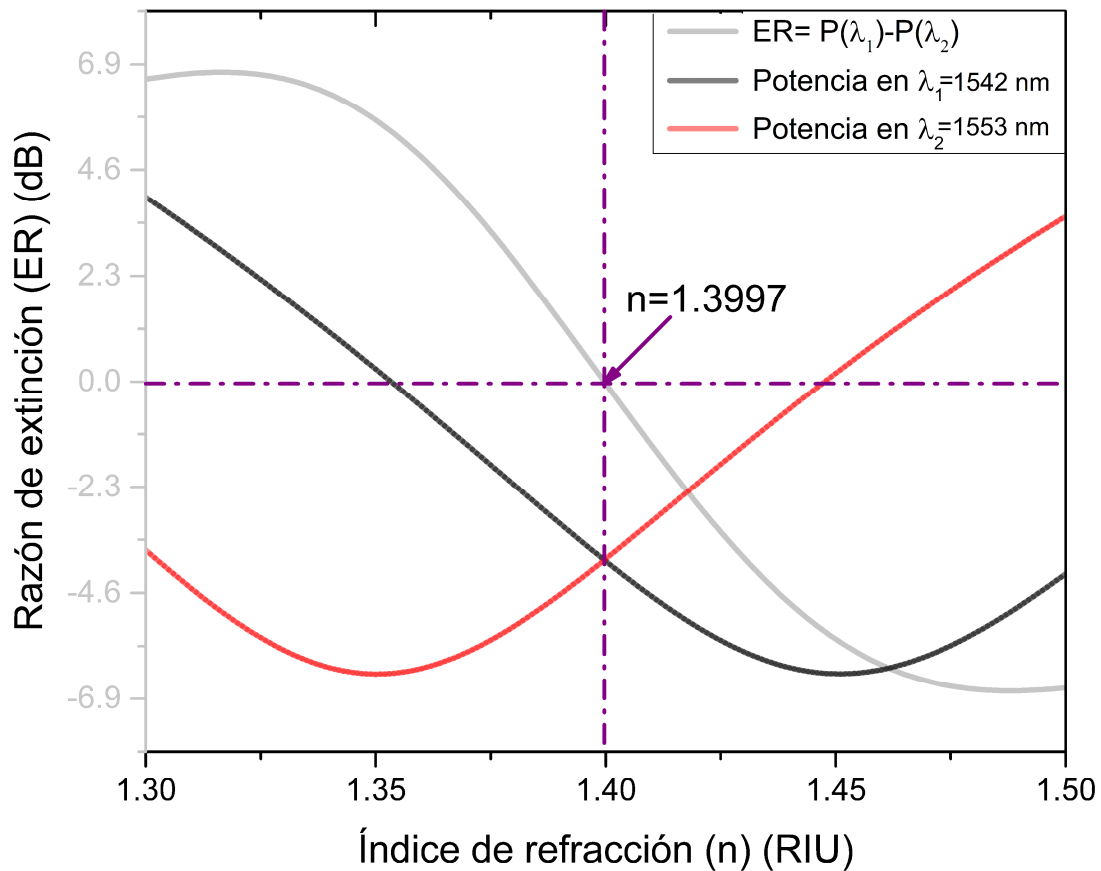


Figura 4.10: Respuesta teórica general de los sensores fabricados: Evolución del ER en función del SRI. Considerando una capa polimérica de  $L_0 = 33.4\mu\text{m}$  y SRI va de 1.3 a 1.5.

En la Fig. 4.11 se muestra la diferencia en la respuesta espectral para antes y después de que el sensor es sumergido en agua destilada para ejemplificar los resultados obtenidos en estos experimentos. Cada curva corresponde al promedio de las tres mediciones realizadas para cada sensor. Las curvas azules corresponden a los patrones de interferencia adquiridos cuando el sensor está en el aire, y las curvas rojas corresponden a los adquiridos cuando el sensor está sumergido en el agua destilada. En esta figura puede observarse claramente el cambio en ER debido al cambio en el SRI, el cual consiste un incremento considerable en ER para cuando el sensor está sumergido en agua destilada. De forma adicional, en esta figura puede observarse que la respuesta para los tres sensores es bastante similar. Esto comprueba que para estos experimentos la respuesta depende únicamente de  $n_2$  y no de  $L_0$ .

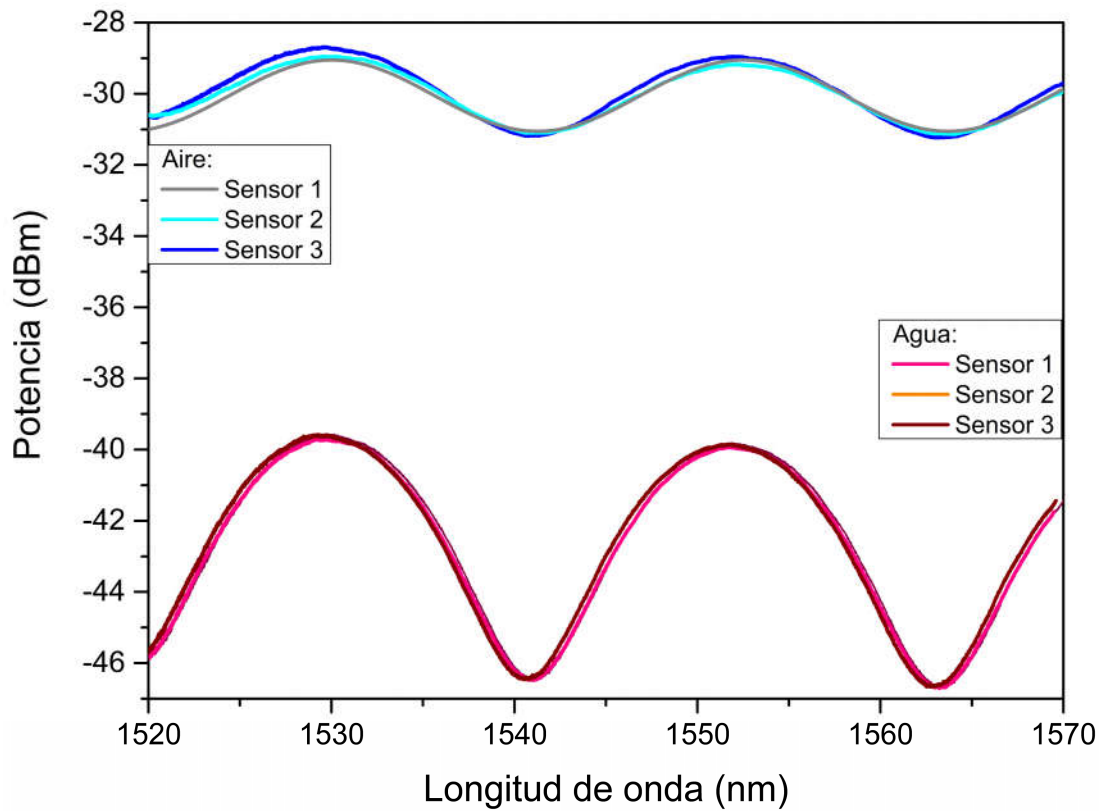


Figura 4.11: Respuesta espectral para tres sensores antes y después de ser sumergidos en agua destilada. Cuando el sensor está sumergido en agua destilada (curvas rojas), el ER es mayor que cuando éste se encuentra en aire (curvas azules).

Con los resultados obtenidos se midió el ER para los patrones de interferencia adquiridos para cada líquido (agua destilada, isopropanol, etanol, acetona y glicerina), para los tres sensores, para con ello obtener el valor de índice de refracción correspondiente. En la Fig. 4.12 se muestran los resultados obtenidos experimentalmente para los diferentes líquidos; para efectos comparativos, en la misma gráfica se incluye la curva de índice de refracción en función de la extinción ( $n(ER)$ ), que deriva de la respuesta teórica mostrada en la Fig. 4.10. Como puede observarse, los valores obtenidos de forma experimental se ajustan a los teóricos y proveen valores de índice de refracción que empatan con los reportados en la literatura [81]. Además, la desviación estándar entre los tres sensores es muy baja ( $\leq 0.0006$ ), por lo que se puede concluir que con los sensores fabricados es posible estimar el índice de refracción de diferentes líquidos a través de las mediciones de ER de manera reproducible.

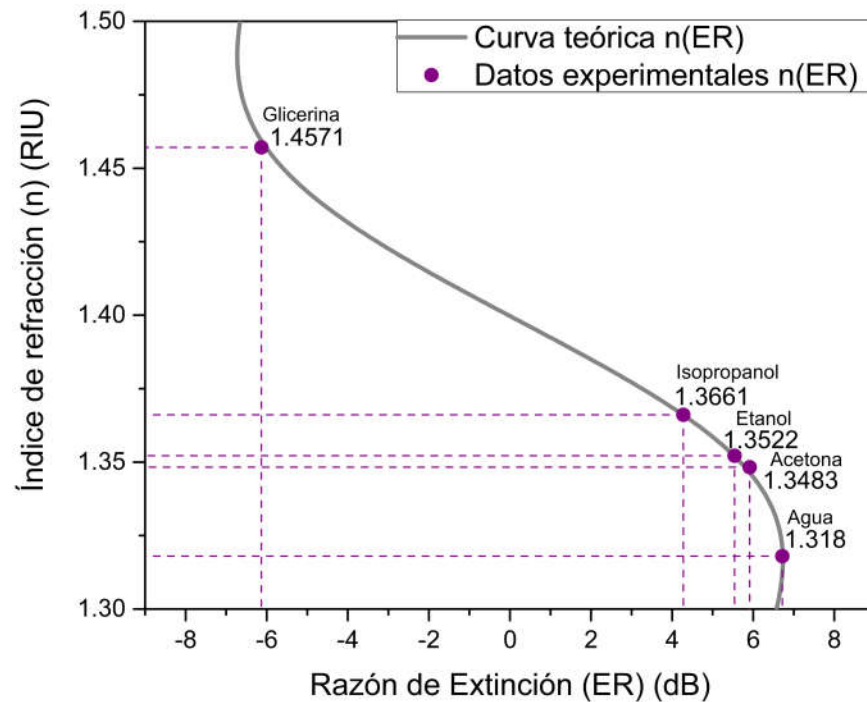


Figura 4.12: Curva teórica y valores medidos de índice de refracción ( $SRI = n_2$ ) en función de  $ER$ . Para los valores experimentales, cada punto es el promedio de los valores obtenidos por tres sensores diferentes. Las barras de error correspondientes al error estándar no son visible debido a que su valor es muy pequeño ( $\leq 0.0006$ ).

### 4.2.3. Mediciones previas al inmunoensayo

Si bien los resultados antes mostrados comprueban que los dispositivos fabricados miden adecuadamente el índice de refracción del medio en el que son sumergidos, es importante mencionar que los resultados son válidos para cuando la temperatura se mantiene constante. En este sentido, considerando que algunas etapas del inmunoensayo implican procesos de incubación, es importante analizar los cambios en la respuesta espectral debido a los incrementos en temperatura. Para esto se insertó el sensor en un vial con solución salina (PBS) para luego colocarlos en una incubadora precalentada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Durante el tiempo de incubación ( $30\text{min}$ ) el patrón de interferencia fue adquirido cada  $30\text{s}$ . La Fig. 4.13 muestra la evolución del patrón de interferencia durante el tiempo de incubación.

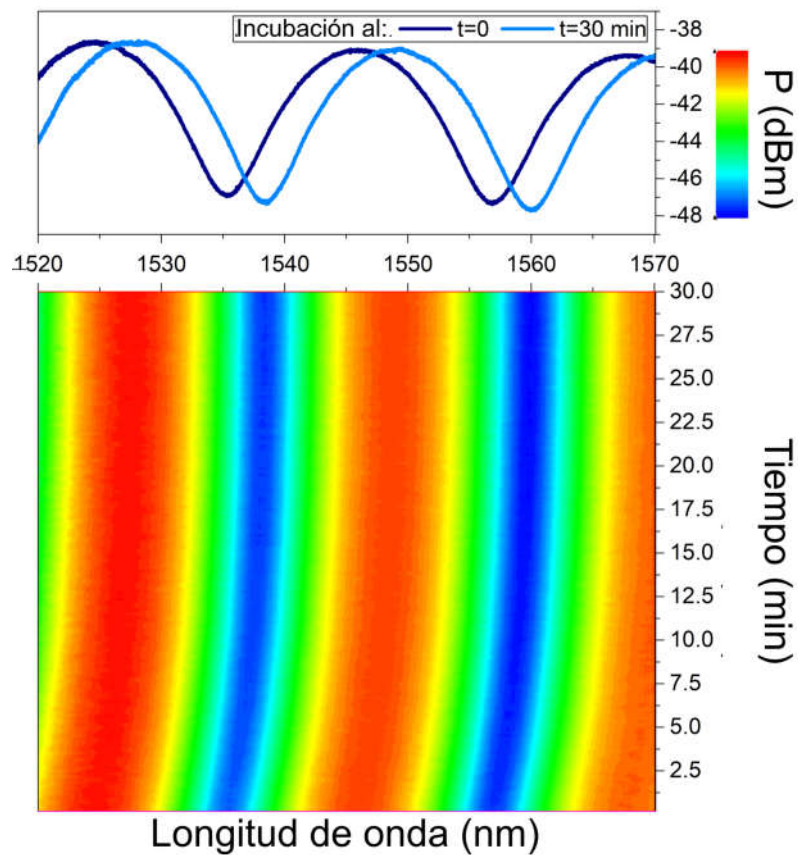


Figura 4.13: Evolución temporal del patrón de interferencia durante un proceso de incubación (sumergido en PBS durante  $30\text{min}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ ).

En la Fig. 4.13 se aprecia un evidente corrimiento espectral del patrón de interferencia. Esto se atribuye a la expansión térmica que sufre el PDMS durante el proceso de incubación, al ser llevado de  $T = 23^{\circ}C$  a  $T = 37^{\circ}C$ . Al analizar la respuesta inicial (en  $t = 0$ ) y final (en  $t = 30min$ ) del sensor, el  $\Delta\lambda$  alcanza un valor  $3.05nm$ ; en tanto que el ER solo aumenta  $0.2dB$ . Estos valores serán considerados como valores propios al proceso de incubación y, por ende, su contribución deberá ser discriminada de los resultados que correspondan a las interacciones biológicas que se produzcan durante estos procesos.

El corrimiento espectral del patrón de interferencia ( $\Delta\lambda$ ) ocurrido durante los procesos de incubación puede ser estimado con 4.2 [52]:

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda(n_1\Delta L + \Delta n L_0)}{n_1 L_0} \quad (4.2)$$

donde  $\Delta L$  y  $\Delta n$  son los cambios en el espesor e índice de refracción que el sensor experimenta, debidos tanto a la expansión térmica del PDMS como a la adhesión de los diferentes materiales biológicos en su superficie. Los cuales pueden ser expresados como:

$$\Delta L = L_{bio} + (\alpha_L \Delta T L_0) \quad (4.3)$$

$$\Delta n = n_{bio} + (\alpha_n \Delta T n_1) \quad (4.4)$$

donde  $L_0$  y  $n_1$  son la longitud e índice de refracción iniciales de la cavidad FP,  $L_{bio}$  y  $n_{bio}$  son el espesor e índice de refracción de la capa biológica adherida,  $\Delta T$  es el incremento en la temperatura y,  $\alpha_L$  y  $\alpha_n$  corresponden al coeficiente de expansión térmica y termo-óptico del PDMS, respectivamente [82, 83]. De esta manera, la Ec. 4.5 puede reescribirse entonces como:

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = (\alpha_L + \alpha_n)(\Delta T) + \frac{L_{bio}}{L_0} + \frac{n_{bio}}{n_1} \quad (4.5)$$



De la Ec. 4.5, al sustituir los valores correspondientes a los coeficiente de expansión térmica y termo-óptico ( $\alpha_L = 3.2 \times 10^{-4} \frac{1}{^\circ C}$  y  $\alpha_n = -1.8 \times 10^{-4} \frac{1}{^\circ C}$ ), los parámetros iniciales del sensor ( $L_0 = 33.42 \mu m$ ,  $n_1 = 1.3997$  [79]), la longitud de onda central del patrón de interferencia adquirido ( $\lambda = 1550 nm$ ) y el cambio de temperatura  $\Delta T = 37^\circ C - 23^\circ C = 14^\circ C$  debido a la incubación, se obtendría la siguiente ecuación:

$$\Delta\lambda = 3.04 nm + (46.38 \times 10^{-3}) L_{bio} + (1.1 \times 10^{-6}) n_{bio} \quad (4.6)$$

Es importante señalar que la Ec. 4.6 permite disgregar los efectos térmicos que contribuyen en el corrimiento espectral (primer término de la ecuación) de los correspondientes a la capa biológica adherida a la superficie del sensor (segundo y tercer término de la ecuación, en función de  $L_{bio}$ ,  $n_{bio}$ ). De esta manera, el omitir el primer término de la ecuación correspondiente a  $\Delta\lambda$  (Ec. 4.5) permitiría obtener las características de la capa biológica adherida durante los procesos de incubación. Es importante señalar que el primer término, correspondiente a las etapas térmicos, se apega adecuadamente al  $\Delta\lambda$  obtenido experimentalmente.

### 4.3. Resultados: Utilización del sensor para el inmunosensado de anticuerpos asociados con tuberculosis

#### 4.3.1. Protocolo experimental para el inmunoensayo

Debido a que el sensor está integrado a la fibra óptica, los inmunoensayos pudieron realizarse en muestras líquidas y en tiempo real, por lo que el protocolo experimental para éstos es diferente al explicado previamente para el *Milmetrix*. Este nuevo protocolo, mostrado en la Fig. 4.14, está basado en el protocolo de ELISA tradicional y el protocolo utilizado para inmunosensores similares (como BLI [38]) y, se describe brevemente a continuación:

1. Inmovilización del antígeno: Para inmovilizar lípidos bioactivos en la superficie del sensor, éste se sumergió por 30 minutos en  $0.5 mL$  de una mezcla hexano-

- etanol (1:1, v/v) con una concentración de antígeno de  $8(\mu\text{g}/100\mu\text{L})$ , contenido en un vial con *septum*, seguido de un proceso de secado de 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Bloqueo: Los posibles sitios libres, en donde no se han inmovilizado antígenos, fueron bloqueados sumergiendo el sensor en  $200\mu\text{L}$  de 3% BSA e incubándolo por  $30\text{min}$  a  $37^\circ\text{C}$ .
  3. Lavados: Para remover todo el material que no está adherido al sensor, éste fue sumergido tres veces consecutivas en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.
  4. Detección de anticuerpos en suero pre-inmune: La unión de los anticuerpos a los antígenos fue evaluada sumergiendo el sensor funcionalizado, primeramente, en suero pre-inmune ( $S_P$ ), en una dilución de 1 : 400( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ) e incubándolo por  $30\text{min}$  a  $37^\circ\text{C}$ .
  5. Desnaturalización de las proteínas: Aprovechando las capacidades de reutilización de la plataforma de PDMS+Antígeno (mostradas en la Sección 2.5), se lavó el sensor con una solución  $pH = 3$  para poder reutilizarlo en las mediciones del suero hiper-inmune. Estos lavados se hicieron como en el paso 3, sustituyendo el PBS por la solución con  $pH = 3$ , para remover todo el contenido proteico adherido al sensor, pero manteniendo los antígenos lipídicos.
  6. Bloqueo: Ya que el sensor mantiene su fucionalización, para el sensado de suero hiper-inmune no es necesario inmovilizar más antígeno y se procede directamente con el bloqueo, como el descrito en el paso 2.
  7. Lavados: Se realiza nuevamente un proceso de lavado como se describe en el paso 3.
  8. Detección de anticuerpos en suero hiper-inmune: En este paso se repitió el paso 4, reemplazando el suero pre-inmune por el hiper-inmune.

Es importante señalar que, a excepción del paso 1, todos los pasos se realizaron colocando los líquidos en pozos de una placa de 96 pozos. Esto, además de permitir el fácil manejo de las muestras, es importante porque significa una reducción considerable en los volúmenes utilizados para este inmunoensayo en comparación con el utilizado para el instrumento de inmunosensado presentado en el capítulo anterior (ver Tabla 2.1).

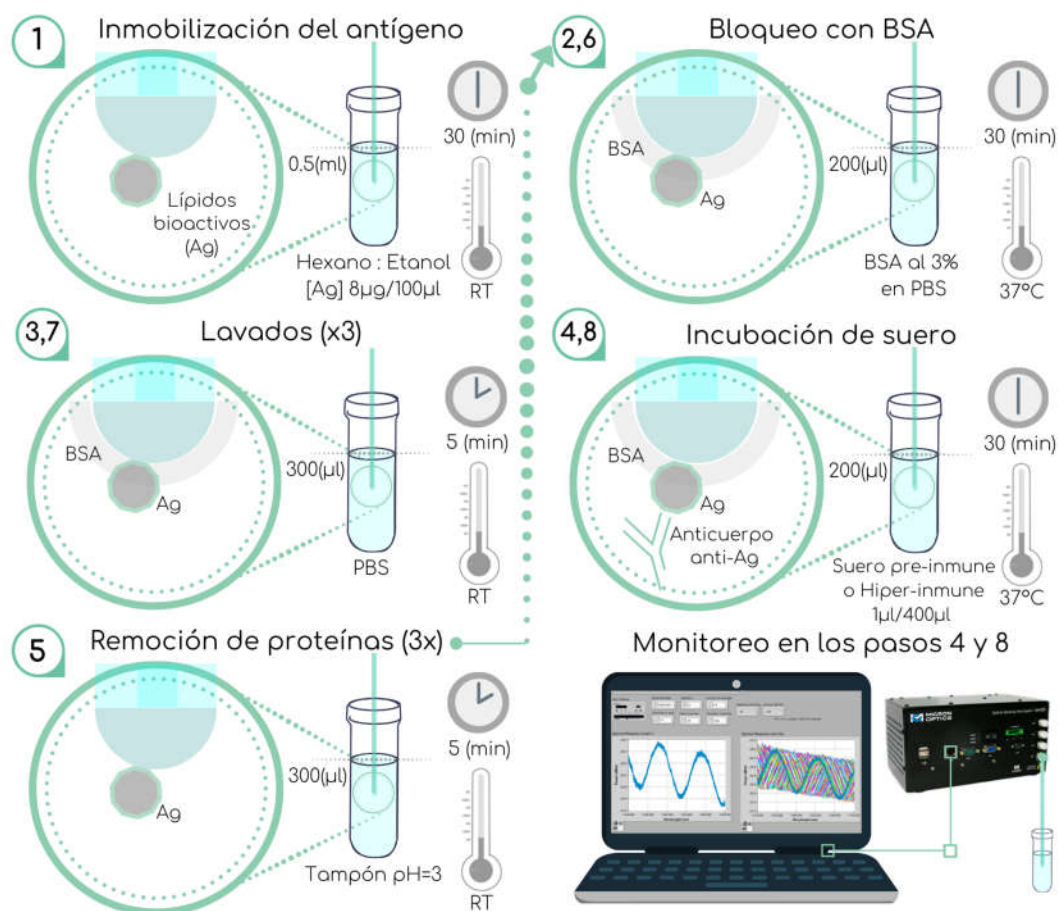


Figura 4.14: Protocolo para la realización del inmunoensayo con el sensor fabricado (ver texto para más detalles).

Para evaluar la inmovilización de los lípidos bioactivos en el sensor y evaluar su capacidad de detectar anticuerpos presentes en los diferentes sueros, se monitoreó el patrón de interferencia del sensor en distintas etapas del protocolo descrito. Específicamente, se registraron las variaciones en el interferograma durante la funcionalización del sensor (paso 1) y durante su inmersión en los sueros  $S_P$  y  $S_H$  (paso 4 y

8). En todos los casos la respuesta espectral fue adquirida cada 10s durante el tiempo indicado para cada paso en el protocolo. Una vez completados los experimentos, se calculó el corrimiento espectral ( $\Delta\lambda$ ) en función del tiempo a través de correlación cruzada para cada una de estas etapas. De forma adicional, para verificar que los corrimientos espectrales obtenidos para los sueros  $S_P$  y  $S_H$  son únicamente debidos a las interacciones antígeno-anticuerpo, se evaluó el comportamiento de sensores sin funcionalizar (omitiendo el paso 1 del protocolo). Bajo estas condiciones, se esperaría que la ausencia de antígeno inmovilizado en el sensor no permita la inmunoreacción, y por ende no haya detección de uniones Ag-Ac.

Los casos analizados con los inmunosensores se listan en la Tabla 4.1, para los cuales se evaluaron 3 sensores diferentes por cada uno.

Caso	Sensor con Ag	Solución
A	Sí	<i>PBS</i>
B	No	$S_P$
C	No	$S_H$
D	Sí	$S_P$
E	Sí	$S_H$

Tabla 4.1: Casos analizados con el inmunosensor. Para cada caso se obtuvieron datos con tres sensores diferentes.

### 4.3.2. Funcionalización del inmunosensor

Para evaluar la funcionalización del sensor, se monitoreó el paso 1 del protocolo descrito. La Fig. 4.15 muestra los resultados obtenidos durante esta etapa. La Fig. 4.15 (a) muestra los patrones de interferencia adquiridos al principio y al final del proceso de funcionalización, en los que puede apreciarse un corrimiento espectral de ( $\Delta\lambda = 4.28nm$ ) y un cambio en la razón de extinción de ( $\Delta ER = 0.53dBm$ ). Estos cambios en las características espectrales corresponden a cambios físicos en el sensor de:  $\Delta n = 0.004$ , tomando en cuenta la curva teórica presentada en la Fig. 4.10, y  $\Delta L = 3.2nm$ , considerando la Ec 4.2 y el  $\Delta n$  calculado; los cuales pueden asociarse a la inmovilización del antígeno en la superficie del PDMS. Por otro lado, en la Fig. 4.15 (b) se muestra una gráfica de  $\Delta\lambda$  en función del tiempo para visualizar cómo es

la evolución del corrimiento espectral durante este proceso. Como puede apreciarse, el corrimiento espectral es creciente hasta llegar a un máximo en un cierto tiempo ( $t \approx \text{min}$ ), después del cual el valor de  $\Delta\lambda$  se mantiene. Esto implica que hay un límite en el que la superficie del sensor no puede albergar más antígenos. También es importante señalar que en  $t = 3\text{min}$  hay un cambio abrupto en el corrimiento espectral, el cual podría deberse a la mezcla de solventes en la que el antígeno está disuelto. Como esta mezcla está compuesta de hexano:etanol y el hexano se evapora más rápido que el etanol, este cambio abrupto podría ser consecuencia del cambio en la concentración original de la mezcla.

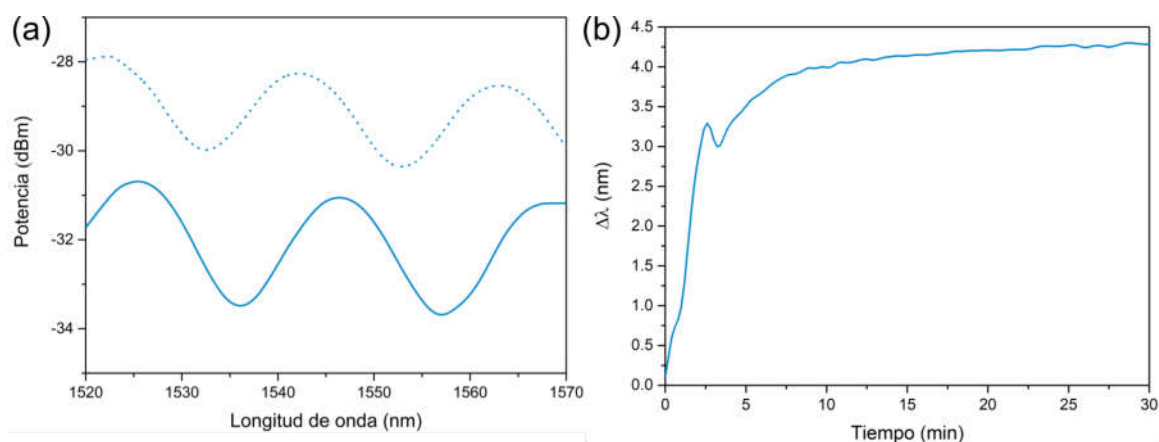


Figura 4.15: Respuesta espectral del sensor durante su funcionalización con lípidos antigénicos. (a) Patrones de interferencia para antes (línea punteada) y después (línea continua) de la funcionalización. (b) Evolución temporal de  $\Delta\lambda$  durante este proceso.

### 4.3.3. Resultados del inmunoensayo para las diferentes muestras analizadas

Una vez comprobada la inmovilización del antígeno lipídico en el sensor, se procedió a utilizar los sensores para evaluar los casos presentados en la Tabla 4.1, siguiendo el protocolo descrito previamente. Los resultados del corrimiento espectral que experimenta el patrón de interferencia para cada uno de dichos casos se muestran en la Fig. 4.16.

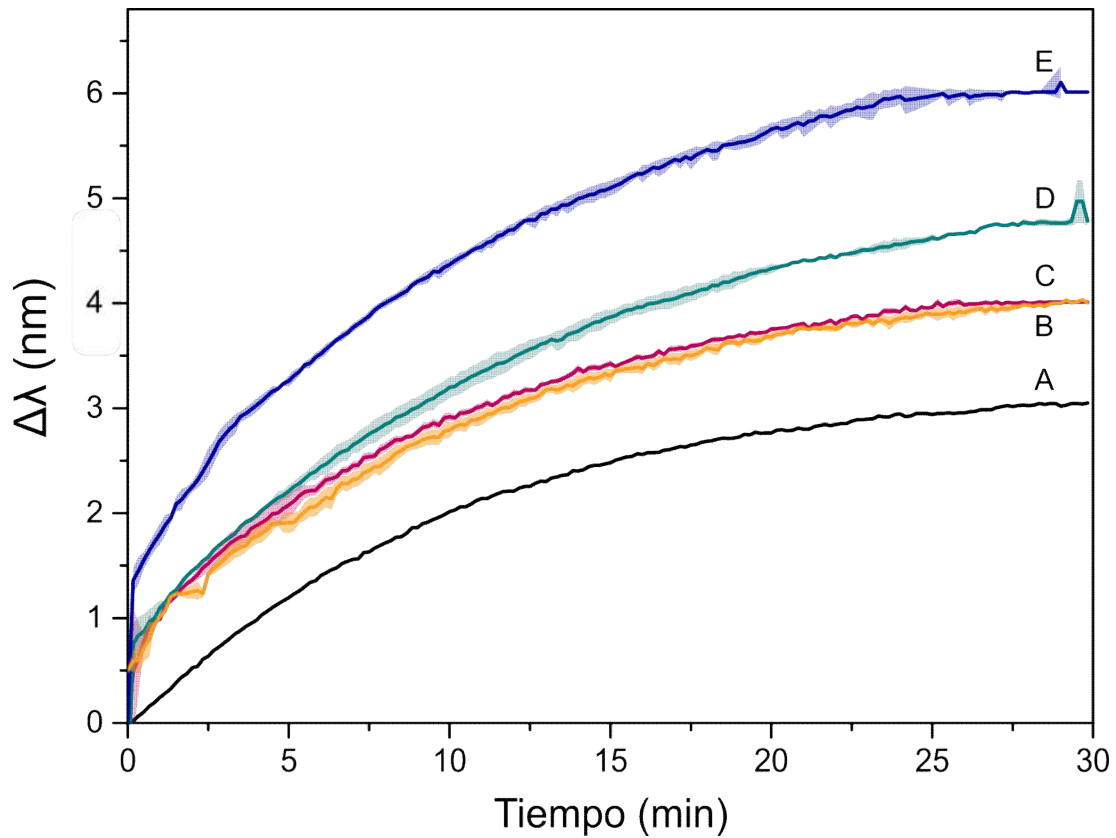


Figura 4.16: Corrimiento espectral del patrón de interferencia ( $\Delta\lambda$ ) del sensor desarrollado durante la evaluación de los diferentes casos a analizar (Tabla 4.1). Las curvas A, B y C muestran el comportamiento de los sensores no funcionalizados (es decir, sin el antígeno lipídico) durante la incubación en PBS ( $T = 37^\circ C$ ) (A), en suero control ( $S_P$ ) (B) y suero hiper-inmune ( $S_H$ ) (C) que contienen anticuerpos específicos de conejos inmunizados contra el antígeno lipídico, con una dilución de  $1 : 400\mu L/\mu L$ . Las curvas D y E se obtuvieron con sensores funcionalizados sumergidos en sueros  $S_P$  (D) y  $S_H$  (E), bajo las mismas condiciones. Las curvas fueron obtenidas promediando los resultados de tres sensores y las sombras en éstas representan el error estándar de las mediciones por triplicado.

De forma adicional, para cuantificar los resultados obtenidos, la Tabla 4.2 muestra los valores del cambio en el corrimiento espectral para cada caso analizado. Para ello, se calculó la diferencia entre el máximo desplazamiento espectral registrado ( $\Delta\lambda_f$ ) y el corrimiento espectral registrado al inicio de la inmersión del sensor en los diferentes líquidos ( $\Delta\lambda_i$ ). Esta diferencia ( $S_{\Delta\lambda} = \Delta\lambda_f - \Delta\lambda_i$ ) representa el cambio efectivo en el corrimiento espectral de las respuestas de los sensores debido a los efectos térmicos y a las posibles interacciones antígeno-anticuerpo.

Curva	Sensor con Ag	Solución	$\Delta\lambda_i$	$\Delta\lambda_f$	$S_{\Delta\lambda}$
A	Sí	<i>PBS</i>	0	3.05	3.05
B	No	<i>S<sub>P</sub></i>	0.49	4.01	3.52
C	No	<i>S<sub>H</sub></i>	0.50	4.01	3.51
D	Sí	<i>S<sub>P</sub></i>	0.75	4.78	4.03
E	Sí	<i>S<sub>H</sub></i>	1.06	6.01	4.95

Tabla 4.2: Cambios en el corrimiento espectral ( $\Delta\lambda$ ) logrados para los diferentes inmunoensayos durante la incubación.

A continuación se analizan cada uno de los casos evaluados, tomando en cuenta las curvas presentadas en la Fig. 4.16 y los valores mostrados en la Tabla 4.2:

1. Sensor funcionalizado incubado en PBS: Debido a que el PBS es una sustancia que no contiene anticuerpos, aunque el sensor esté funcionalizado no se espera que haya uniones Ag-Ac. Por lo tanto, podría asumirse que los cambios en  $\Delta\lambda$  son debidos en su totalidad a la expansión térmica que sufre el PDMS debido al proceso de incubación. Este supuesto es confirmado al observar que el  $S_{\Delta\lambda}$  para este caso es igual al  $\Delta\lambda = 3.05nm$  obtenido por efectos térmicos, tanto de forma teórica como experimental (incluidos en la Sección 4.2.3).
2. Sensor sin funcionalizar incubado en *S<sub>P</sub>*: En este caso, a pesar de que el suero pre-inmune puede contener algunos anticuerpos, al no haber antígenos inmovilizados en el polímero, no debería haber detección de interacciones Ag-Ac y los efectos térmicos deberían dominar la respuesta. Los resultados obtenidos muestran este dominio por parte de los efectos térmicos, ya que la tendencia de la curva es la misma que para la curva A. A pesar de que estos comportamientos son similares, hay una diferencia entre el  $\Delta\lambda_i$  y el  $S_{\Delta\lambda}$  alcanzados para este caso y los obtenidos para el caso A. Estas diferencias pueden atribuirse al cambio de soluciones, de PBS a *S<sub>P</sub>*; ya que esto implica un cambio de índice de refracción del medio en el que el sensor es sumergido [46,84,85] y una expansión del polímero diferente para cada uno de estos líquidos.

3. Sensor sin funcionalizar incubado en  $S_H$ : Aunque para la evaluación de este suero hay una presencia más grande de anticuerpos, debido a que no hay antígenos inmovilizados en la superficie del sensor, tampoco debería existir interacción Ag-Ac. Esto puede corroborarse porque esta curva presenta la misma tendencia y valores que el caso anterior.
4. Sensor funcionalizado incubado en  $S_P$ : Debido a que este sensor cuenta con antígenos en la superficie y debido también a la posible presencia de anticuerpos en este suero, es probable detectar interacciones Ag-Ac. La curva D muestra que  $\Delta\lambda$  cambia conforme el tiempo avanza alcanzando un valor máximo ( $\Delta\lambda_f$ ) y un  $S_{\Delta\lambda}$  por encima de los valores obtenidos para la expansión térmica del polímero. Esto, aunado al cambio en la tendencia de la curva, sugiere que existe un cambio en la respuesta espectral debido a las uniones específicas entre los antígenos y los anticuerpos.
5. Sensor funcionalizado incubado en  $S_H$ : Para este caso, debido a que el evaluar el suero hiper-inmune supone una cantidad de anticuerpos mayor a las del suero  $S_P$ , se esperaría un comportamiento similar al caso anterior pero con mayor desplazamiento espectral. La curva y valores asociados a este caso comprueban este argumento, ya que con  $S_H$  se alcanza un  $\Delta\lambda_f$  y un  $S_{\Delta\lambda}$  por encima de los alcanzados al evaluar el suero pre-inmune  $S_P$ . Esto significa que efectivamente se detecta un mayor número de interacciones Ag-Ac en este caso.

Considerando el análisis presentado para cada uno de los casos, el que las curvas B y C presenten valores asociados prácticamente iguales (Tabla 4.2), nos permite concluir que el corrimiento espectral para estas curvas se atribuye a los efectos de expansión térmica, los cuales conducen a un aumento en la longitud de la cavidad de PDMS. Esto a su vez significa que, al no haber antígeno inmovilizado en el sensor, no hay unión de anticuerpos y por lo tanto, ni el  $S_P$  ni el  $S_H$  pueden identificarse correctamente. En resumen, esto prueba que no hay inmunoreacción debido a la interacción polímero-anticuerpo y que la funcionalización del antígeno es, por lo tanto, esencial para la detección de anticuerpos.



Por otro lado, al comparar los casos D y E, tanto las curvas como los valores medidos muestran que se alcanza un mayor  $S_{\Delta\lambda}$  para el suero hiper-inmune ( $S_H$ ) en comparación con el pre-inmune ( $S_P$ ). Esta diferencia significativa de  $0.92nm$ , permite inferir que el inmunosensor es capaz de diferenciar adecuadamente entre sueros que contienen cantidades diferentes de anticuerpos. Sin embargo, es importante evaluar cuantitativamente el significado de esta diferencia. Para ello, se compararon los cambios de corrimiento espectral debidos a los efectos de reconocimiento biológico, substrayendo de éstos la contribución de los efectos térmicos (es decir,  $S_{\Delta\lambda} - 3.53nm$ , donde  $3.53nm$  es el valor de  $S_{\Delta\lambda}$  para los sensores no funcionalizados que fueron incubados). Considerando esto, se obtuvieron valores de  $0.50nm$  y  $1.42nm$  para el suero pre-inmune ( $S_P$ ) e hiper-inmune ( $S_H$ ), respectivamente. Tomando en cuenta la ecuación 4.6, la contribución del espesor de la biocapa es mucho mayor que la contribución debida a su cambio de índice de refracción. Por lo tanto, omitiendo el último término en esta ecuación, se puede estimar que la biocapa adherida a la superficie del inmunosensor para el suero pre-inmune tendría un grosor de  $10.78nm$ , mientras que para el suero hiper-inmune este espesor alcanza los  $30.61nm$ . Es importante mencionar que estas estimaciones consideran el espesor del recubrimiento de antígeno y el espesor atribuido a los anticuerpos que pudieron haberse unido a dicho recubrimiento. Por lo tanto, considerando que las pruebas se realizaron con inmunosensores de dimensiones iguales, la diferencia de grosor podría atribuirse completamente a los cambios en la superficie polimérica asociados a los efectos de unión antígeno-anticuerpo [52, 86]. Considerando esta afirmación, podría concluirse que la respuesta adquirida al evaluar  $S_H$  es debida a la adhesión de una biocapa de un espesor aproximadamente 3 veces el espesor de la biocapa obtenida con  $S_P$ .

#### **4.4. Evaluación del inmunosensor como posible herramienta de diagnóstico de TB**

Considerando los resultados obtenidos se puede concluir que el inmunosensor desarrollado tiene gran potencial como herramienta para un diagnóstico eficiente de la

tuberculosis ya que, además de que permite diferenciar correctamente entre sueros pre-inmune e hiper-inmune, presenta varias características bastante atractivas, como un procedimiento de fabricación sencillo, el no requerimiento de marcadores (*label-free*), la posibilidad de realizar un monitoreo en tiempo real y la capacidad de reutilización. Esta última característica pudo aprovecharse para obtener primero lecturas con el suero  $S_P$  y posteriormente con el suero  $S_H$ , siguiendo los procedimientos de lavado y bloqueo descritos en el protocolo de inmunosensado. Por lo tanto, con el uso de este inmunosensor y el protocolo de inmunoensayo realizado para éste, se confirma que el recubrimiento de antígeno se conserva en la superficie del PDMS y los sensores pueden reutilizarse fácilmente después de la realización de procedimientos simples, como lo son los lavados con una solución para la desnaturalización de proteínas.

Comparando este inmunosensor con el instrumento de inmunosensado presentado en el capítulo anterior, es claro que esta propuesta de un inmunosensor integrado a la punta de la fibra óptica ha sido una excelente opción para solventar las necesidades identificadas después de analizar el desempeño del *Milmetrix*. El tamaño reducido del sensor y su fácil manejo permite realizar mediciones en líquidos, propiciando con ello un monitoreo en tiempo real durante las incubaciones y la eliminación de protocolos que eviten la desnaturalización de los anticuerpos. Sin duda, el haber mejorado esos aspectos favoreció en el desempeño del dispositivo fabricado para su uso como inmunosensor, obteniendo con ello excelentes resultados para la correcta diferenciación de sueros y potenciando su futuro uso como herramienta de diagnóstico de TB. A pesar de ello, hay que destacar que aún hay algunas opciones que podrían mejorar el dispositivo propuesto, como las descritas a continuación:

- Disminuir los volúmenes de soluciones utilizadas en el inmunoensayo: Considerando que la superficie de la capa semiesférica de polímero es de  $A = 2\pi rL_0 = 2\pi rL_0 = 0.028mm^2$  y que su volumen es de  $V = \frac{\pi h^2}{3}(3r - h) = 0.0002mm^3$ , se necesitaría un volumen mínimo de aproximadamente  $0.0002\mu L$  para poder sumergir completamente el sensor. Por lo cual, se podrían reducir considerablemente los volúmenes de soluciones que se utilizaron en los protocolos presentados, los cuales son de cientos de  $\mu L$ . Esta reducción es muy significativa ya que

se traduciría en un decremento en los costos asociados al inmunoensayo.

- Eliminar la etapa de bloqueo con BSA: Tomando en cuenta que los resultados para este inmunosensor han mostrado que no hay adhesión de los anticuerpos al polímero y que lo único que se mantiene adherido a éste son los antígenos lipídicos, podría asumirse que el BSA, al ser un material proteico tampoco se adhiere a la superficie del sensor. Dado esto, se podría explorar el eliminar este paso del protocolo del inmunoensayo; lo cual haría más simple el procedimiento, al reducirlo a tres pasos: la funcionalización, la detección de anticuerpos en suero y los lavados necesarios para su reutilización.
- Mediciones de referencia de forma simultánea (sin Ag y con Ag): El poder realizar mediciones simultáneas con dos sensores, uno funcionalizado y el otro sin funcionalizar, sumergidos en la misma solución a analizar, permitiría tener mediciones referenciadas y poder discriminar cualquier efecto que no sea el respectivo a las interacciones Ag-Ac.
- Mediciones por triplicado simultáneas: Otra opción que podría explorarse con un interrogador con más canales sería la medición por triplicado de las soluciones de manera simultánea, lo cual implicaría una reducción en el tiempo para realizar estos experimentos. Adicionalmente, esto se asemejaría de mejor manera a la forma en que se realiza un ELISA convencional, por lo que podría proveer un monitoreo en tiempo real para las pruebas por triplicado de este tipo de ensayos, en los cuales el resultado puede saberse únicamente al final del protocolo.
- Obtención de la evolución de  $\Delta\lambda$  en tiempo real durante el experimento: Una mejora simple pero importante en la instrumentación virtual desarrollada para la detección con este inmunosensor es el incluir el cálculo del corrimiento espectral de los patrones de interferencia en tiempo real. De agregar esto, no habría necesidad de post-procesar las señales y se podría dar un resultado instantáneo durante el experimento.

- Mejora en el empaquetamiento de los sensores: Debido a sus dimensiones micrométricas y a los materiales con los cuales son fabricados, los inmunosensores son frágiles. Hasta ahora, los sensores fabricados se han insertado en agujas de jeringa para poderles dar mayor rigidez mecánica y eso ha brindado buenos resultados; sin embargo, el empaquetamiento puede ser mejorado buscando una solución que permita su fácil manejo.

A pesar del gran potencial que representa este inmunosensor para mejorar las técnicas actuales para el diagnóstico de TB, este trabajo representa el primero de varios pasos a seguir para que pueda consolidarse como herramienta de diagnóstico. Si bien la diferenciación correcta de los sueros ha sido comprobada, es necesaria la realización de experimentos con diferentes concentraciones de antígeno y diluciones de sueros para determinar las cantidades óptimas a utilizarse durante el inmunoensayo y también poder calcular los límites de detección de este tipo de inmunosensores. Y, posterior a ello, sería necesario el uso de sueros humanos para evaluar la viabilidad del uso de este sensor en el diagnóstico final de TB.



# Capítulo 5

## Conclusiones y prospectivas

Aunque los dos esquemas diferentes de inmunosensado óptico desarrollados en este proyecto han sido evaluados como posible herramienta para el inmunodiagnóstico de tuberculosis en los capítulos respectivos, es importante remarcar algunas conclusiones correspondientes a todo este proyecto en general.

Primeramente, el que ambos esquemas de inmunosensado estén basados en la misma plataforma de bioreconocimiento, es prueba de la versatilidad y el potencial uso general que puede tener el PDMS funcionalizado con los lípidos bioactivos para el inmunodiagnóstico de TB. Tal como se mostró en el Capítulo 2, la exploración de esta combinación ha resultado en una nueva y atractiva plataforma en la que los antígenos lipídicos son capaces de adherirse al PDMS a través de un método muy sencillo, sin perder su capacidad bioreconocedora y permitiendo la correcta diferenciación de sueros con diferente contenido de anticuerpos (ligandos). Si bien estos resultados fueron fundamentales para el desarrollo del instrumento de inmunosensado y del inmunosensor presentados, es importante destacar que su importancia no se limita a únicamente estas dos aplicaciones. Por un lado, el que el PDMS sea un polímero ampliamente utilizado para la implementación de diversas técnicas de biosensado y microfluídica, abre un gran abanico de posibilidades para acondicionar esta plataforma a otro tipo de dispositivos de biosensado óptico. Y, por el otro, debido a que la plataforma se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, ésta podría usarse para detectar cualquier tipo de molécula objetivo, siempre que se inmovilice el antígeno adecuado en

el PDMS. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que muestra que el PDMS tiene buenas capacidades de funcionalización mediante el depósito de mediadores lipídicos con un método sencillo. Aunque se necesitarían estudios para evaluar la utilidad de PDMS para la inmovilización de otros lípidos bioactivos, esta plataforma podría funcionar para lípidos que van desde los ácidos grasos poli-insaturados, que modulan la inflamación y los procesos neurodegenerativos [87,88], hasta los lípidos con roles de transducción de señales para la célula [89]. Por lo que, en general, puede concluirse que el descubrimiento de esta nueva plataforma, además de significar una gran herramienta para el inmunodiagnóstico de tuberculosis, tiene gran potencial para ser utilizada en una gran variedad de herramientas lipídicas, como las necesarias para la detección de ligandos desconocidos o su reactividad con componentes de fluidos humanos (biomarcadores de otras enfermedades, por ejemplo) que requieren de soportes para la fijación de lípidos bioactivos y de los cuales no hay mucha investigación desarrollada.

Después de la evaluación del desempeño del *Milmetrix* y *EndTB* como herramientas de diagnóstico de TB, se puede concluir que ambos representan nuevas alternativas que mejoran algunas de las mayores desventajas que presentan los métodos actuales para la detección de esta enfermedad. Prueba de ello es que ambos esquemas comparten las siguientes ventajas por encima de las técnicas de diagnóstico de TB actuales:

- Complejidad: Tanto la fabricación de membranas y recubrimientos de PDMS, así como su posterior funcionalización con los antígenos lipídicos se realiza con técnicas muy sencillas como lo son el recubrimiento por inmersión y goteo. De igual manera, para la adquisición y procesamiento de los datos se utilizaron técnicas que minimicen los recursos computacionales, como lo son la FFT y la correlación cruzada.
- Bajo riesgo biológico: Al ser métodos de inmunodiagnóstico y utilizar antígenos que no corresponden directamente a la bacteria de la TB (*Mycobacterium tuberculosis*), los dos esquemas planteados representan un riesgo biológico prácticamente nulo.

- No necesidad de marcadores biológicos: Al ser técnicas en las que los cambios de la plataforma de bioreconocimiento ( $n$  o  $L$ ) son cuantificadas por medio de interferometría óptica, no hay necesidad de utilizar marcadores biológicos, como los utilizados en otras técnicas de inmunodiagnóstico tradicionales (ELISA por ejemplo). Esto, además de disminuir los costos involucrados, permite que los protocolos para el diagnóstico se simplifiquen al omitir pasos subsecuentes a los directamente involucrados con la formación de complejos Ag-Ac.
- Rapidez: En cuanto el tiempo que lleva la detección de anticuerpos con las técnicas propuestas, este está por debajo de la mayoría de las técnicas actuales (exceptuando el Xpert MTB, que consiste en un diagnóstico molecular automatizado de alto costo con requerimientos de infraestructura), ya que los cambios que experimenta la plataforma de bioreconocimiento debido a las interacciones antígeno-anticuerpo podrían ser monitoreadas en tiempo real.
- Reutilizable: El haber probado que la plataforma de bioreconocimiento puede ser reutilizada al realizar simples lavados que mantienen el recubrimiento de antígeno y eliminan el resto de materiales, hace que los esquemas desarrollados estén por encima de técnicas similares como el *BLLI*, en el que su mayor desventaja es el gran gasto que representa funcionalizar, con técnicas complejas, una nueva punta por cada medición.

Si bien ambas alternativas tienen todas las ventajas antes mencionadas, el inmunosensor en la punta de la fibra óptica tiene ventajas adicionales que hace que sea más atractivo para su uso en el inmunodiagnóstico de TB: es un dispositivo que es sumergible y permite realizar mediciones en tiempo real durante todo el inmunoensayo. Si bien esto se debe mayoritariamente a que el instrumento de inmunosensado no fue diseñado para hacer mediciones en líquidos, es importante decir que aunque el instrumento se rediseñara para solventar este inconveniente, el *EndTB* seguiría representando una mejor alternativa. Esto debido a que otra de las desventajas del instrumento de inmunosensado es la necesidad de un sistema que permita controlar con precisión la posición de la punta respecto a la muestra; lo cual además de



incrementar los requerimientos y el tamaño del instrumento, significaría que para monitorear los procesos de incubación sería necesario introducir todo el sistema de posicionamiento en la incubadora utilizada para este tipo de experimentos, o bien, adaptar el experimento para mantener las condiciones necesarias. En este sentido, estas dos opciones son más complejas que utilizar el inmunosensor desarrollado en este proyecto, cuyas dimensiones permiten que pueda ser introducido dentro de la muestra a la incubadora convencional, permitiendo así el monitoreo en tiempo real durante los procesos de incubación. Además de todo esto, el que con el *Milmetrix* no se haya podido corroborar de forma cuantitativa la diferenciación de sueros implica que, aún si se decidiera rediseñar el instrumento tomando en cuenta los inconvenientes mencionados, sería necesario encontrar los parámetros indicados (separación entre la fibra y la muestra y concentraciones de antígeno y anticuerpo) que permitan dicha diferenciación. Dicho lo anterior, se puede concluir que el inmunosensor *EndTB* representa definitivamente una mejor opción en la búsqueda de un diagnóstico de TB eficiente.

Además de representar la mejor opción entre los esquemas explorados en este trabajo, el dispositivo *EndTB* cumple con la mayoría de las especificaciones que la literatura sugiere debe cumplir un inmunosensor ideal: la habilidad de detectar y cuantificar correctamente antígenos (o anticuerpos), la capacidad de transducir los eventos de unión Ag-Ac sin agregar agentes adicionales, el que permita repetir mediciones con el mismo dispositivo y la capacidad de detectar uniones específicas de antígeno-anticuerpo en muestras reales [21]. Este es el único aspecto que hasta ahora no se ha explorado y que, por ende, no se podría asegurar para el inmunosensor desarrollado. En la misma línea, en cuanto a cómo se apega este inmunosensor a los requerimientos establecidos por la OMS (*ASSURED*), si bien se puede especular que el *EndTB* tiene potencial para cumplir con la mayoría de ellos (ser accesible para personas en riesgo de infección, tener un uso fácil con requerimientos mínimos de capacitación, permitir un diagnóstico oportuno, tener mínimos requerimientos y alta disponibilidad), es oportuno decir que aún está pendiente hacer un estudio cuantitativo de los falsos positivos y falsos negativos que podrían obtenerse con este dispositivo, para con ello poder concluir respecto a la sensibilidad y especificidad de éste. Estos

---

aspectos pendientes dejan en descubierto el hecho de que este trabajo, si bien no permite concluir que el inmunosensor propuesto se consolidará como una prueba de diagnóstico de TB que compita con las pruebas actuales, representa la primera etapa fundamental para llegar a ello, en la que se han mostrado muy buenos resultados de las pruebas de concepto de la plataforma de bioreconocimiento y técnica óptica propuestas.

En ese sentido, entre las perspectivas de este proyecto, que podrían representar mejoras significativas en el diseño y desempeño del inmunosensor desarrollado hasta ahora se encuentran:

- Cambiar el parámetro analizado durante el inmunoensayo: En este trabajo se analizó el corrimiento espectral el ( $\Delta\lambda$ ) para identificar los cambios que experimenta el inmunosensor, para lo cual se midió este parámetro directamente al comparar dos patrones de interferencia para condiciones diferentes. Sin embargo, si se analiza la potencia a una longitud de onda específica, ésta sufrirá cambios debido al corrimiento espectral. Ahora que se sabe cómo son las características espectrales del sensor y su comportamiento durante el inmunoensayo, es posible migrar a este otro análisis, el cual en términos de requerimientos es más atractivo. Esto se debe a que el sistema de interrogación utilizado hasta ahora, compuesto por un láser sintonizable y un detector, podría sustituirse con un láser a cualquier longitud de onda dentro del rango utilizado (1520 – 1570nm), un detector y un circulador.
- Optimizar los antígenos lipídicos utilizados: Como se mencionó en la Sección 2.2, los antígenos lipídicos utilizados en este proyecto son los contenidos en la fracción acetónica de una combinación formada por DAT, TAT y DMT. El explorar la antigenicidad de estos componentes por separado, o inclusive trabajar con otros antígenos grasos del bacilo tuberculoso, podría dar indicios de si esta combinación es la óptima o si es mejor el uso de otros antígenos por separado, para así optimizar la funcionalización de la plataforma de bioreconocimiento y con ello el desempeño del inmunosensor.

- Simplificar el protocolo del inmunoensayo: Debido a que se desconocía el comportamiento de la plataforma de bioreconocimiento y del inmunosensor, los protocolos para los inmunoensayos se adaptaron procurando que se apegaran a uno de los más ampliamente estudiados (el del ELISA). Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta ahora, se podría explorar el eliminar los pasos en los que el sensor es bloqueado con BSA, simplificando con ello el protocolo utilizado. Esta idea surge al considerar que la alta hidrofobicidad del PDMS impide que las moléculas hidrofílicas (como el BSA) se adhieran a éste, de tal forma que no se puede asegurar que BSA tenga algún efecto en el inmunosensor y se podría asumir que los cambios observados se deben únicamente a los anticuerpos que se unen a los antígenos inmovilizados correctamente en el polímero. De determinar que el bloqueo con BSA no tiene efecto alguno, este paso no sería necesario y el inmunoensayo podría reducirse únicamente a depositar el antígeno y analizar la respuesta espectral durante la incubación del suero a analizar.

Por otro lado, los aspectos a evaluar para que el inmunosensor pueda consolidarse como herramienta de diagnóstico son:

- Evaluar diferentes concentraciones de antígeno y anticuerpos: Si bien en este trabajo se realizaron estos experimentos para evaluar al PDMS con lípidos bioactivos como plataforma de bioreconocimiento con diferentes concentraciones de antígeno y anticuerpos, es necesario realizar experimentos similares pero utilizando el inmunosensor. Dichos experimentos, además de permitir la identificación de la concentración de antígeno óptima a utilizar en la funcionalización, proveerá las herramientas necesarias para calcular el límite de detección y sensibilidad del dispositivo, los cuales son parámetros muy importantes para evaluar el desempeño de cualquier biosensor.
- Evaluación de sueros humanos: Hasta ahora se ha trabajado con ligandos (anticuerpos) obtenidos en suero de conejo después de inocular al animal con el antígeno utilizado, lo cual asegura la formación de complejos Ag-Ac. En una

etapa próxima se deberá evaluar la correcta diferenciación de sueros humanos con diferente contenido de anticuerpos utilizando el inmunosensor desarrollado.

El abordar los puntos anteriores en todos los casos se vería reflejado directamente en mejoras al inmunosensor actual y en un claro avance en la consolidación de este dispositivo como una prueba de diagnóstico. Sin embargo, es importante destacar que el hacer un estudio exhaustivo de muestras de sueros humanos es lo único que finalmente nos permitiría concluir respecto a si el dispositivo *EndTB* puede mejorar la eficiencia del diagnóstico de TB, y con ello contribuir significativamente al combate contra esta enfermedad de alta repercusión e interés mundial.

Finalmente, cabe mencionar que las aplicaciones de los dos esquemas de sensado desarrollados en este trabajo no se limitan al inmunosensado de tuberculosis. Prueba de ello es el potencial uso de estos sensores en el proyecto de "Ventanas al cerebro: *Windows to the Brain (WttB)*", el cual es un proyecto enfocado en desarrollar un implante craneal de cerámica transparente a base de zirconia, que permita la detección y tratamiento de lesiones cerebrales a través de métodos ópticos. El concepto se ilustra en la Fig. 5.1, en la cual puede apreciarse que está contemplada la incorporación de sensores de fibra óptica a esta plataforma teranóstica.

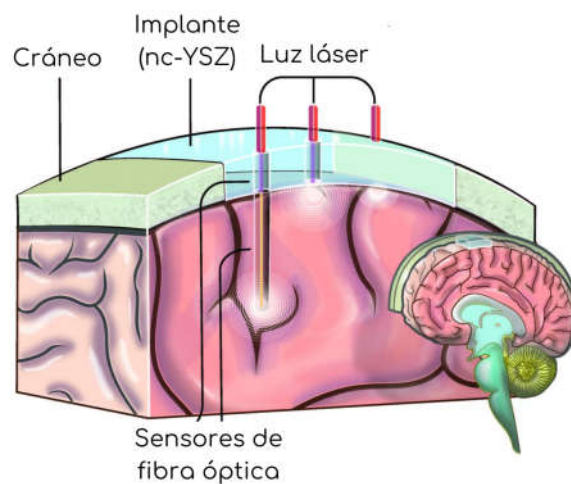


Figura 5.1: Esquema que muestra el concepto general del proyecto "Ventanas al cerebro: *Windows to the Brain (WttB)*". El cual consta de un implante craneal transparente que permite la detección y tratamiento de lesiones cerebrales a través de métodos ópticos.

Aunque el objetivo final es que en alguna etapa de este proyecto se integren dispositivos como los mostrados en este trabajo a la plataforma WttB, actualmente se están llevando a cabo actividades preliminares que están encaminadas a determinar las propiedades ópticas de los implantes, en las cuales se ha colaborado activamente (ver Anexo F).

# Apéndice A

## Protocolo para la realización del inmunoensayo enzimático (ELISA)

A continuación se describe de forma detallada el protocolo utilizado para la realización de los ELISA presentados en este trabajo. El protocolo está diseñado para una placa de microtitulación de 96 pozos.

### Procedimiento

1. Depositar el antígeno ( $100\mu L$ ) disuelto en un solvente adecuado. Secar una noche a  $37^{\circ}C$  o el tiempo necesario con pistola de aire.

**Para antígeno lipídico:**  $1\mu g$  de compuesto en  $100\mu L$  de etanol:hexano (1:1).

- Preparar previamente la mezcla etanol:hexano (1:1).
  - Pesar con exactitud el antígeno lipídico (aprox.  $1mg$  como mínimo) dentro de un matraz Erlenmeyer (o pesarlo en tubo y transferirlo cuantitativamente a un matraz).
  - Agregar el volumen necesario para obtener una concentración de  $10\mu g/mL$ .
  - Usar placas especiales para lípidos (*Nunc Polysorp*)
2. Saturar con  $200\mu L$  de una solución al 3% de BSA en PBS (1 – 2h a  $37^{\circ}C$ ).

3. Lavar 5 veces con PBS.
4. Colocar  $100\mu L$  de suero diluido (según cada método) en una solución al 0.3 % de BSA en PBS. Incubar una hora a  $37^{\circ}C$  o una noche a  $4^{\circ}C$ .
5. Lavar 5 veces con PBS.
6. Agregar  $100\mu L$  de anti-IgG conjugada a la fosfatasa (solución diluida en 0.3 % de BSA en PBS, a la dilución indicada para ELISA del lote usado). ATENCIÓN: No confundir, usar solamente el Ac anti-IgG de la especie estudiada (humano, conejo, etc.). Incubar 1 hora a  $37^{\circ}C$ .
7. Lavar 5 veces con una solución al 0.3 % de BSA en PBS.
8. Agregar  $100\mu L$  de p-nitrofenilfosfato diluido ( $1mg/mL$ ) en solución amortiguadora de dietanolamina. Preparar inmediatamente antes de usar. Incubar a  $37^{\circ}C$  al abrigo de la luz durante 15 minutos o el tiempo necesario. Leer la placa a  $405nm$  en un lector de microplacas.

## Preparación de soluciones

**Albúmina sérica bovina, o BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*), al 3 %**

Agregar  $80mL$  de PBS 1X en un vaso de precipitados, agregar  $3g$  de BSA en la superficie y esperar a que la proteína se solubilice lentamente (las soluciones de proteínas forman espuma si se agitan). Aforar a  $100mL$  con PBS 1X y homogeneizar.

**Solución amortiguadora de fosfatos, o PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), 10X, 1M,  $pH = 7.4$**

Para preparar 1 litro, pesar los compuestos indicados en la Tabla A.1 o los incluidos en la Tabla A.2. Posteriormente disolver en  $800mL$  de agua desionizada, ajustar el  $pH$  con HCl 1M, y aforar a 1 litro. Y, finalmente, esterilizar la solución en autoclave o por filtración, preparar alícuotas y conservar a temperatura ambiente.

Compuesto	Cantidad (g)
NaCl	80
KCl	2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4

Tabla A.1: Opción 1 de sales para preparar PBS 10X

Compuesto	Cantidad (g)
NaCl	80
KCl	2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	26.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4

Tabla A.2: Opción 2 de sales para preparar PBS 10X

**Solución amortiguadora de fosfatos, o PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), 0.01M,  $pH = 7.4$**

Preparar la solución incluyendo lo indicado en la Tabla A.3 y conservar a 4°C por una semana.

Solución	Cantidad (mL)
Solución amortiguadora de fosfatos 1M, $pH = 7.4$	10
H <sub>2</sub> O cbp (cantidad bastante para)	1000

Tabla A.3: Soluciones para preparar PBS 0.01M.

**Solución amortiguadora de de dietanolamina al 10%,  $pH = 9.8$**

Preparar lo indicado en la Tabla A.4. Agregar HCl concentrado cbp obtener un  $pH = 9.8$ . Aforar a 1000mL con H<sub>2</sub>O. Conservar al abrigo de la luz.

Solución	Cantidad
Dietanolamina	100μL
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	102mg
NaN <sub>3</sub>	0.4g
H <sub>2</sub> O	700mL

Tabla A.4: Soluciones para preparar solución amortiguadora de de dietanolamina al 10%,  $pH = 9.8$ 

*Este protocolo fue proporcionado por el Laboratorio de Nanobio-óptica del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM.*





## Apéndice B

### Solución amortiguadora de $pH = 3$ , $0.1M$

Para preparar 1 litro de esta solución amortiguadora el protocolo es el siguiente:

- Preparar  $800mL$  de agua destilada en un recipiente adecuado.
- Agregar  $2.714g$  de citrato de sodio deshidratado a la solución.
- Agregar  $17.437g$  de ácido acético a la solución.
- Ajustar el pH de la solución a 3 usando HCl o NaOH.
- Aforar a  $1000mL$  con  $H_2O$ .

*Este protocolo fue proporcionado por el Laboratorio de Nanobio-óptica del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM.*



# Apéndice C

## Protocolo de fijación de muestras biológicas con formalina

A continuación se describe el protocolo utilizado para la realización de la fijación del material biológico adherido a las membranas de PDMS para posibilitar la medición de éstas con el instrumento de inmunosensado presentado en este trabajo:

1. La muestra a fijar se lava con PBS 3 veces, sin dejar secar la muestra (es decir, colocar el buffer de lavado inmediatamente después de aspirar el medio o el PBS)
2. Agregar paraformaldehído al 4% a 4°C (500 $\mu$ L, o c.s.p. cubrir la muestra) e incubar a temperatura ambiente por 15 – 20 minutos
3. Lavar 3 veces con PBS, incubando durante 5 minutos después de cada lavado. NOTA: el 3er. lavado puede dejarse a 4°C y protegido de la luz hasta su observación.
4. Aspirar el PBS y retirar la muestra del pozo y escurrirlo en una toalla de papel.
5. Esperar que drene el exceso de la solución y retirar el excedente por aspiración (sin tocar la membrana de PDMS para evitar dañar el material biológico adherido).

6. Dejar secar al abrigo de la luz y realizar las mediciones pertinentes en el instrumento de inmunosensado.

*Este protocolo fue proporcionado por el Laboratorio de Nanobio-óptica del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM.*

# Apéndice D

## Otras aplicaciones del *Milmetrix*

Durante el doctorado se utilizó el *Milmetrix* en dos aplicaciones adicionales a la presentada en este trabajo. Estas aplicaciones están ligadas a trabajos de investigación realizados por estudiantes del Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille, en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (*LaNS-BioDyT*), y se muestran a continuación de forma breve.

### **Evaluación del efecto de la escritura láser sobre superficies de grafeno oxidado.**

El trabajo de investigación en cuestión tiene como objetivo principal presentar una vía alterna para la obtención de películas de óxido de grafeno reducido a gran escala, de forma rápida y de bajo costo. Para ello, un sustrato de vidrio es recubierto con óxido de grafeno (GOx) y se reduce por grabado láser, con un quemador de disco compacto [90]. El efecto de reducción produce un cambio aparente de coloración del GOx antes y después de que éste es expuesto a la energía fototérmica del láser, por lo que podría asumirse que el material está cambiando su índice de refracción. En ese sentido, se requería un método de caracterización que interrogara un área localizada y pequeña, que no implicara el contacto con la muestra para evitar modificación en su espesor y que permitiera distinguir correctamente las transiciones entre GOx y GOx reducido. Por esas razones el *Milmetrix* fue utilizado para evaluar este cambio

en la coloración, de ámbar a plateado. En la Fig. D.1, se muestra una imagen de una muestra de GOx reducida por grabados láser y el esquema que muestra las superficies reflejantes y cavidades FP que constituyen la muestra.

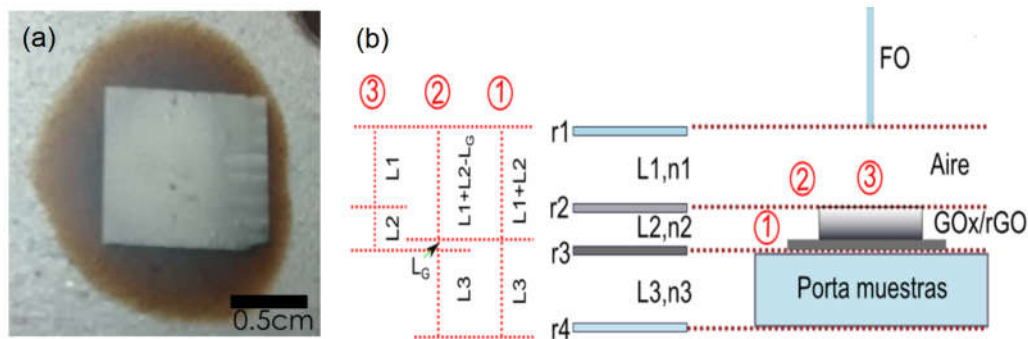


Figura D.1: Imagen (a) y esquema (b) de una muestra de grafeno óxidado reducido por grabado láser. El esquema muestra las superficies reflejantes y las cavidades FP involucradas en la caracterización de estas muestras.

Considerando el esquema de la Fig. D.1 (b), lo que se esperaría es que el cambio inducido por la reducción láser, aumentara la reflectancia de la muestra ( $r_2$ ), otorgando con ello la apariencia plateada observada en la imagen (Fig. D.1 (a)). Dado esto, si la reflectividad incrementa lo suficiente, la única cavidad que sería perceptible es la formada entre la fibra óptica y la superficie del óxido de grafeno reducido (rGO). La Fig. D.2 muestra los resultados obtenidos con las mediciones realizadas con el *Milmetrix*. En esta figura, tanto en el patrón de interferencia como su FFT, se puede apreciar cambios debido a la reducción vía grabado láser. En el patrón de interferencia una de las señales moduladas desaparece después del grabado y en la FFT hay una reducción en el número de componentes (como indica el círculo amarillo en esta figura). Con ello puede concluirse que solo una cavidad es apreciable después del grabado láser, lo que significa un aumento reflectividad y, por ende, un cambio en el índice de refracción del GOx. Por otro lado, el que no haya un corrimiento en la FFT, permite concluir que la muestra no sufre un cambio en su espesor, es decir, que no hay ablación láser en este proceso de oxidación.

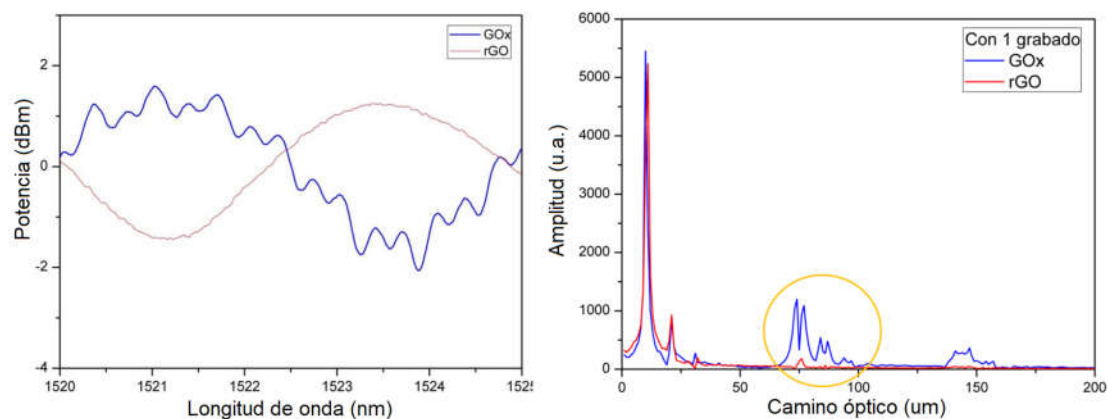


Figura D.2: Patrón de interferencia y su FFT para una muestra de óxido de grafeno, antes y después de su reducción vía grabado láser. El círculo amarillo indica las componentes que sufren mayor cambio después del proceso de reducción.

## Caracterización de guías de onda de PDMS

Las guías de onda que fueron caracterizadas con el *Milmetrix* fueron fabricadas utilizando PDMS y un método de fabricación sencillo y de bajo costo. Este método consiste en la microestructuración de un molde rígido de acrílico mediante ablación láser, para obtener réplicas de PDMS que funcionen como guías de onda. Para obtener estos dispositivos ópticos, además de la variación en la geometría dado por el molde de acrílico, es necesaria la modificación del índice de refracción del PDMS; lo cual fue logrado modificando la proporción en peso entre el polímero y el agente curante [91]. En este caso, se decidió utilizar el *Milmetrix* para caracterizar una guía de onda expuesta, tipo escalón (*rib*, en inglés), con el objetivo de obtener un perfil del cambio en el camino óptico en las diferentes zonas de la guía de onda. Las razones de utilizar este instrumento es la alta resolución espacial con la que se puede escanear la guía de onda y que es una técnica sin contacto, lo cual es altamente conveniente para no ocasionar deformaciones en el polímero.

En la Fig. D.3, se muestra una imagen de una de las guías de onda de PDMS caracterizadas y el esquema que muestra las superficies reflejantes y cavidades FP que constituyen la muestra.



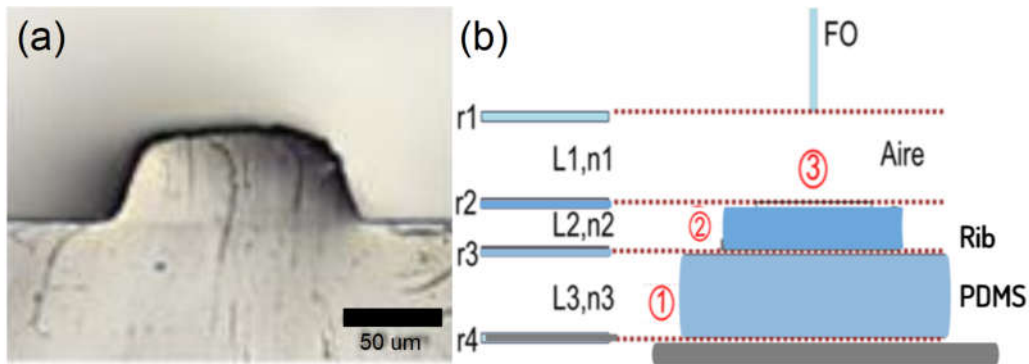


Figura D.3: Imagen (a) y esquema (b) de una guía de onda de PDMS. El esquema muestra las superficies reflejantes y las cavidades FP involucradas en la caracterización de estas guías de onda.

Para la caracterización de la guía de onda tipo escalón, se realizó un barrido transversal sobre la muestra, en pasos de  $1\mu$ . La Fig. D.4 muestra algunos de las FFT de los patrones de interferencia obtenidos durante dicho barrido. En negro se muestran las FFT correspondientes a la zona en la que no hay escalón, mientras que en azul se presentan las correspondientes a cuando la luz interactúa con el escalón. Como puede observarse en el área indicada con el círculo amarillo, es posible identificar una diferencia significativa entre las zonas que conforman la guía de onda (con o sin escalón). En la Fig. D.3 (b) puede observarse que, cuando la fibra óptica está colocada en el escalón hay un incremento en el espesor de la muestra y un cambio en el índice de refracción, por lo que esta variación en la FFT puede asociarse a estas modificaciones. Los resultados, además de mostrar que es posible identificar las diferentes zonas de la guía de onda, permitieron cuantificar que el escalón tiene una longitud de  $121\mu m$ , lo cual coincide con lo medido con otras técnicas utilizadas. Finalmente, es importante mencionar que con otras técnicas fue posible corroborar que los cambios en las diferentes zonas de la guía de onda corresponden a un  $\Delta L = 39.6\mu m$  y  $\Delta n = 1.3 \times 10^{-3} RIU$ , por lo que podría decirse que el *Milmetrix* es capaz de sensor cambios a estas escalas.

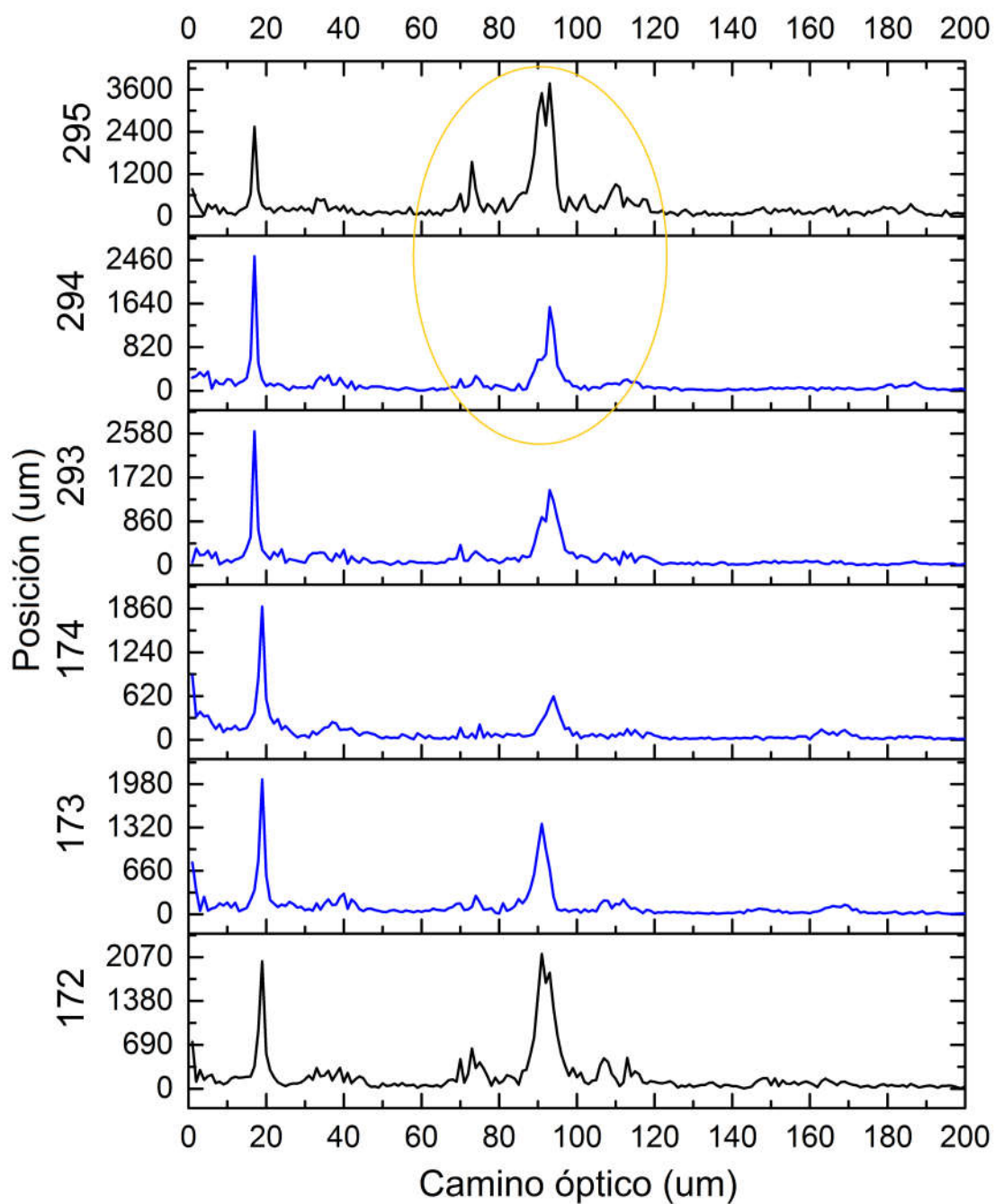


Figura D.4: FFT de los patrones de interferencia adquiridos haciendo un escaneo sobre la guía de onda con pasos de  $1\mu m$ . En azul se muestran las FFT de los patrones de interferencia adquiridos en el escalón; mientras que en negro estás las adquiridas fuera de éste



# Apéndice E

## Programas desarrollados

### Para la comparación teórica-experimental de un FPI de una cavidad

Para la realización de la comparación teórica-experimental, presentada en la Fig. 3.6 de este trabajo, se realizaron los dos programas mostrados a continuación y realizados en *Wolfram Mathematica*. El primero fue utilizado para calcular la respuesta teórica de un FPI de una cavidad, incluyendo el patrón de interferencia y su transformada de Fourier; considerando como parámetros los índices de refracción del medio y la superficie del portamuestras ( $n_2, n_3$ ), la distancia entre la fibra y el portamuestras ( $L_1$ ), y los coeficientes de reflexión correspondientes ( $r_1, r_2$  y  $r_3$ ) deseados. Por otro lado, el otro programa mostrado es útil para extraer la FFT de los patrones de interferencia adquiridos con los instrumentos virtuales.

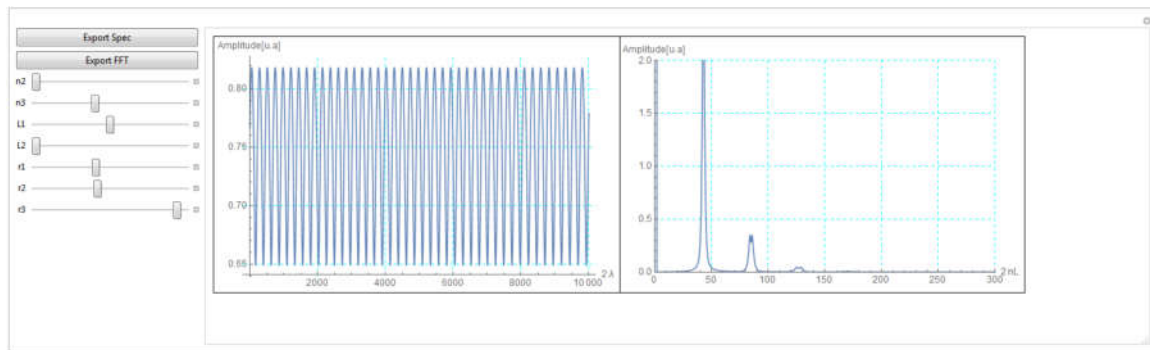
Programa E.1: Programa para calcular el patrón de interferencia teórico de un FPI de una cavidad y su transformada de Fourier.

```
1
2 (*Theoretical response for a one cavity FPI*)
3 (*1) The simulation includes the interferogram and its FFT*)
4 (*2) n2, n3, L1, r1, r2 and r3 can be modified*)
5 (*Mildred S. Cano, IIM, Last version 05-2017)
```

```

6
7 Manipulate[
8   Grid[{{plt3 =
9     ListLinePlot[
10      Table[N[(r1^2 + r2^2 + 2 r1 r2 Cos[2 2 Pi (L1*10^-6)
11        n2/(lambda*10^-9)])/(1 + r1 r2 (r1 r2 + 2 Cos[2 2 Pi
12          (L1*10^-6) n2/(lambda*10^-9)])]], {lambda, 1520, 1570,
13        0.005}], ImageSize -> Scaled[1], AxesLabel ->
14        {2 \[Lambda], "Amplitude[u.a]"}, LabelStyle ->
15        Directive[FontFamily -> "Helvetica", Medium],
16        GridLines -> Automatic, GridLinesStyle ->
17        Directive[Cyan, Dashed]],
18
19   pltfft3 =
20     ListLinePlot[
21       Abs[Fourier[
22         Table[N[(r1^2 + r2^2 + 2 r1 r2 Cos[2 2 Pi (L1*10^-6)
23           n2/(lambda*10^-9)])/(1 + r1 r2 (r1 r2 + 2 Cos[2 2 Pi
24             (L1*10^-6) n2/(lambda*10^-9)])]], {lambda, 1520, 1570,
25           0.005}]]], ImageSize -> Scaled[1],
26       PlotRange -> {{0, 300}, {0, 2}},
27       AxesLabel -> {2 nL, "Amplitude[u.a]"},
28       LabelStyle -> Directive[FontFamily -> "Helvetica",
29       Medium], GridLines -> Automatic,
30       GridLinesStyle -> Directive[Cyan, Dashed] ]}],
31   ItemSize -> {{40, 40}}, Frame -> All],
32   Button["Export Spec",
33     Export["Spec2c_" <> ToString[L1] <> ".png", plt2,
34       ImageResolution -> 400]], {plt2, ControlType -> None},
35   Button["Export FFT",
36     Export["FFT2c_" <> ToString[L1] <> ".png", pltfft2,
37       ImageResolution -> 400]], {pltfft2, ControlType -> None},
38     {n2, 1, 2, 0.001}, {n3, 1, 2, 0.001}, {L1, 0, 2000, 0.01},
39     {L2, 0, 2000, 0.01}, {r1, -1, 1, 0.0001}, {r2, -1, 1, 0.0001},
40     {r3, -1, 1, 0.0001}, ControlPlacement -> Left, ContentSize ->
41     {1200, 400}]

```



Programa E.2: Programa para extraer la FFT de los patrones de interferencia adquiridos experimentalmente

```

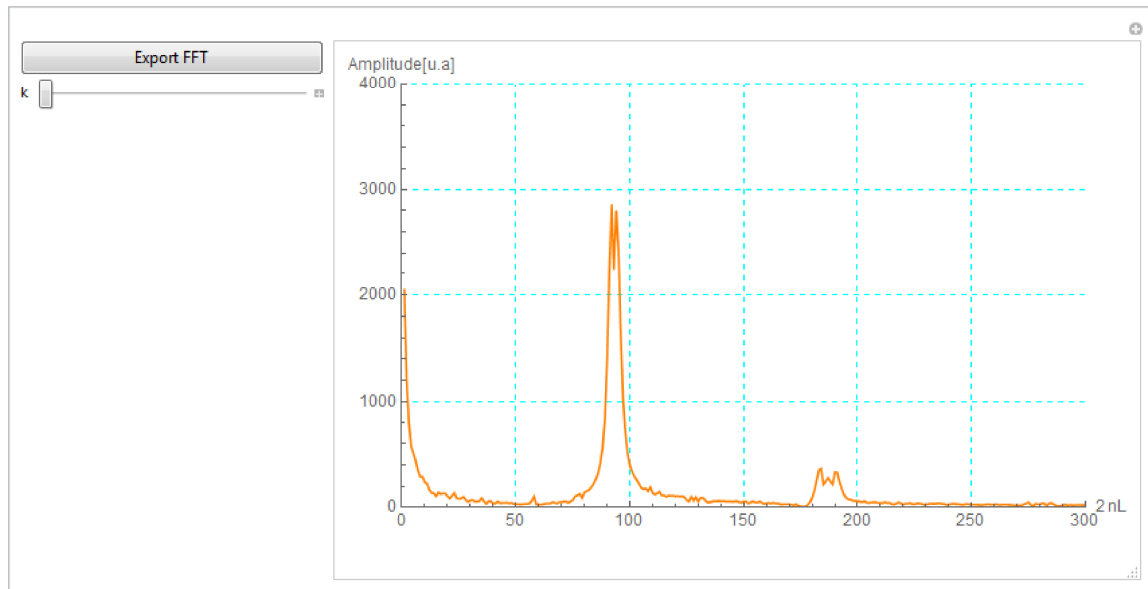
1 (*FFT of experimental interferogram *)
2 (*From the data matrix obtained with LabView*)
3 (*Mildred S. Cano, IIM, Last version 05-2017)
4
5 pathexp = SystemDialogInput["Directory"]
6 SetDirectory[pathexp];
7 Import["C:\\Users\\Juan\\Documents\\Mildred\\Tuberculosis\\
8 \\CFATA2017\\Portasamples\\0-Membranas\\FFT_1.dat", {"Data",
9 All, 10}];
10
11 Manipulate[
12   fftexp = ListLinePlot[
13     Import["C:\\Users\\Juan\\Documents\\Mildred\\Tuberculosis\\
14     CFATA2017\\Portasamples\\0-Membranas\\FFT_1.dat", {"Data",
15     All, k}], ImageSize -> Scaled[1], PlotStyle -> {Orange},
16     PlotRange -> {{0, 300}, {0, 4000}},
17     AxesLabel -> {2 nL, "Amplitude[u.a]"},
18     LabelStyle -> Directive[FontFamily -> "Helvetica", Medium],
19     GridLines -> Automatic, GridLinesStyle -> Directive[Cyan,
20     Dashed]], Button["Export FFT",
21     Export["FFT_exp_" <> ToString[1 - (0.1*(k - 1))] <> ".png",
22     fftexp, ImageResolution -> 400]], {fftexp, ControlType ->

```

```

23 None},{k, 1, 10,1}, ControlPlacement -> Left, ContentSize ->
24 {600, 400}]

```



**Para calcular la correlación cruzada entre patrones de interferencia.**

Para calcular la correlación cruzada entre dos patrones de interferencia y con ello obtener el corrimiento espectral entre éstos, se realizó el siguiente programa en *Matlab*.

Programa E.3: Programa para calcular el patrón de interferencia teórico de un FPI de una cavidad y su transformada de Fourier.

```

1
2 %%%Program to calculate the circular correlation between the ...
   row vectors of one matrix, taking only one row vector as a ...
   reference.
3 %%%The circular cross correlation is:
4 %%%c(k) = sum[a(n)*conj (b(n+k))]/[norm(a)*norm(b)];
5 %%%where vector b is shifted CIRCULARLY by k samples.
6 %%%Whit this program you can obtain the correlation signal and ...
   the delay.

```

```
7 %% REF A. V. Oppenheim, R. W. Schaffer and J. R. ...  
    Buck, Discrete-Time Signal  
8 %% Mildred S. Cano, IIM, 2019  
9  
10 clc  
11 clear data  
12 clear all  
13 close all  
14  
15 B=importdata('Before_probe5.dat');  
16 A=importdata('N5_Probe5_T2.dat');  
17 sam=(1570-1520)/10001; %This is the sampling rate  
18 wv=B(:,1); %The wavelength vector readed  
19 [d N]=size(A); %Number of the reference signal  
20 %Read each column and reshape to a row vector:  
21 %Calculating the number of columns:  
22 siz=size(A);  
23 col=siz(2);  
24  
25 % For the reference signal:  
26 R=A(:,1); %Extract each column  
27 Rr= reshape(R,1,[]); %Conversion to row vector  
28  
29 %Calculate the correlation for the entire matrix  
30 for n=2:col  
31     Ari=A(:,n); %Extract each column  
32     Ar= reshape(Ari,1,[]); %Conversion to row vector  
33     %Calculate the correlation:  
34     for k=1:length(Ar)  
35         c(k)=Rr*Ar';  
36         [~, I] = max(abs(c));  
37         [val, idx] = max(abs(c)); %Find the maximum value of the ...  
            correlation and the index  
38         Ar=[Ar(end),Ar(1:end-1)]; %circular shift  
39     end  
40     C(:,n)=c;
```



```
41     D(n)=I;
42 end
43
44 [acor,lag] = xcorr(Ar,Rr); %Calculate the lags
45
46 %To obtain the difference between the peaks in the entire matrix:
47 for l=2:length(D)
48     lagDiff= lag(D(l));
49     timeDiff(l) = lagDiff*sam;
50 end
51
52 %%Plotting one example
53 x=[0:length(Ar)-1]*sam; %lags
54 %Plotting:
55 S=N-1; %Number of the signal to plot
56 lagDiff = lag(D(S)); %Obtain the lag in the required vector
57 timeDiff = lagDiff*sam; %Provide the delay between signals
58     subplot(311); plot(wv,R); title('s1');
59     subplot(312); plot(wv,A(:,S)); title('s2');
60     subplot(313); plot(x,C(:,(S)));
61     title(['Cross-correlation between s1 and ...
62           s2',num2str(timeDiff(S))])
63
64 %% Calculate the evolution of the change
65 delay=unwrap(timeDiff);
66 figure
67 plot(delay); title('Delay');
68 figure
69 plot(timeDiff); title('nm difference');
70
71 %% To save the data in a file:
72 save('Evolution_N5_Probe5_T2.dat', 'eeev', '-ascii', '-double', ...
73      '-tabs')
```

**Para calcular la respuesta teórica del comportamiento del inmunosensor al sensar diferentes índices de refracción.**

Para calcular la respuesta teórica del inmunosensor al sensar diferentes índices de refracción se programó en Wolfram Mathematica el siguiente programa y los datos exportados se graficaron en *OriginLab* para obtener la Fig. 4.9.

Programa E.4: Programa para calcular el patrón de interferencia teórico del inmunosensor desarrollado al sensar diferentes índices de refracción.

```

1 (*Theoretical response for the immunosensor*)
2 (*Evaluating from surrounding refractive index from 1.3 to 1.5*)
3 (*Mildred S. Cano, IIM, Last version 2019)
4
5 nf = 1.451;
6 n2 = 1.3997;
7 r1 = (n1 - nf)/(n1 + nf)
8 r2 = (n2 - n1)/(n2 + n1)
9 L1 = 38;
10 po = Table[
11   N[(r1^2 + ((n2 - n1)/(n2 + n1))^2) +
12     2 r1 * ((n2 - n1)/(n2 + n1)) *
13     Cos[2 2 Pi (L1*10^-6) n2/(lambda*10^-9)]]/(1 +
14     r1 * ((n2 - n1)/(n2 + n1)) * ((r1 * ((n2 - n1)/(n2 + n1))) +
15     2 Cos[2 2 Pi (L1*10^-6) n2/(lambda*10^-9)])), {lambda, ...
16     1520,
17     1570, 0.005}]
18 pod = Table[Evaluate[po], {n1, 1.3, 1.5, 0.01}]
19 datap = Transpose[po]
20 Export["simulation_n1,35-1,5-0,01.dat", datap]
21 SystemOpen[
22   DirectoryName[AbsoluteFileName["simulation_n1,35-1,5-0,01.dat"]]

```



# Apéndice F

## Productos: presentaciones y artículos.

Durante el doctorado se realizaron las siguientes presentaciones en congresos internacionales:

1. **Mildred S. Cano-Velázquez**, Nami Davoodzadeh, David Halaney, Carrie R. Jonak, Devin K. Binder, Guillermo Aguilar, and Juan Hernández-Cordero, '*Evaluation of Optical Access to the Brain in the Near Infrared Range with a Transparent Cranial Implant*,' in Latin America Optics and Photonics Conference. OSA Technical Digest (Optical Society of America), 2018, paper Tu5C.2.
2. **Mildred S. Cano-Velázquez**, and Juan Hernández-Cordero, '*Controlled fabrication of polymer end-capped fiber optic sensors for refractive index sensing*,' in X RIAO- XVIII OPTILAS and MOPM 2019. Mexican Optics Academy, 2020.
3. **Mildred S. Cano-Velázquez**, Luz M. López-Marín, and Juan Hernández-Cordero, '*Fiber optic biosensor based polydimethylsiloxane (PDMS) and bioactive lipids*,' Proc. SPIE 11233, Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics and Treatment Applications XX, 112330Y (20 February 2020).
4. **Mildred S. Cano-Velázquez**, Nami Davoodzadeh, David Halaney, Carrie R. Jonak, Devin K. Binder, Juan Hernández-Cordero, and Guillermo Aguilar, '*Optical access to the brain through a transparent cranial implant*,' Proc. SPIE

11234, Optical Biopsy XVIII: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis, 112341A (21 February 2020). **Invited paper.**

Y, se colaboró en los siguientes artículos, listados cronológicamente:

1. Nami Davoodzadeh, **Mildred S. Cano-Velázquez**, David L. Halaney, Carrie R. Jonak, Devin K. Binder, and Guillermo Aguilar, '*Evaluation of a transparent cranial implant as a permanent window for cerebral blood flow imaging,*' Biomed. Opt. Express 9, 4879-4892 (2018).
2. Nami Davoodzadeh, **Mildred S. Cano-Velázquez**, David L. Halaney, Ariana Sabzeghabae, Gottlieb Uahengo, Javier Garay, and Guillermo Aguilar, '*Characterization of ageing resistant transparent nanocrystalline yttria-stabilized zirconia implant,*' J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. (2019).
3. **Mildred S. Cano-Velázquez**, Nami Davoodzadeh, David Halaney, Carrie R. Jonak, Devin K. Binder, Juan Hernández-Cordero, and Guillermo Aguilar, '*Enhanced near infrared optical access to the brain with a transparent cranial implant and scalp optical clearing,*' Biomed. Opt. Express 10, 3369-3379 (2019).
4. Nami Davoodzadeh, **Mildred S. Cano-Velázquez**, David L. Halaney, Carrie R. Jonak, Devin K. Binder and Guillermo Aguilar, '*Optical Access to Arteriovenous Cerebral Microcirculation Through a Transparent Cranial Implant*'. Lasers in Surgery and Medicine, 51(10), 920-932 (2019).
5. **Mildred S. Cano-Velázquez**, Luz M. López Marín, and Juan Hernández-Cordero, '*Fiber optic interferometric immunosensor based on Polydimethylsiloxane (PDMS) and bioactive lipids,*' Biomed. Opt. Express 11, 1316-1326 (2020).
6. David L. Halaney, Carrie R. Jonak, Junze Liu, Nami Davoodzadeh, **Mildred S. Cano-Velázquez**, Pasha Ehtiyatka, Hyle Park, Devin K. Binder, and Guillermo Aguilar, '*Chronic brain imaging across a transparent nanocrystalline yttria-stabilized-zirconia cranial implant,*' Front. Bioeng. Biotechnol. (2020).



# Fiber optic interferometric immunosensor based on polydimethylsiloxane (PDMS) and bioactive lipids

MILDRED S. CANO-VELÁZQUEZ,<sup>1,\*</sup> LUZ M. LÓPEZ-MARÍN,<sup>2</sup>  AND JUAN HERNÁNDEZ-CORDERO<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, Mexico*

<sup>2</sup>*Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Santiago de Querétaro, 76230, Querétaro, Mexico*

\**mildred.cano.vel@gmail.com*

**Abstract:** We demonstrate a novel and simple means to fabricate optical fiber immunosensors based on Fabry-Perot (F-P) interferometers using polydimethylsiloxane (PDMS) as support for bioactive lipids. The sensors are fabricated following a straightforward dip-coating method producing PDMS end-capped devices. A biosensing platform is realized by subsequent functionalization of the PDMS cap with a previously characterized bioactive lipid antigen cocktail from *Mycobacterium fortuitum*, used as a surrogate source of antigens for tuberculosis diagnosis. After functionalization of the PDMS, the F-P sensors were immersed in different antibody-containing sera and the registered changes in their spectral features were associated to the interactions between the active lipids and the serum antibodies. Our results show that the proposed PDMS end-capped F-P immunosensors perform well differentiating antibody-containing sera. Furthermore, they offer attractive attributes such as label-free operation, real-time detection capabilities and they are also reusable. The proposed sensors, therefore, serve as an enabling optical immunosensing technique offering excellent potential for developing novel lipidomic analytical tools.

© 2020 Optical Society of America under the terms of the [OSA Open Access Publishing Agreement](#)

## 1. Introduction

Fiber-optic Fabry-Pérot interferometers (FFPIs) have been used extensively for measuring chemical and physical parameters. Strain, molar concentration, temperature and refractive index, to name a few, have been successfully monitored using fiber-based devices [1]. Amid the different techniques for fabricating extrinsic Fabry-Perot (FP) cavities, the use of polymer overlays on the tip of standard single-mode optical fibers has gained a lot of attention [2–7]. This is mostly due to the ease of processing of polymeric materials, which can be deposited following straightforward dip-coating procedures, and can be readily cured on the tip of the fibers. Several polymers have been shown to provide a suitable platform for developing the so-called polymer end-caps forming the F-P cavity in these structures. Refractive index, temperature, pressure, humidity and concentration measurements have been carried out with such configurations [2–6,8], yielding robust structures and in some cases with multi-variable sensing capabilities (e.g., pressure and temperature) [7]. For biosensing applications, adequate biocompatible platforms capable to support bioactive molecules for biorecognition are always required. Polymer platforms are commonly used for these purposes, and they typically require further treatment to promote its functionalization with these bioactive entities [9–11].

Among the available polymers, Polydimethylsiloxane (PDMS) has become one of the main choices for biomedical related applications owing to its biocompatibility, chemical inertness, haemocompatibility, and optical transparency [12–15]. It is further easy to process, flexible and has low surface energy allowing for creating complex arrays for microfluidic biosensors

and for miniaturizable detection systems [16–18]. However, the high hydrophobicity of PDMS [19] has been considered as a disadvantageous feature for biosensing applications because these are mostly performed on aqueous-based systems. Biosensors generally rely on mediators of biological activity, including enzymes and other proteins, nucleic acids or peptides; consequently, several methods have been envisioned for surface modification of PDMS in order to promote the attachment of these hydrophilic molecules [15,20–23]. In contrast, the use of this versatile polymer for the attachment of molecular entities with total or partial hydrophobicity, such as lipidic molecules, has not yet been explored. In this paper, we demonstrate the use of PDMS functionalized with bioactive lipids as a suitable material for the development of a end-capped FFPI immunosensor.

The functionalization of the PDMS with bioactive lipids was performed by physisorption, via drop-casting, based on the hydrophobic nature of both, the polymer and the lipid [24]. To evaluate the performance of the proposed immunosensor, we used a lipid antigen cocktail from *Mycobacterium fortuitum* and the antibodies capable to recognize these lipid antigens. Such bacterial species have been previously used as a surrogate source of antigens for tuberculosis diagnosis [25,26]. The reactivity and differentiation capabilities of antibody-containing sera of the lipid-functionalized PDMS immunosensor was evaluated through spectral analysis. In particular, changes in the surrounding refractive index and dimensions of the end-cap, associated to the interactions between the active lipids and the serum antibodies, were effectively monitored by analyzing the spectral features of the FFPI. Our results demonstrate that the immunosensor is indeed able to recognize the sera antibodies offering an appropriate means for sera differentiation. We thus demonstrate an attractive lipidic platform for developing label-free immunosensors with real-time and direct detection capabilities.

## 2. Material and methods

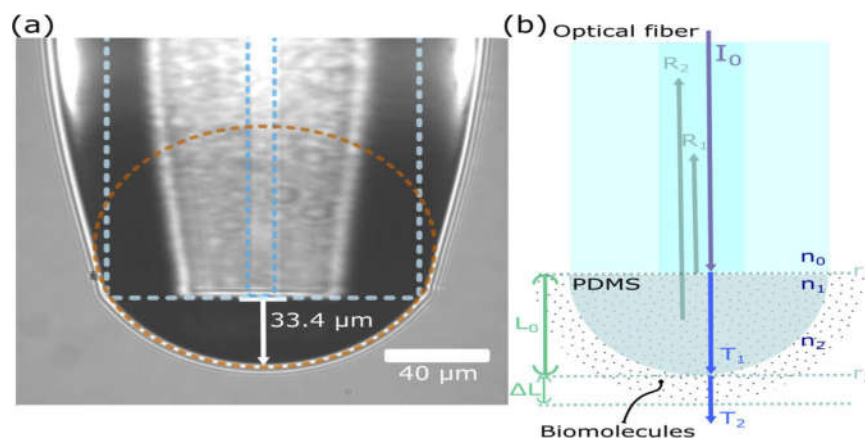
### 2.1. Materials and biological samples

A Sylgard 184 silicone elastomer (PDMS) kit was purchased from Dow Corning, USA. Phosphate buffer saline (PBS) 1M was prepared by adding 80 g of NaCl, 2 g of KCl, 14.4 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2.4 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> to 800 mL of deionized water, adjusting to pH=7.4 and diluted to the 1 L mark of a test tube. 3% solution of BSA (purchased from Sigma Aldrich, USA) in PBS was used as blocking buffer. A denaturing potassium biphthalate buffer was used to detach antibodies from the antigen-functionalized PDMS. This buffering solution was prepared by mixing 100 ml 0.1 M potassium hydrogen phthalate and 44.6 ml of 0.1 M HCl, followed by pH adjustment to 3.0.

The bacterial lipid antigens for PDMS functionalization were extracted from *Mycobacterium fortuitum*, comprising a mixture of glycolipids of high antigenicity [27,28]. The lipid antigens were purified by adsorption chromatography in an open Florisil column eluted with chloroform, acetone, and methanol (3 volumes each), followed by a solid phase extraction of the acetonic fraction onto a silica gel Sep-Pak column (Waters, USA) washed with chloroform and eluted with freshly distilled acetone. The purified lipids were dried under nitrogen and kept at –20°C until use. To obtain specific hydrosoluble ligands against the purified lipid antigens, serum antibodies were raised in two white New-Zealand rabbits (2 months old). Briefly, the antigen-containing acetonic fraction was suspended in NaCl 0.85% (10 mg in 1.0 ml) and mixed with 1.0 ml of complete Freund adjuvant (Sigma Aldrich, USA). Each individual received a subcutaneous administration of 1.0 ml antigen cocktail. At 15 and 30 days post-immunization, each animal received boosts consisting of 3 mg antigen mixture in 0.5 ml 0.85% NaCl and 0.5 ml incomplete Freund adjuvant (Sigma Aldrich, USA). The subjects were bled before immunization to obtain Pre-immune, control serum (*PS*) (serum devoid of anti-lipid antibodies). A terminal bleed was performed at day 45 post-immunization to obtain a Hyper-immune serum (*HS*) (serum with high content of anti-lipid antibodies).

## 2.2. Sensor fabrication and sensing principle

In order to fabricate a PDMS end-capped FFPI sensor [29], we used a simple dip-coating technique. A mixture of PDMS precursor and cross-linker (10:1 by mass) was prepared, mixed, degassed and pre-cured at 70°C during 15 min. This pre-curing process is essential to increase the viscosity of the PDMS drop in order to avoid Marangoni effects, which usually displace the polymer upwards along the fiber [30]. The polymer end-cap was realized by dipping the cleaved end face of a standard single-mode fiber (SMF-28e, Corning, USA) into a pre-cured drop of PDMS. A computer-controlled system for fiber positioning and pulling was used to set the appropriate velocities for driving the cleaved end-face of the fiber in and out of the pre-cured PDMS. Based on previous experiments for liquids analysis on optical fiber tips [30], the fiber displacement velocity was set to 1.7mm/s yielding a semi-spherical cap on the end face of the optical fiber. Afterwards, the end-capped sensor was vertically placed in an oven at 180 °C during 1 hour to fully solidify the PDMS. An image of the resulting fiber device is shown in Fig. 1(a).



**Fig. 1.** Image (a) and schematic representation (b) of the fabricated fiber optic sensor. The end-cap at the tip of the fiber forms a Fabry-Pérot interferometer. The dashed blue lines depict the core and the cladding of the optical fiber.

As shown schematically in Fig. 1(b), the PDMS end-cap and the cleaved end-face of the fiber form a FFPI. The spectral response of the FFPI can be described using two beam interference theory considering the Fresnel reflections from the two interfaces: the end-face of the fiber (core refractive index  $n_0$ ) and the surface of the PDMS end-cap (reflection coefficients  $r_1$  and  $r_2$ , respectively). Both interfaces are separated by the PDMS cap, with length  $L_0$  and refractive index  $n_1$ . With this arrangement, the total reflected intensity from the FFPI ( $I_R$ ) is given by [9,30]:

$$I_R = \frac{r_1^2 + 2r_1r_2 \cos(\phi) + r_2^2}{1 + 2r_1r_2 \cos(\phi) + r_1^2r_2^2} \quad (1)$$

where  $r_1 = \frac{n_1 - n_0}{n_0 + n_1}$ ,  $r_2 = \frac{n_2 - n_1}{n_1 + n_2}$ , and the phase difference is:

$$\phi = \frac{4\pi n_1 L_0}{\lambda} \quad (2)$$

where  $\lambda$  is the wavelength of the incident light.



According to Eqs. (1) and 2, the intensity pattern  $I_R$  is affected by variations of the refractive indices of the PDMS ( $n_1$ ) and the surrounding medium ( $n_2$ ), as well as by changes in the length of the resonant cavity ( $L_0$ ). Therefore, when the bio-molecules are attached to the sensor surface, the interference pattern will shift in wavelength ( $\Delta\lambda$ ) owing to changes in the effective length ( $\Delta L$ ) and in the surrounding refractive index ( $\Delta n_2$ ) [9,30]. The spectral shift can thus be associated with the modification of the PDMS surface due to the antigen attachment and further interactions of the sensor tip with the antibodies during the immunosensing test.

### 2.3. Characterization of the lipid-ligand system

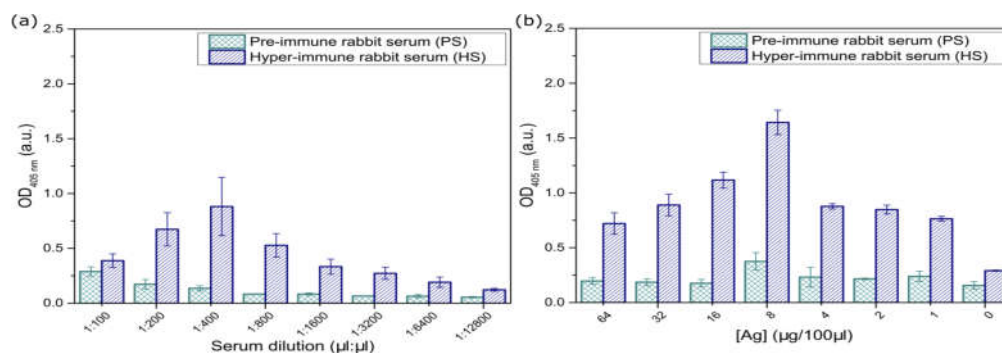
For our experiments, a mixture of well-known lipid antigens was purified from *M. fortuitum* and used to produce anti-lipid antibodies in rabbits. The obtained antigen-antibody pair was then used to explore whether PDMS was suitable to immobilize a bioactive lipid (i.e. the mycobacterial cocktail antigen) and for promoting the capture of antibodies. Common protocols for lipid immobilization rely on the attachment of a very little amount of the lipid substance on the material surface; hence, a highly sensitive method is frequently necessary to assess the binding. Given the antigen nature of the lipids used in this report, an immune assay (i.e. indirect ELISA protocol [31]) with Pre-immune serum (*PS*) and Hyper-immune serum (*HS*) was performed on PDMS to evaluate the antigen-antibodies interaction.

Briefly, for the indirect ELISA protocol, the PDMS surface was coated by drop-casting with the lipid antigen diluted in ethanol-hexane (1:1, v/v); then the reactivity of the lipids to specific antibodies was measured with a secondary antibody linked to alkaline phosphatase, an enzyme for the development of color as a final signal. In this kind of assay, the values of the optical density (OD) are directly associated with the degree of antigen-antibody binding [31]. Different doses of rabbit sera were used to explore the ability of the functionalized PDMS to capture anti-lipid antibodies. Each serum was prepared in 0.3% BSA in PBS, using a  $\log_2$  serial dilution (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800), for a fixed unbiased antigen concentration of  $64(\mu\text{g}/100\mu\text{L})$ . Similarly, to optimize the antigen concentration yielding the highest immunoreaction, the PDMS was functionalized by deposition of  $\log_2$  serial concentrations of lipid antigen onto the PDMS-containing wells, keeping fixed the optimum serum dilution obtained from the previous set of experiments. Hence,  $300\mu\text{L}$  of the antigen were deposited at concentrations of 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0 ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ). All experiments were performed in triplicates.

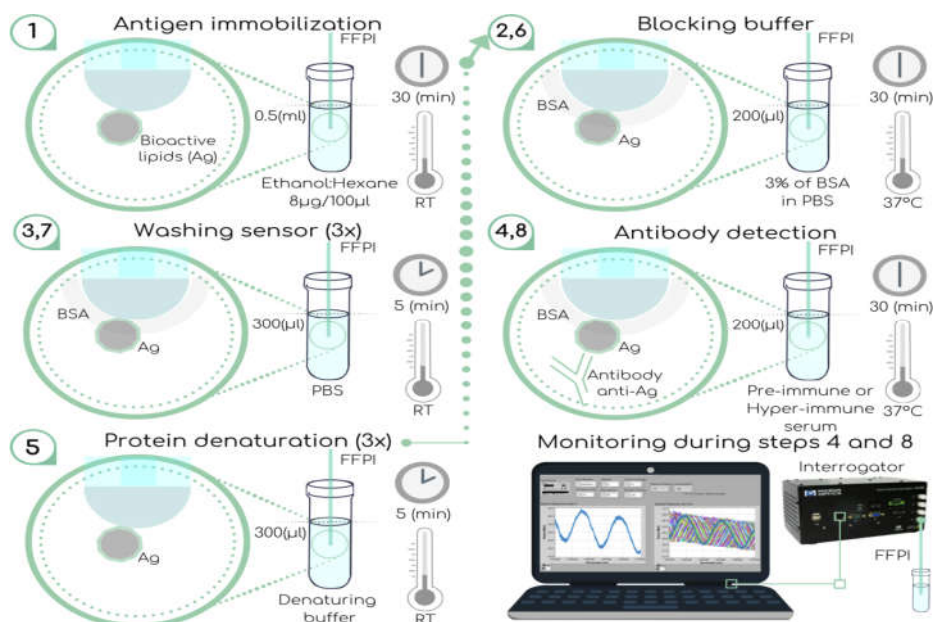
The ELISA results for both set of experiments are shown in Fig. 2. As seen in the figure, mycobacterial lipid antigens readily allowed the capture of rabbit specific antibodies. In all cases, the reactivity of Hyper-immune serum (*HS*), rich in specific anti-lipid antibodies, was found to be larger than that of the control serum (*PS*). These data show that the lipid antigen maintain their bioactivity after attachment on the PDMS, thereby demonstrating the suitability of this polymer for immobilization of these molecules. From these plots we further obtain that a maximum capture of serum antibodies is achieved for a serum dilution of 1 : 400 (Fig. 2(a)) and an antigen concentration of  $8(\mu\text{g}/100\mu\text{L})$  (Fig. 2(b)).

### 2.4. Functionalization of the FFPI sensor and direct immunoassay

Figure 3 shows the steps followed to functionalize and test the performance of the FFPI immunosensor. For PDMS functionalization, mycobacterial lipid antigens were immobilized on the end-capped sensor. This was achieved upon immersing the device in  $0.5\text{mL}$  of ethanol-hexane (1:1, v/v) with an antigen concentration of  $8(\mu\text{g}/100\mu\text{L})$  for 30 minutes, followed by a 15 minutes drying process at room temperature (step 1). Free binding sites were blocked by immersing the sensor tip in  $200\mu\text{L}$  of 3% BSA for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  (step 2), followed by three consecutive immersion washes in PBS ( $300\mu\text{L}$ ) (step 3). A total of three sensors were functionalized and treated following this procedure.



**Fig. 2.** ELISA results for antibody capture by the mycobacterial lipid antigen deposited onto PDMS. Results are shown for control, Pre-immune (*PS*) and specific antibody-containing Hyper-immune (*HS*) sera from lipid-immunized rabbits. (a) Results for 64 ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ) of mycobacterial lipid antigens deposited onto PDMS at 2-fold serial dilution of sera (1 : 100 to 1 : 12800 ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ )). (b) Results for lipid antigens deposited at increased concentrations (0-64 ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ )), keeping a serum dilution of 1 : 400 ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ). Each bar represents the mean OD  $\pm$  the standard errors from triplicate measurements.



**Fig. 3.** Procedure for functionalization of the FFPI sensor and for direct immunoassay tests (see text for details).

Antibody binding on the functionalized PDMS end-cap was explored by immersing the devices in Pre-immune (*PS*) and Hyper-immune (*HS*) sera. Each sensor was first immersed in 200  $\mu\text{L}$  of pre-immune serum dilution (1 : 400 ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$  cuando)) during 30 min at 37 °C (step 4). Subsequently, the same sensors were used for testing hyper-immune serum after removing the bound lipid ligands attached to the PDMS cap. This was done by immersion (3 times) in a denaturalizing buffer solution with pH 3 (step 5). The free binding sites on the fiber tips were immersed again in BSA for blocking (step 6) and finally washed three consecutive times in PBS (300  $\mu\text{L}$ ) (step 7). Following this process, the tips were immersed in 200  $\mu\text{L}$  of 1 : 400 ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ) hyper-immune serum dilution during 30 min at 37 °C (step 8).

While immersed in the *PS* and *HS* sera, the back-reflected interferometric signal at 1550 nm from the sensors was continuously monitored using a fiber Bragg grating interrogator (Micron Optics, sm125) and a virtual instrument for automatic acquisition of the spectra. The spectral response (i.e. interference pattern) of the immunosensor was acquired every 10s during 30 min. After these measurements were performed, the shift in wavelength ( $\Delta\lambda$ ) over time was obtained by cross-correlation of the acquired spectra. This was done using the built-in Matlab algorithm and cross-correlating the reference signal (interference pattern acquired at  $t = 0$ ) with the patterns acquired over time. The cross-correlation yields a maximum value indicating the corresponding wavelength shift, hence, the temporal evolution of  $\Delta\lambda$  can be readily obtained.

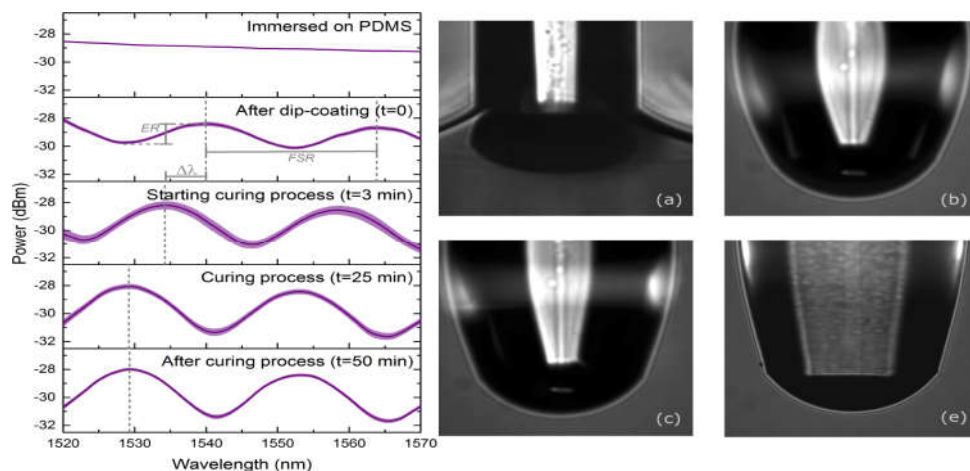
Because the sera are kept under incubation conditions (37 °C), thermal effects are expected to contribute to the shift in wavelength registered by the sensors. This is mainly due to the thermal expansion coefficient of the PDMS ( $3.2 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ), that will lead to a change in the effective length ( $\Delta L$ ) of the FP cavity. To account for this contribution, separate experiments were performed for registering the change in wavelength ( $\Delta\lambda$ ) while the immunosensor was immersed in PBS at 37 °C during 30 minutes. Similarly, in order to verify that the trends in  $\Delta\lambda$  obtained when testing *PS* and *HS* sera are only due to antigen-antibody interactions, untreated sensors (i.e., without the lipid antigen) were immersed in both sera. Under this conditions, no immuno-reaction should be expected and  $\Delta\lambda$  should be the same for both sera.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Sensors features

As part of the characterization of the fabricated FFPI sensors, the spectral response of the device was monitored continuously during the different stages of the fabrication process. Spectra was thus acquired before PDMS deposition and until the curing of the PDMS end-cap was finished; images of the probe were acquired during the dip coating and after the curing process with an InfinyTube system coupled with a 10x microscope objective, keeping the same focal plane. Figure 4 shows the spectral response and images for these different stages. First, during the immersion of the tip on PDMS (*case (a)*), there is no interferometric signal since a cavity is not defined at this stage. Once the fiber is pulled out from the PDMS, the end-cap is formed and an interference pattern is clearly visible (*case (b)*). When the curing process starts, the Extinction Ratio of the interferometric signal ( $ER = P_{max} - P_{min}$ ) increases as a result of the higher refractive index within the cavity due to the thermal curing process [29]. While kept at a constant temperature (180 °C) for curing, the interference pattern experiences a blue-shift associated to a decrease in cavity length. This is noticeable in the spectra shown in (*c*) and (*e*) and is also apparent upon comparing the corresponding images. Finally, a comparison between the interference patterns displayed in (*d*) and (*e*), shows that no significant changes are apparent in the spectra. Hence, after a total curing time of approximately 25 min the PDMS end-cap is completely cured and the physical dimensions and refractive index remain constant.

Since all the relevant parameters for the dipping process are kept under control (i.e., initial volume of PDMS and pre-curing conditions, fiber pulling velocities and final curing of the end-cap), the fabrication procedure consistently yields sensors with similar characteristics. For



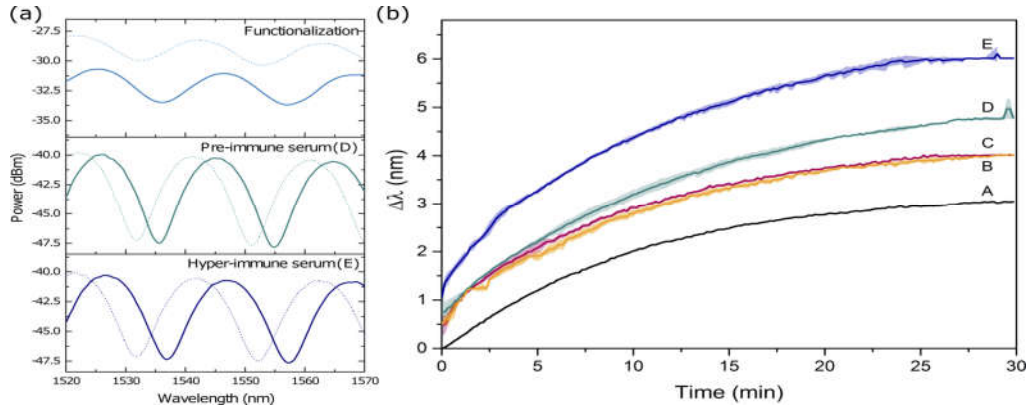
**Fig. 4.** Interference patterns obtained during the end-cap deposition on the tips of single-mode fibers. The shadows on the curves represent the standard deviation from three different fabricated sensors. The images show the fiber tip during immersion, after extraction from the PDMS, and at the initial and final moments of the curing process (see text for details).

all of the three sensors presented in this paper, the spectral features and their respective free spectral ranges FSR are similar ( $24.88 \pm 0.02 \text{ nm}$ ), corresponding to an effective cavity length (cap size) of approximately  $33.42 \pm 0.03 \mu\text{m}$ .

### 3.2. Antigen immobilization and immunoassay results

Typical spectra obtained from our experiments showing the time evolution of the interference pattern for different stages of the immunoassay are shown in Fig. 5(a). For all the stages shown in the figure, the interference patterns shift over time towards longer wavelengths (red shift) while the tip is immersed in the solutions. These shifts correspond to an increase in the optical thickness due to the attachment of the bio-layer onto the PDMS end-cap. This is evident even from the functionalization process: the spectral features of the interference pattern of the sensor experiences both, a wavelength shift ( $\Delta\lambda = 4.28 \text{ nm}$ ), a change in extinction ratio ( $\Delta ER = 0.53 \text{ dBm}$ ) and a change in free spectral range ( $\Delta FSR = 0.1 \text{ nm}$ ), thereby confirming the antigen immobilization on the PDMS.

The shifts in wavelength over time ( $\Delta\lambda$ ) obtained from cross-correlation of the acquired spectra for the different tested scenarios are plotted in Fig. 5(b). Notice first that thermal expansion effects are clearly visible from the sensor readout: after the sensor tip is immersed in PBS at  $37^\circ\text{C}$ ,  $\Delta\lambda$  increases reaching a maximum after 30 minutes (curve A). At this time, the PDMS cap seems to reach its maximum length due to thermal expansion. For the FFPI without lipid antigens (curves B and C), a wavelength shift ( $\Delta\lambda_i$ ) is initially registered upon immersion in the sera (either PS or HS) owing to the difference in refractive indices of these solutions and the PBS [32–34]. Once immersed in the PS and the HS solutions,  $\Delta\lambda$  has a very similar trend to that obtained in PBS (curve A). This trend in wavelength shift is thus attributed to thermal expansion effects leading to an increase in length of the PDMS cavities. We can thus conclude that there is no attachment of antibodies on the FFPI without the antigen; thus, neither the PS nor the HS can be identified properly. Furthermore, this confirms that immunosensing is not achieved



**Fig. 5.** (a) Spectral response of the fabricated end-capped sensor at different stages of the immunoassay: functionalization with antigenic lipids and immersion in Pre-immune and Hype-immune sera. The dashed and the continuous lines represent the first and last acquired interference pattern, respectively. (b) Wavelength shift ( $\Delta\lambda$ ) during detection of antigen-antibody binding on PDMS. Curves A, B and C show the performance of untreated (i.e., without the lipid antigen) sensors during incubation in PBS ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (A), control (PS) (B) and specific antibody-containing Hyper-immune (HS) (C) sera from lipid-immunized rabbits ( $1 : 400(\mu\text{L}/\mu\text{L})$ ). Curves D and E were obtained with functionalized sensors immersed in PS (D) and HS (E) sera (see text for details). The shadows on the curves represent the standard deviation from triplicate measurements.

through polymer-antibodies interactions, and that as shown below, the antigen functionalization is therefore essential for antibody detection.

The wavelength shifts obtained with the functionalized sensors when immersed in both sera (PS and HS) are shown in curves D and E of Fig. 5(b). While  $\Delta\lambda$  still changes over time showing the thermal expansion effects of PDMS, the maximum wavelength shifts obtained with both sera (PS and HS) are larger than those registered for the other devices (curves A, B and C), which are driven mostly by thermal expansion effects. This suggests that antibody binding on the functionalized PDMS cap indeed has an effect on the spectral response of the sensors. Notice further that the  $\Delta\lambda$  registered during immersion in the HS serum (curve E) is larger than that obtained with the PS serum (curve D) ( $\Delta\lambda_{HS} = 4.95\text{nm}$  vs.  $\Delta\lambda_{PS} = 4.03\text{nm}$ ). This is a reasonable outcome as the HS serum contains a larger number of specific antibodies, thus increasing the binding events and thereby leading to a larger  $\Delta\lambda$ . It is also important to remark that the readouts for the HS serum were collected after cleaning and blocking the probes once the results for PS were obtained. This therefore confirms that the antigen coating is preserved on the PDMS cap and the sensors can be readily reused after simple protein denaturation washes. Thus, the capabilities of the immunosensor based on PDMS functionalized with lipid ligands seem to scale well to suitable specific antibody detection and serum differentiation with attractive features (e.g. label-free and reusable system with real-time and direct detection, and facile fabrication and functionalization process). Table 1 shows a summary of our results. For comparative purposes, we can estimate the difference between the maximum wavelength shift ( $\Delta\lambda_f$ ) and the initial shift registered during immersion of the devices ( $\Delta\lambda_i$ ). This difference ( $S_{\Delta\lambda} = \Delta\lambda_f - \Delta\lambda_i$ ) represents the effective shift in wavelength due to thermal effects and any antigen-antibody interactions. Clearly, the largest

$S_{\Delta\lambda}$  is achieved for the Hyper-immune (*HS*) serum and further shows a marked difference with the Pre-immune (*PS*) ( $0.92nm$ ). Thus, the FFPI immunosensor based on PDMS functionalized with bioactive lipids is able to properly differentiate between different antibody-containing sera.

**Table 1. Wavelength shifts ( $\Delta\lambda$ ) achieved for the different immunoassays during incubation**

Curve	Antigen	Solution	$\Delta\lambda_i$	$\Delta\lambda_f$	$S_{\Delta\lambda}$
A	Yes	PBS	0	3.05	3.05
B	No	PS	0.49	4.01	3.52
C	No	HS	0.50	4.01	3.51
D	Yes	PS	0.75	4.78	4.03
E	Yes	HS	1.06	6.01	4.95

The wavelength shift occurring during the immunoassay test can be estimated as [9]:

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda(n_1 + \Delta L)(L_0 + \Delta n)}{n_1 L_0} \quad (3)$$

Considering the contributions by the bio-layer and the thermal effects in the PDMS, the changes in length and refractive index ( $\Delta L$  and  $\Delta n$ ) can be expressed as:

$$\Delta L = L_{bio} + (\alpha_L \Delta T L_0) \quad (4)$$

$$\Delta n = n_{bio} + (\alpha_n \Delta T n_1) \quad (5)$$

where  $\Delta T$  is the increase in temperature,  $\alpha_L = 3.2 \times 10^{-4} \frac{1}{^\circ C}$  and  $\alpha_n = -1.8 \times 10^{-4} \frac{1}{^\circ C}$  correspond to the thermal expansion and thermo optic coefficients of PDMS, respectively [35,36]. Using these values and our experimental conditions ( $L_0 = 33.42 \mu m$ ,  $n_1 = 1.3997$  [37],  $\Delta T = 37^\circ C - 23^\circ C = 14^\circ C$ , and  $\lambda = 1550nm$ ), Eq. (3) can be rewritten as:

$$\Delta\lambda = 3.04nm + (46.38 \times 10^{-3})L_{bio} + (1.1 \times 10^{-6})n_{bio} \quad (6)$$

The first term in this expression represents the thermal effects contributing to the shift in wavelength. Notice that this value agrees well with the  $S_{\Delta\lambda}$  obtained for the untreated sensors (i.e., without the antigen, curves *A*, *B* and *C*). In these cases, there is no antigen-antibody interactions and only thermal effects are expected to produce a shift in wavelength. For the functionalized sensors (curves *D* and *E*), the wavelength shifts due to bio-recognition effects might be evaluated upon subtracting the thermal effects contributions (i.e.,  $S_{\Delta\lambda} - 3.53nm$ ). This yields  $0.50nm$  and  $1.42nm$  for the Pre-immune (*PS*) and the Hyper-immune (*HS*) serum, respectively. According to Eq. (6) the contribution of the bio-layer thickness is much larger than its refractive index. Thus, neglecting the last term in this equation we can estimate that the bio-layer attached to the immunosensor for pre-immune serum has a thickness of  $10.78nm$ , while for hyper-immune serum reaches  $30.61nm$ . Note that these layers include the antigen coating and any antibodies that could have attached to the functionalized PDMS surface. Hence, considering that the tests were performed with the same immunosensors, the thickness difference could be attributed to changes in the PDMS end-cap surface owing to antigen-antibody binding effects, as reported previously for other bio-sensing platforms [9,38].

#### 4. Conclusions

We have demonstrated the detection of antibodies with a fiber optic sensor based on PDMS and bioactive lipids. Our results show that the proposed FFPI immunosensor is able to differentiate antibody-containing sera through changes in the spectral features of the device. These are

associated to the interactions between the active lipids and the serum antibodies. The FFPI immunosensor shows attractive features such as ease of fabrication, label-free operation, real-time monitoring capabilities and reusability. Because sensing is based on antigen-antibody interaction, the end-capped devices may be used for detection of any type of target molecule, provided a proper antigen is immobilized on the PDMS. To the best of our knowledge, this is the first report showing that PDMS holds good functionalization capabilities by simple deposition of lipid mediators. Evidently, further studies are needed to assess the usefulness of PDMS for the immobilization of other bioactive lipids. Nonetheless, our results demonstrate a novel means for fabrication of optical biosensors for lipidomics tools analysis, such as those needed for the screening of unknown ligands or their reactivity with human fluid components (biomarkers of diseases, for instance) which require the availability of supports for bioactive lipids attachment. Indeed, the exploration of PDMS functionalized with mycobacterial lipid antigens, such as the one presented here, is highly encouraging for the diagnosis tuberculosis, currently one of the top killer diseases worldwide.

### Funding

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IG100519).

### Disclosures

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

### References

1. K. Menghrajani, "Fibre-optic Fabry–Perot sensors: an introduction," (2018).
2. X. Tan, Y. Geng, X. Li, Y. Deng, Z. Yin, and R. Gao, "UV-curable polymer microhemisphere-based fiber-optic Fabry–Perot interferometer for simultaneous measurement of refractive index and temperature," *IEEE Photonics J.* **6**(4), 1–8 (2014).
3. X.-Y. Zhang, Y.-S. Yu, C.-C. Zhu, C. Chen, R. Yang, Y. Xue, Q.-D. Chen, and H.-B. Sun, "Miniature end-capped fiber sensor for refractive index and temperature measurement," *IEEE Photonics Technol. Lett.* **26**(1), 7–10 (2014).
4. I. Hernández-Romano, M. A. Cruz-García, C. Moreno-Hernández, D. Monzón-Hernández, E. O. López-Figueroa, O. E. Paredes-Gallardo, M. Torres-Cisneros, and J. Villatoro, "Optical fiber temperature sensor based on a microcavity with polymer overlay," *Opt. Express* **24**(5), 5654–5661 (2016).
5. O. Arrizabalaga, J. Velasco, J. Zubia, I. S. de Ocaíz, and J. Villatoro, "Miniature interferometric humidity sensor based on an off-center polymer cap onto optical fiber facet," *Sens. Actuators, B* **297**, 126700 (2019).
6. M. Li, Y. Liu, S. Qu, and Y. Li, "Fiber-optic sensor tip for measuring temperature and liquid refractive index," *Opt. Eng.* **53**(11), 116110 (2014).
7. A. Guermat, A. Guessoum, N.-E. Demagh, M. Zaboub, and Z. Bouhafs, "Fibre-optic temperature and pressure sensor based on a deformable concave micro-mirror," *Sens. Actuators, A* **270**, 205–213 (2018).
8. J.-F. Hu and C.-P. Yu, "Microlens-based fiber Fabry–Pérot interferometer for the measurement of the concentration of sugar solution," in *2014 OptoElectronics and Communication Conference and Australian Conference on Optical Fibre Technology*, (IEEE, 2014), pp. 821–822.
9. Y.-T. Tseng, Y.-J. Chuang, Y.-C. Wu, C.-S. Yang, M.-C. Wang, and F.-G. Tseng, "A gold-nanoparticle-enhanced immune sensor based on fiber optic interferometry," *Nanotechnology* **19**(34), 345501 (2008).
10. L. Chen, C. Chan, R. Menon, P. Balamurali, W. Wong, X. Ang, P. Hu, M. Shaillender, B. Neu, P. Zu, Z. Tou, C. Poh, and K. Leong, "Fabry–Perot fiber-optic immunosensor based on suspended layer-by-layer (chitosan/polystyrene sulfonate) membrane," *Sens. Actuators, B* **188**, 185–192 (2013).
11. R. B. Queirós, S. Silva, J. Noronha, O. Frazão, P. Jorge, G. Aguilar, P. Marques, and M. G. F. Sales, "Microcystin-Ir detection in water by the Fabry–Pérot interferometer using an optical fibre coated with a sol–gel imprinted sensing membrane," *Biosens. Bioelectron.* **26**(9), 3932–3937 (2011).
12. K. F. Lei, "Microfluidic Systems for Diagnostic Applications: A Review," *J. Lab. Autom.* **17**(5), 330–347 (2012).
13. S. Agrawal, K. Paknikar, and D. Bodas, "Development of immunosensor using magnetic nanoparticles and circular microchannels in PDMS," *Microelectron. Eng.* **115**, 66–69 (2014).
14. J. N. Patel, B. L. Gray, B. Kaminska, and B. D. Gates, "Flexible glucose sensor utilizing multilayer pdms process," in *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, (IEEE, 2008), pp. 5749–5752.

15. F. Gaudiere, I. Masson, S. Morin-Grognet, O. Thoumire, J.-P. Vannier, H. Atmani, G. Ladama, and B. Labat, "Mechano-chemical control of cell behaviour by elastomer templates coated with biomimetic Layer-by-Layer nanofilms," *Soft Matter* **8**(32), 8327–8337 (2012).
16. J. Friend and L. Yeo, "Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane," *Biomicrofluidics* **4**(2), 026502 (2010).
17. K. Jiang, P. C. Thomas, S. P. Forry, D. L. DeVoe, and S. R. Raghavan, "Microfluidic synthesis of monodisperse PDMS microbeads as discrete oxygen sensors," *Soft Matter* **8**(4), 923–926 (2012).
18. C. Badre, J. P. Chapelab, and S. Yang, "Selective dry and reversible transfer-printing of nanoparticles on top of PDMS wrinkles," *Soft Matter* **7**(21), 9886–9889 (2011).
19. D. Bodas and C. Khan-Malek, "Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—an sem investigation," *Sens. Actuators, B* **123**(1), 368–373 (2007).
20. E. Jastrzebska, A. Zuchowska, S. Flis, P. Sokolowska, M. Bulka, A. Dybko, and Z. Brzozka, "Biological characterization of the modified poly (dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays," *Biomicrofluidics* **12**(4), 044105 (2018).
21. T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro, and K. Ishihara, "Biomimetic phosphorylcholine polymer grafting from polydimethylsiloxane surface using photo-induced polymerization," *Biomaterials* **27**(30), 5151–5160 (2006).
22. F. Tian, J. Lyu, J. Shi, F. Tan, and M. Yang, "A polymeric microfluidic device integrated with nanoporous alumina membranes for simultaneous detection of multiple foodborne pathogens," *Sens. Actuators, B* **225**, 312–318 (2016).
23. J.-H. Seo, T. Shibayama, M. Takai, and K. Ishihara, "Quick and simple modification of a poly (dimethylsiloxane) surface by optimized molecular design of the anti-biofouling phospholipid copolymer," *Soft Matter* **7**(6), 2968–2976 (2011).
24. D. L. Nelson, A. L. Lehninger, and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Macmillan, 2008).
25. X. Tan, M. K. Khaing Oo, Y. Gong, Y. Li, H. Zhu, and X. Fan, "Glass capillary based microfluidic elisa for rapid diagnostics," *Analyst* **142**(13), 2378–2385 (2017).
26. F. Hou, Q. Zhang, J. Yang, X. Li, X. Yang, S. Wang, and Z. Cheng, "Development of a microplate reader compatible microfluidic chip for ELISA," *Biomed. Microdevices* **14**(4), 729–737 (2012).
27. L. Escamilla, R. Mancilla, W. Glender, and L.-M. López-Marín, "Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**(6), 1864–1867 (1996).
28. L. M. López-Marín, E. Segura, C. Hermida-Escobedo, A. Lemassu, and M. C. Salinas-Carmona, "6, 6'-dimycoloyl trehalose from a rapidly growing mycobacterium: an alternative antigen for tuberculosis serodiagnosis," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **36**(1-2), 47–54 (2003).
29. X.-Y. Zhang, Y.-S. Yu, C.-C. Zhu, C. Chen, R. Yang, Y. Xue, Q.-D. Chen, and H.-B. Sun, "Miniature end-capped fiber sensor for refractive index and temperature measurement," *IEEE Photonics Technol. Lett.* **26**(1), 7–10 (2014).
30. V. A. Márquez-Cruz and J. A. Hernández-Cordero, "Fiber optic Fabry-Perot sensor for surface tension analysis," *Opt. Express* **22**(3), 3028–3038 (2014).
31. T. Kohl and C. Ascoli, "Protocol: Indirect Immunometric ELISA," *Cold Spring Harb Protoc.* **125**, 1128–1129 (2003).
32. S. Liu, Z. Deng, J. Li, J. Wang, N. Huang, R. Cui, Q. Zhang, J. Mei, W. Zhou, C. Zhang, Q. Ye, and J. Tian, "Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region," *J. Biomed. Opt.* **24**(3), 1–5 (2019).
33. H. Li, L. Lin, and S. Xie, "Refractive index of human whole blood with different types in the visible and near-infrared ranges," in *Laser-Tissue Interaction XI: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical*, vol. 3914 (International Society for Optics and Photonics, 2000), pp. 517–521.
34. R. Bruck, E. Melnik, P. Muellner, R. Hainberger, and M. Lämmerhofer, "Integrated polymer-based Mach-Zehnder interferometer label-free streptavidin biosensor compatible with injection molding," *Biosens. Bioelectron.* **26**(9), 3832–3837 (2011).
35. B. E. Schubert and D. Floreano, "Variable stiffness material based on rigid low-melting-point-alloy microstructures embedded in soft poly (dimethylsiloxane) (PDMS)," *RSC Adv.* **3**(46), 24671–24679 (2013).
36. B.-B. Li, Q.-Y. Wang, Y.-F. Xiao, X.-F. Jiang, Y. Li, L. Xiao, and Q. Gong, "On chip, high-sensitivity thermal sensor based on high-q polydimethylsiloxane-coated microresonator," *Appl. Phys. Lett.* **96**(25), 251109 (2010).
37. D. C. Company, "Sylgard 184 silicone elastomer," (2017).
38. K. Wysokiński, D. Budnicki, J. Fidelus, Ł. Szostkiewicz, Ł. Ostrowski, M. Murawski, M. Staniszewski, M. Staniszevska, M. Napierała, and T. Nasitowski, "Dual-core all-fiber integrated immunosensor for detection of protein antigens," *Biosens. Bioelectron.* **114**, 22–29 (2018).



# Enhanced near infrared optical access to the brain with a transparent cranial implant and scalp optical clearing

MILDRED S. CANO-VELÁZQUEZ,<sup>1,\*</sup> NAMI DAVOODZADEH,<sup>2</sup> DAVID HALANEY,<sup>2</sup> CARRIE R. JONAK,<sup>3</sup> DEVIN K. BINDER,<sup>3</sup> JUAN HERNÁNDEZ-CORDERO,<sup>1</sup> AND GUILLERMO AGUILAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>2</sup>Department of Mechanical Engineering, University of California, Riverside, CA, USA

<sup>3</sup>Division of Biomedical Sciences, School of Medicine, University of California, Riverside, CA, USA

\*mildred.cano.vel@gmail.com

**Abstract:** We report on the enhanced optical transmittance in the NIR wavelength range (900 to 2400 nm) offered by a transparent Yttria-stabilized zirconia (YSZ) implant coupled with optical clearing agents (OCAs). The enhancement in optical access to the brain is evaluated upon comparing *ex-vivo* transmittance measurements of mice native skull and the YSZ cranial implant with scalp and OCAs. An increase in transmittance of up to 50% and attenuation lengths of up to 2.4 mm (i.e., a five-fold increase in light penetration) are obtained with the YSZ implant and the OCAs. The use of this ceramic implant and the biocompatible optical clearing agents offer attractive features for NIR optical techniques for brain theranostics.

© 2019 Optical Society of America under the terms of the [OSA Open Access Publishing Agreement](#)

## 1. Introduction

The brain is protected by different tissue layers, each of them having different optical properties (e.g., refractive index contrast, scattering and absorption); hence, the analysis of the spectral features provide information about these different layers [1]. Furthermore, it has been shown that physiological changes in the different head tissues produce variations in their optical properties thereby changing the spectral features of the transmitted and reflected light [2]. Compared to visible light, some spectral regions in the Near Infrared (NIR) spectral range (800 to 2500 nm) offers advantages such as reduced scattering and absorption as well as a deeper penetration depth in tissue media [2–4]. Because of these features, some spectral windows within the NIR wavelength range have shown promising results for brain studies, including deep imaging, diagnostics and therapeutic applications in brain diseases [5–8].

Different optically transparent windows for head tissues have been identified within the NIR spectral range. These wavelength windows avoid light attenuation by the tissue due to water absorption peaks located at 1450 nm and 1940 nm [1, 9, 10]. The first window NIR-I (~ 700–1000 nm), or conventional window, has been well characterized and studied for most tissues, including brain and other soft tissues [1]. Two additional optical windows have been also identified: NIR-II (~ 1000–1350 nm) and NIR -III, or short -wave infrared SWIR, (~ 1550–1870 nm); the latter spectral region has shown to provide maximum light penetration for some kinds of tissues [7, 11, 12]. More recently, a fourth optical window, SWIR-II (~ 2100–2300 nm) has allowed for improved optical studies of the brain and for deep brain imaging, particularly when compared to the NIR -II window [8]. All of these spectral regions have been explored for many biophotonic applications, although the NIR windows have particularly shown excellent potential for noninvasive through-skull *in vivo* brain imaging and spectroscopy [6, 7, 11, 13]. Nonetheless, it is always desirable to reduce the highly scattering cranial bone over the cortex, which hinders the observation of optical signals deriving from deeper tissues and reduce the light penetration

distance.

Reduction of the scattering from the skull has been addressed in animal models by craniotomy [14–16], using a thinned-skull cranial physical window [17, 18] or by polishing and reinforcing a thinned skull piece [19]. Other approaches include optical clearing of the skull [20–22], or replacement of a portion of the skull with a physical transparent window made from glass or PDMS [23–25]. All of these are powerful research techniques, but not adequate for translation into human applications that may require permanent cranial implants. While skull thinning and polishing techniques affect the required protection for the brain, glass-based physical windows have a very low toughness ( $KIC = 0.7 - 0.9 \text{MPa} \cdot \text{m}^{\frac{1}{2}}$ ) [26] increasing the potentiality of catastrophic failure by fracture. Similarly, the effects of skull optical clearing agents for long-term use on human skull is still unknown. A number of biomedical considerations including biocompatibility, mechanical strength, and ageing performance must be considered for a physical window intended for eventual clinical applications. Conventional cranial prosthesis including titanium, alumina, and acrylic [27], do not provide the desired combination of transparency and toughness required for clinically-viable transparent cranial implants. Other materials such as sapphire have been also proposed as implants owing to its broadband transparency and toughness thereby providing optical access to the brain [28]. We have recently also introduced a transparent nanocrystalline yttria-stabilized-zirconia cranial implant material showing suitable mechanical strength and biocompatibility sought for a clinically-viable permanent cranial implant for patients [29–31]. Yttria-stabilized zirconia (YSZ) is an attractive alternative due to its relatively high fracture toughness ( $KIC \sim 8 \text{MPa} \cdot \text{m}^{\frac{1}{2}}$ ) [32], as well as its proven biocompatibility in dental and orthopedic applications [33–35]. By performing biocompatibility and ageing tests, and through imaging techniques such as optical coherence tomography [29], ultrasound transmission [36], multi-wavelength intrinsic optical signal imaging [37] and Laser Speckle Imaging (LSI) [38, 39], we have demonstrated the feasibility of YSZ implants for chronic cortical imaging in an acute murine model. Thus, YSZ holds as a promising platform for developing optically transparent implants with excellent potential for human applications.

In this paper, we report on the enhancement in optical access provided by the transparent YSZ implant for brain studies in the NIR wavelength range. Because this cranial implant is sought as a means to obtain optical access for post-operative and prolonged diagnostics and/or therapy purposes, scalp scattering must be overcome. In this context, we also evaluate the use of optical clearing agents (OCAs) in the scalp, particularly their effects on the optical transmittance in the NIR spectral range. As shown in previous reports, OCAs provide greater optical probing depths and better contrast, as well as improved light focusing and spatial resolution [40–42]. Therefore, evaluation of the optical features of the YSZ implant together with the use of OCAs in the NIR spectral range will provide useful information for theranostics applications operating in this wavelength range (e.g., photobiomodulation [43–45], NIR and fluorescence imaging [3, 46], cancer diagnosis [47, 48] and brain edema [49]). Hence, we evaluate the enhancement in optical access to the brain upon comparing ex-vivo transmittance measurements of mice native skull and the YSZ cranial implant coupled with scalp and OCAs. Using the transmittance data, the total attenuation lengths were calculated showing that this combination (YSZ and OCAs) offers the best option for gaining improved optical access to the brain.

## 2. Samples and methods

### 2.1. Implant fabrication and preparation

Transparent nanocrystalline 8 mol%  $\text{YO}_{1.5}$  yttria-stabilized zirconia (YSZ) implant samples were produced from a precursor YSZ nanopowder (Tosoh USA, Inc., Grove City, OH, USA) densified into a transparent bulk ceramic via Current-Activated Pressure-Assisted Densification (CAPAD) procedure developed by Garay et al. and described extensively previously [50, 51].

The thickness of the resulting densified YSZ discs were reduced from 1 mm to approximately 450  $\mu\text{m}$  by polishing with 30  $\mu\text{m}$  diamond slurry on an automatic polisher (Pace Technologies, Tucson, Arizona USA). The samples were then polished with successively finer diamond and silica slurries ranging from 6 to 0.2  $\mu\text{m}$ . Samples were sectioned into rectangles of approximately 2.6 x 2.1 mm using a diamond lapping saw (WEIYI DTQ-5, Qingdao, China), followed by sonication in acetone and thorough rinsing in water. The final thickness of the implants was  $440 \pm 1 \mu\text{m}$ .

## 2.2. Scalp and skull samples

The tissue samples were obtained from animals from the University of California, Riverside (UCR). All experimental procedures and humane care of mice were conducted under a protocol approved by UCR's Institutional Animal Care and Use Committee, and in conformance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The N=9 8-12 week old C57Bl/6 male mice (Jackson Laboratory) used in this study were housed under a 12-hour light and 12-hour dark cycle with *ad libitum* access to food and water.

## 2.3. Surgical procedures

Craniectomy surgery was conducted as previously described [39]. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane inhalation (0.2-0.5%), and given ketamine and xylazine (K/X) (80/10 mg/kg, i.p.). Additional anesthetic was administered as necessary. Hair was removed from the scalp using clippers and depilatory cream. Mice were then secured into stereotaxic frames to immobilize the head for surgery. Ophthalmic ointment was placed over the eyes, and the surgical site was sterilized with alternating application of betadine and 70% EtOH (3 times). A sagittal incision was made to the left of the midline, and the scalp excised to expose the skull. Periosteum was removed from the skull, and a craniectomy was performed with a surgical drill and carbide burr to remove a square section of skull over the right parietal lobe, with dimensions slightly larger than the implant (2.6 x 2.6 mm).

## 2.4. Optical clearing

A mixture of two biocompatible agents, PEG-400 (PEG) and Propylene Glycol (PG) (Fisher Scientific, California, US), were used as scattering reducer and penetration enhancer, respectively, at a volume ratio of 9:1 [52, 53]. The OCA was prepared and topically applied at room temperature. A thin layer of the OCA was applied on the sample and remained for 50 minutes [52]. Characterization experiments were performed before and immediately after applying the OCA; the increase in transmittance for each tissue used in the samples was monitored every minute over a 50-minute period. For our experimental conditions, the maxima in transmittance were achieved within 50 minutes.

## 2.5. Tissue characterization

Optical transmittance measurements of the different samples used in this study were obtained through optical spectrometry in the NIR. The setup used to obtain the transmittance spectra incorporates two multimode optical fibers (P400-2-VIS-NIR, Ocean Optics, FL) attached to individual fiber holders including VIS-NIR collimating lenses (MP-74-UV, Ocean Optics, FL, with focal length  $f = 10\text{mm}$ , lens diameter  $D = 5\text{mm}$  and  $NA = D/2f = 0.4$ ). As depicted in Fig. 1, the holders were attached to a mechanical rail allowing to adjust the separation between the fibers and to allocate a sample holder. After the sample is fixed, the fiber holders were tightly joined together to mitigate detrimental effects from ambient light and back reflections. The light source used for these measurements was a visible-NIR source (HL2000 FHSA, Ocean Optics, FL) launched into one of the optical fibers. The beam exiting the launching fiber then traverses

the sample and is collected by the other fiber, which is connected to a solid-state spectrometer (NIRQUEST 520, Ocean Optics, FL) to obtain the optical transmission spectra. Spectra were acquired averaging 10 measurements, with an integration time of 300 ms, in the 900-2400 nm wavelength range.

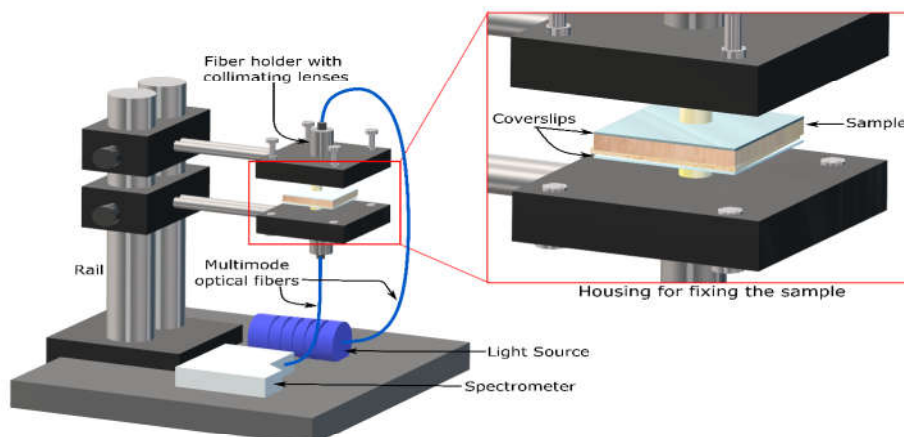


Fig. 1. Collimated transmittance measurements setup. The inset shows the housing for fixing the sample, i.e., the fiber holders with the VIS-NIR collimating lenses. As seen in the inset, the samples are placed between coverslips (see text for further details).

For all the measurements, the collimated transmittance ( $T(\lambda)$ ) was calculated as the ratio of light transmitted through the sample to the total incident light, i.e.:

$$T(\lambda) = \frac{S(\lambda) - D}{I(\lambda) - D} \quad (1)$$

where  $\lambda$  is the wavelength,  $S$  is the measured spectral intensity,  $I$  is the total light incident and  $D$  represents the reference reading under dark conditions (i.e., no light impinging on the sample). Basic models of light propagation in biological tissues are described in terms of radiation transport in a random inhomogeneous media, which includes ballistic and diffuse light [2, 5, 8, 54]. However, when using a collimated beam, and in the case of thin samples with large absorption coefficients and relatively small light scattering, the ballistic part plays a dominant role and the diffusive part is negligible [2, 8, 54]. We further consider that the ballistic photons in the scattering samples are governed by the Beer-Lambert law. Hence, for analyzing the influence of the sample thickness  $z$  in the spectral transmittance, the total attenuation length ( $l_t(\lambda)$ ) was calculated as [2, 5, 8, 54]:

$$l_t(\lambda) = \frac{z}{-\ln(T(\lambda))} \quad (2)$$

Note that the attenuation length takes into account the sample thickness and therefore provides a better insight of the light penetration through the samples. In particular, for our experiments, the thicknesses of the samples are:  $440 \pm 1 \mu\text{m}$ ,  $159 \pm 1 \mu\text{m}$  and  $710 \pm 20 \mu\text{m}$  for the YSZ implant, the mice skull and scalp, respectively. Hence, the YSZ implant is 2.5 times thicker than the mice skull.

### 2.6. Experimental method

The experimental procedure for measuring the ballistic transmittance through the different tissues and the implant was similar to those reported previously for spectroscopic measurements on soft tissue [5, 8, 54]. Transmittance measurements were obtained for three sets of samples arranged as the different scenarios illustrated in Fig. 2. Spectra were obtained first for the skull and subsequently for the stacked array formed by the scalp placed on top of the skull. The OCAs were then applied on the scalp and the spectral transmittance was acquired once again. This set of measurements were also performed using the YSZ implant instead of the skull. The stacking arrangement used for this measurements allowed for evaluating the effects of each layer on the spectral features of the sample. This further allows for comparing the spectral features of the skull and the YSZ implant under similar conditions. Excised full thickness scalp and forehead cranial bone were rinsed briefly in saline solution to remove the excess blood and their thicknesses were measured before placing them in the stacked samples. These were finally placed between two glass microscope coverslips to obtain the transmittance spectra. The same procedure was followed for the YSZ implant. For the cleared skin measurements the scalps were topically exposed to PEG and PG as a scattering reducer and a penetration enhancer, respectively [52, 53].



Fig. 2. Stacked sample arrangement used to obtain the spectral transmittance of: 1) the native skull and YSZ implant, 2) the scalp on top of the skull and the YSZ implant, 3) optical cleared (OC) scalp on top of native skull and implant.

### 3. Results and discussion

Figure 3 shows the transmittance ( $T(\lambda)$ ) and the attenuation length ( $l_t(\lambda)$ ) calculated for the native skull and the implant. The transmittance measurements (Fig. 3(a)) show that the YSZ implant is more transparent throughout the tested NIR range (900-2400 nm) including all of the optical windows commonly used for biophotonic applications (i.e., NIR I, NIR II, SWIR I and SWIR II). This is due to the significant reduction in scattering and absorption when using the YSZ implant. In terms of relative differences in the optical properties between skull and the implant, the latter improves the light transmission within the water absorption bands owing to its reduced water content compared to the native skull (70-75%) [5]. The skull transmittance shows the typical water absorption bands in the NIR spectral region (1450 nm and 1940 nm [9, 10]), while the YSZ implant shows improved transmittance in these bands. The water absorption peaks apparent in the implant spectrum are due to traces of the saline solution used for rinsing aiming at obtaining a fair comparison with the treated tissue samples. A simple calculation of the increase of light transmitted in these bands using the YSZ implant compared to the native skull yields values of 47% at 1450 nm and 53% at 1940 nm. The resulting attenuation length shown in Fig. 3(b) further indicates that, even for the spectral regions with the smallest increase in transmission (e.g., 3% at 1300 nm), light can penetrate deeper when compared to the native skull. Clearly, with exception of the second water absorption band, the attenuation length obtained with the implant increases at least by 1.3 mm, i.e., a four-fold increase in length compared to the skull.

The spectral regions covered by the water absorption peaks in the NIR have not been explored for through-skull techniques because of its high water content. Thus, the improved transmission obtained with the implant opens the possibility to explore new techniques in these wavelength ranges.

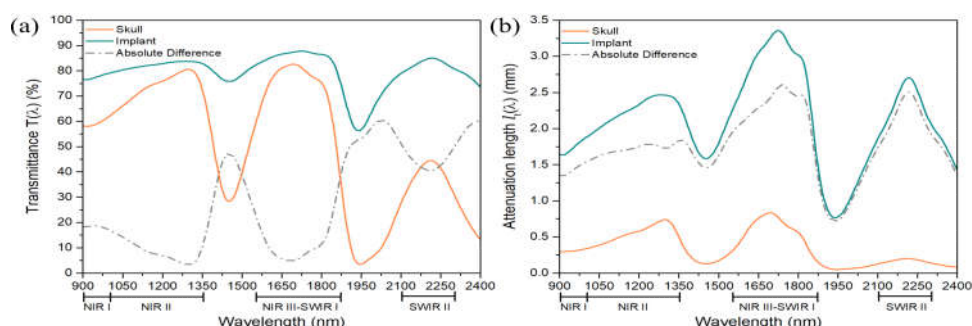


Fig. 3. Transmittance (a) and total attenuation length (b) for the skull and the YSZ implant. The YSZ implant shows better transmittance throughout the full 900-2400 nm spectral range compared to the native skull.

The effect of the scalp on the spectra is evident in Fig. 4(a), showing a considerable reduction in transmission owing to the increased scattering inherent to this tissue [1–3]. As shown in Fig. 4(b), this leads to reduced attenuation lengths for both sample arrangements, i.e., scalp either on top of the skull or on the YSZ implant. Although for both cases the scalp stacking leads to a reduction in transmittance of at least 60%, the sample with the implant still provides the best performance, as confirmed by the attenuation length. Throughout all the spectral range, the sample formed with the scalp and the YSZ implant provides improved light penetration. Clearly, the scalp introduces large optical attenuation effects that must be overcome for the implant to become a convenient means to obtain access for non-invasive optical techniques for post-operative diagnostics and/or therapeutic purposes. Hence, we evaluated the use of OCAs as a technique for improving the transmittance of the samples.

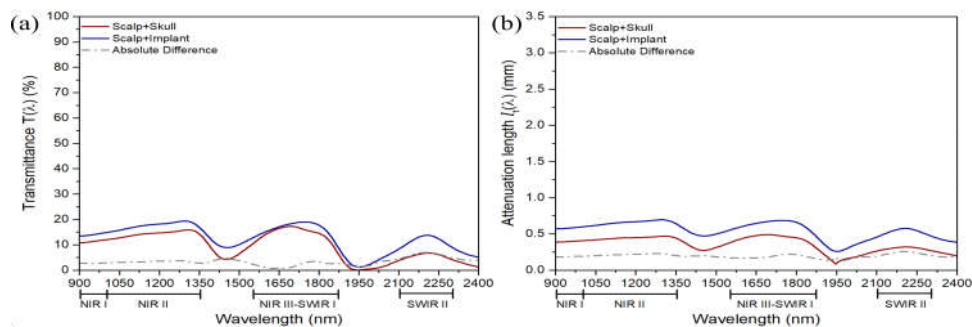


Fig. 4. Transmittance (a) and total attenuation length (b) comparing the stacked samples of the scalp on top of the skull and on the YSZ implant. The sample with the YSZ implant still shows better transmittance and improved attenuation length compared to the sample with the native skull; however, the enhancement is only of 6% in the best case.

The effects of applying a layer of OCAs on the scalp are evident in Fig. 5; the transmittance spectra increases by 20% for the sample with the skull, while for the YSZ implant the enhancement is 40% (Fig. 5(a)). As shown in Fig. 5(b), the attenuation length for both samples increases accordingly; when compared to the results shown in Fig. 4(b), it is clear that the OCAs effectively enhance the light penetration yielding larger attenuation lengths throughout the whole NIR range for both samples. Further comparison of this parameter for the two samples show that the YSZ provides improved light penetration than attained with the skull (up to 1.8 mm more at 1717 nm). These results are consistent with previous reports involving OCAs [40–42], and further confirm that together with the YSZ implant, these biocompatible agents provide attractive features for optical access to the brain tissue without scalp removal.

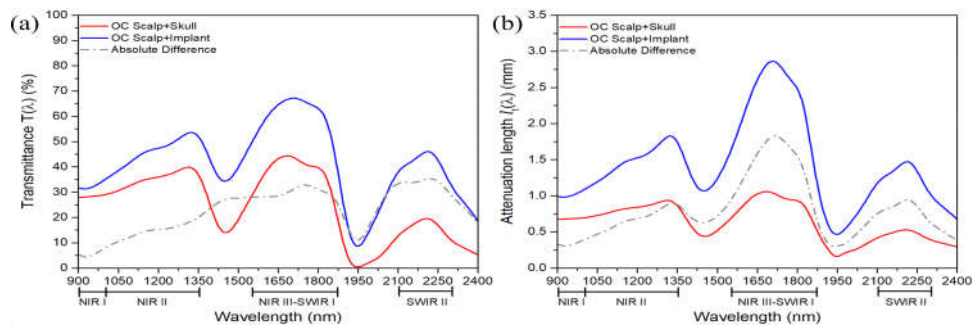


Fig. 5. Transmittance (a) and total attenuation length (b) comparing the stacked samples of the scalp on top of the skull and on the YSZ implant after using the OCAs. The sample using the YSZ implant with optically cleared scalp (OC scalp) shows an increase of up to 30% in transmittance compared to the sample with the skull.

A better idea of the impact of our results in each of the NIR optical windows can be appreciated in Fig. 6, showing a summary of the transmittances and attenuation lengths obtained from our experiments. Comparing all the scenarios, the YSZ implant provides the best option for optical access, showing the largest transmittance and attenuation length. Although the transmittance for the YSZ is seemingly comparable to that of the skull for the NIR II and NIR III windows, the attenuation lengths for the implant are clearly larger than those obtained for the skull (Fig. 6(b)). In fact, for all the windows, the YSZ implant offers improved features and thus better potential for deeper optical access to the brain tissue, even when using the scalp on top. When using OCAs to reduce the scattering of the scalp, the YSZ implant offers improved transmittance and larger attenuation lengths than those observed for the skull. Remarkably, the attenuation lengths achieved with the OCAs and the YSZ show at least a two-fold increase for the last three windows (i.e., NIR II, NIR III-SWIR I and SWIR II). Evidently, the optical features offered by the YSZ implant together with the use of biocompatible agents to reduce scalp scattering pose new possibilities for probing brain tissue in spectral regions that are commonly discarded owing to the low penetration depths that can be commonly achieved [5]. Note that these results provide a direct comparison of the attenuation lengths achieved when replacing the mice skull by the YSZ implant. It is evident that the transparency of the YSZ implant improves the light penetration, but the ultimate increase in penetration depth achievable will depend on the scattering features of the specific bone tissue. Further considerations for the analysis of the spectral transmission should include the diffuse light component, which is relevant when using thicker and more absorbent tissue samples (e.g., rat skull [5]).

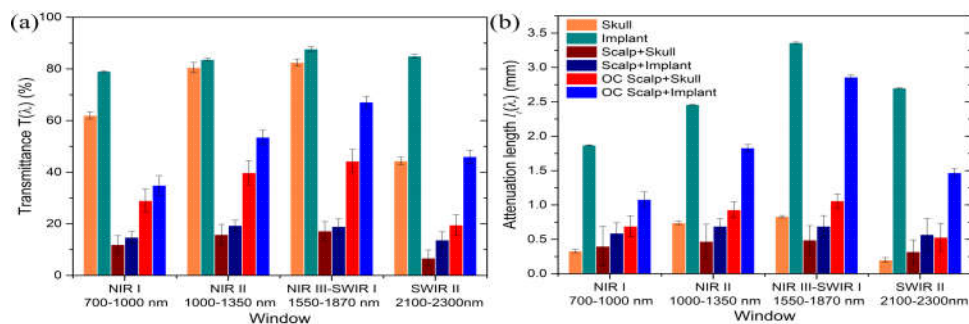


Fig. 6. Summary of the registered transmittance (a) and total attenuation length (b) for the different samples tested in our experiments. Throughout the whole NIR spectral range the YSZ implant shows enhanced transmittance among all the samples. The use of OCAs on the scalp effectively increases both, the transmittance and the attenuation length, providing enhanced light penetration. The most favored optical window for the stacked sample of optically cleared scalp on top of the YSZ implant is the NIR III (1550-1870 nm,  $T=67\%$ ,  $l_t=2.86$  mm). Error bars represent standard deviation ( $n=3$ ).

The enhanced transparency of the YSZ implant coupled with the OCAs shows promising features to facilitate various NIR techniques for theranostics. Photobiomodulation (600-1064 nm) [43–45], NIR and fluorescence imaging (700-1700 nm) [3, 46], as well as some types of cancer diagnosis (1500-1800 nm) [47, 48] and brain edema [49] are a few examples of optical techniques that could benefit from the improved transmission in NIR spectral range offered by the YSZ implant. Additionally, any potential adhesion of biochemical agents and/or tissue growth on the implant (e.g., fibrotic tissue, proteins, cell adhesion) could be potentially monitored over time using IR reflection techniques [55]. Imaging techniques (e.g., LSI, fluorescence, absorption) that have been successfully demonstrated to improve with clearing and thinning skull methods [22], may also benefit from the combination of the OCAs and a transparent YSZ implant.

#### 4. Conclusions

We have evaluated the optical transmission and attenuation length of a novel YSZ-based implant intended for chronic optical access to the brain performing *ex-vivo* transmittance measurements. In addition, the use of OCAs to overcome the low transparency of the scalp was explored together with the implant. Direct comparison of the YSZ implant with mouse skull in different stacked arrangements showed that this ceramic material offers enhanced transmission throughout the NIR spectral range. Furthermore, since OCAs effectively reduce the scattering features of the scalp, the use of these biocompatible agents together with the YSZ implant provide improved optical features. In particular, when compared to a typical arrangement comprised of scalp and native skull, the use of the YSZ implant yields an increase in transmittance of up to 50% and attenuation lengths of up to 2.4 mm (i.e., a five-fold increase in light penetration). These experimental results show evidence that the YSZ implant, when used together with the OCAs, offers the best option for gaining improved optical access to the brain. This novel approach seeks to provide new opportunities for monitoring brain conditions on a chronically recurring basis, without requiring repeated craniotomies or scalp removal. Although this study represents only the first step towards the application of NIR optical techniques for brain theranostics through an implant, it offers a relevant insight of the opportunities that this transparent material may eventually provide.





### Funding

Conacyt-FONCICYT (246648); Conacyt-‘Beca Mixta’(741249); National Science Foundation (NSF) (NSF-PIRE 1545852, NSF-EAGER 1547014).

### Acknowledgments

The authors would like to thank Gottlieb Uahengo for the fabrication of the YSZ samples.

### Disclosures

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

### References

1. S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: a review,” *Phys. Med. Biol.* **58**, R37–61 (2013).
2. L. A. Sordillo, Y. Pu, S. Pratavieira, Y. Budansky, and R. R. Alfano, “Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows,” *J. Biomed. Opt.* **19**, 056004 (2014).
3. G. Hong, A. L. Antaris, and H. Dai, “Near-infrared fluorophores for biomedical imaging,” *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 0010 (2017).
4. A. N. Bashkatov, K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy, M. L. Chernavina, E. A. Genina, V. D. Genin, V. I. Kochubey, E. N. Lazareva, A. B. Pravdin, M. E. Shvachkina, P. A. Timoshina, “Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing,” *J. biomedical optics* **23**, 091416 (2018).
5. S. Golovynskiy, I. Golovynska, L. I. Stepanova, O. I. Datsenko, L. Liu, J. Qu, and T. Y. Ohulchanskyy, “Optical windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications,” *J. biophotonics* **11**, e201800141 (2018).
6. S. J. Madsen, *Optical Methods and Instrumentation in Brain Imaging and Therapy* (Springer Science & Business Media, 2012).
7. G. Hong, S. Diao, J. Chang, A. L. Antaris, C. Chen, B. Zhang, S. Zhao, D. N. Atochin, P. L. Huang, K. I. Andreasson, C. J. Kuo, and H. Dai, “Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window,” *Nat. Photonics* **8**, 723–730 (2014).
8. L. Shi, L. A. Sordillo, A. Rodríguez-Contreras, and R. Alfano, “Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging,” *J. Biophotonics* **9**, 38–43 (2016).
9. J. A. Curcio and C. C. Petty, “The near infrared absorption spectrum of liquid water,” *J. Opt. Soc. Am.*, *JOSA* **41**, 302–304 (1951).
10. C.-L. Tsai, J.-C. Chen, W.-J. Wang, and Others, “Near-infrared absorption property of biological soft tissue constituents,” *J. Med. Biol. Eng.* **21**, 7–14 (2001).
11. Y. Tsukasaki, M. Morimatsu, G. Nishimura, T. Sakata, H. Yasuda, A. Komatsuzaki, T. M. Watanabe, and T. Jin, “Synthesis and optical properties of emission-tunable PbS/CdS core-shell quantum dots for in vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window,” *RSC Adv.* **4**, 41164–41171 (2014).
12. R. H. Wilson, K. P. Nadeau, F. B. Jaworski, B. J. Tromberg, and A. J. Durkin, “Review of short-wave infrared spectroscopy and imaging methods for biological tissue characterization,” *J. Biomed. Opt.* **20**, 030901 (2015).
13. N. S. James, T. Y. Ohulchanskyy, Y. Chen, P. Joshi, X. Zheng, L. N. Goswami, and R. K. Pandey, “Comparative tumor imaging and PDT efficacy of HPPH conjugated in the mono- and di-forms to various polymethine cyanine dyes: part - 2,” *Theranostics* **3**, 703–718 (2013).
14. H.-T. Xu, F. Pan, G. Yang, and W.-B. Gan, “Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex,” *Nat. Neurosci.* **10**, 549–551 (2007).
15. A. Holtmaat, T. Bonhoeffer, D. K. Chow, J. Chuckowree, V. De Paola, S. B. Hofer, M. Hübener, T. Keck, G. Knott, W.-C. A. Lee, R. Mostany, T. D. Mrsic-Flogel, E. Nedivi, C. Portera-Cailliau, K. Svoboda, J. T. Trachtenberg, and L. Wilbrecht, “Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window,” *Nat. Protoc.* **4**, 1128–1144 (2009).
16. J. Grutzendler, N. Kasthuri, and W.-B. Gan, “Long-term dendritic spine stability in the adult cortex,” *Nature* **420**, 812–816 (2002).
17. A. B. Parthasarathy, S. M. S. Kazmi, and A. K. Dunn, “Quantitative imaging of ischemic stroke through thinned skull in mice with multi exposure speckle imaging,” *Biomed. Opt. Express* **1**, 246–259 (2010).
18. W.-C. A. Lee, J. L. Chen, H. Huang, J. H. Leslie, Y. Amitai, P. T. So, and E. Nedivi, “A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19968–19973 (2008).
19. P. J. Drew, A. Y. Shih, J. D. Driscoll, P. M. Knutsen, P. Blinder, D. Davalos, K. Akassoglou, P. S. Tsai, and D. Kleinfeld, “Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull,” *Nat. Methods* **7**, 981–984 (2010).
20. J. Wang, Y. Zhang, T. H. Xu, Q. M. Luo, and D. Zhu, “An innovative transparent cranial window based on skull optical clearing,” *Laser Phys. Lett.* **9**, 469 (2012).
21. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of cranial bone,” *Adv. Opt. Technol.* **2008**, 267867 (2008).

22. Y.-J. Zhao, T.-T. Yu, C. Zhang, Z. Li, Q.-M. Luo, T.-H. Xu, and D. Zhu, "Skull optical clearing window for in vivo imaging of the mouse cortex at synaptic resolution," *Light. Sci. Appl.* **7**, 17153 (2018).
23. C. J. Roome and B. Kuhn, "Chronic cranial window with access port for repeated cellular manipulations, drug application, and electrophysiology," *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 379 (2014).
24. V. Zuluaga-Ramirez, S. Rom, and Y. Persidsky, "Craniula: A cranial window technique for prolonged imaging of brain surface vasculature with simultaneous adjacent intracerebral injection," *Fluids Barriers CNS* **12**, 24 (2015).
25. C. Heo, H. Park, Y.-T. Kim, E. Baeg, Y. H. Kim, S.-G. Kim, and M. Suh, "A soft, transparent, freely accessible cranial window for chronic imaging and electrophysiology," *Sci. Rep.* **6**, 27818 (2016).
26. S. S. Smith, P. Magnusen, and B. J. Pletka, "Fracture toughness of glass using the indentation fracture technique," in *Fracture Mechanics for Ceramics, Rocks, and Concrete*, (ASTM International, 1981), pp. 33.
27. S. F. Hulbert, "The use of alumina and zirconia in surgical implants," in *An Introduction to Bioceramics*, (2013), pp. 27–47.
28. A. Sharova, Y. S. Maklygina, G. Yusubalieva, I. Shikunova, V. Kurlov, and V. Loschenov, "Sapphire implant based neuro-complex for deep-lying brain tumors phototheranostics," in *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 945 (IOP Publishing, 2018), p. 012009.
29. Y. Damestani, C. L. Reynolds, J. Szu, M. S. Hsu, Y. Kodera, D. K. Binder, B. H. Park, J. E. Garay, M. P. Rao, and G. Aguilar, "Transparent nanocrystalline yttria-stabilized-zirconia calvarium prosthesis," *Nanomedicine* **9**, 1135–1138 (2013).
30. Y. Damestani, D. E. Galan-Hoffman, D. Ortiz, P. Cables, and G. Aguilar, "Inflammatory response to implantation of transparent nanocrystalline yttria-stabilized zirconia using a dorsal window chamber model," *Nanomedicine* **12**, 1757–1763 (2016).
31. J. E. Alaniz, F. G. Perez-Gutierrez, G. Aguilar, and J. E. Garay, "Optical properties of transparent nanocrystalline yttria stabilized zirconia," *Opt. Mater.* **32**, 62–68 (2009).
32. S. R. Casolco, J. Xu, and J. E. Garay, "Transparent/translucent polycrystalline nanostructured yttria stabilized zirconia with varying colors," *Scr. Mater.* **58**, 516–519 (2008).
33. P. Christel, A. Meunier, M. Heller, J. P. Torre, and C. N. Peille, "Mechanical properties and short-term in-vivo evaluation of yttrium-oxide-partially-stabilized zirconia," *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 45–61 (1989).
34. K. Nakamura, T. Kanno, P. Milleding, and U. Ortengren, "Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review," *Int. J. Prosthodont.* **23**, 299–309 (2010).
35. P. Christel, A. Meunier, J. M. Dorlot, J. M. Crolet, J. Witvoet, L. Sedel, and P. Boutin, "Biomechanical compatibility and design of ceramic implants for orthopedic surgery," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **523**, 234–256 (1988).
36. M. I. Gutierrez, E. H. Penilla, L. Leija, A. Vera, J. E. Garay, and G. Aguilar, "Novel cranial implants of Yttria-Stabilized zirconia as acoustic windows for ultrasonic brain therapy," *Adv. Heal. Mater.* **6** (2017).
37. N. Davoodzadeh, M. S. Cano-Velázquez, D. L. Halaney, C. R. Jonak, D. K. Binder, and G. Aguilar, "Evaluation of a transparent cranial implant for multi-wavelength intrinsic optical signal imaging," in *Neural Imaging and Sensing 2019*, vol. 10865 (International Society for Optics and Photonics, 2019), p. 108650B.
38. N. Davoodzadeh, D. Halaney, C. R. Jonak, N. Cuando, A. Aminfar, D. K. Binder, and G. Aguilar, "Laser speckle imaging of brain blood flow through a transparent nanocrystalline yttria-stabilized-zirconia cranial implant," in *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XV*, vol. 10493 (International Society for Optics and Photonics, 2018), p. 1049303.
39. N. Davoodzadeh, M. S. Cano-Velázquez, D. L. Halaney, C. R. Jonak, D. K. Binder, and G. Aguilar, "Evaluation of a transparent cranial implant as a permanent window for cerebral blood flow imaging," *Biomed. Opt. Express* **9**, 4879–4892 (2018).
40. V. Tuchin, *Tissue Optics Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (SPIE, 2000).
41. V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. H. Mavlyutov, and A. A. Mishin, "Light propagation in tissues with controlled optical properties," *J. biomedical optics* **2**, 401–418 (1997).
42. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, I. Y. Yanina, and V. V. Tuchin, "Optical clearing of tissues: Benefits for biology, medical diagnostics, and phototherapy," in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, Second Edition, Volume 2: Methods, V. V. Tuchin, ed. (SPIE Press, 2016).
43. F. Salehpour, F. Farajdokht, P. Cassano, S. Sadigh-Eteghad, M. Erfani, M. R. Hamblin, M. M. Salimi, P. Karimi, S. H. Rasta, and J. Mahmoudi, "Near-infrared photobiomodulation combined with coenzyme Q for depression in a mouse model of restraint stress: reduction in oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis," *Brain Res. Bull.* **144**, 213–222 (2019).
44. M. A. Caldieraro and P. Cassano, "Transcranial and systemic photobiomodulation for major depressive disorder: A systematic review of efficacy, tolerability and biological mechanisms," *J. Affect. Disord.* **243**, 262–273 (2019).
45. M. R. Hamblin, "Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke," *J. Neurosci. Res.* **96**, 731–743 (2018).
46. E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, and F. Vetrone, "Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm," *Nanoscale Horizons* **1**, 168–184 (2016).
47. Z. Xue, S. Zeng, and J. Hao, "Non-invasive through-skull brain vascular imaging and small tumor diagnosis based on NIR-II emissive lanthanide nanoprobe beyond 1500 nm," *Biomaterials* **171**, 153–163 (2018).
48. D. C. Sordillo, L. A. Sordillo, P. P. Sordillo, L. Shi, and R. R. Alfano, "Short wavelength infrared optical windows for evaluation of benign and malignant tissues," *J. Biomed. Opt.* **22**, 45002 (2017).
49. J. R. Thiagarajah, M. C. Papadopoulos, and A. S. Verkman, "Noninvasive early detection of brain edema in mice by

- near-infrared light scattering," *J. Neurosci. Res.* **80**, 293–299 (2005).
50. J. E. Garay, "Current-Activated, Pressure-Assisted densification of materials," *Annu. Rev. Mater. Res.* **40**, 445–468 (2010).
51. N. Davoodzadeh, G. Uahengo, D. Halaney, J. E. Garay, and G. Aguilar, "Influence of low temperature ageing on optical and mechanical properties of transparent yttria stabilized-zirconia cranial prosthesis," in *Design and Quality for Biomedical Technologies XI*, vol. 10486 (International Society for Optics and Photonics, 2018), p. 104860A.
52. R. Shi, L. Guo, C. Zhang, W. Feng, P. Li, Z. Ding, and D. Zhu, "A useful way to develop effective in vivo skin optical clearing agents," *J. Biophotonics* **10**, 887–895 (2017).
53. D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, "Recent progress in tissue optical clearing," *Laser Photon. Rev.* **7**, 732–757 (2013).
54. S. A. Filatova, I. A. Shcherbakov, and V. B. Tsvetkov, "Optical properties of animal tissues in the wavelength range from 350 to 2600 nm," *J. Biomed. Opt.* **22**, 35009 (2017).
55. N. Davoodzadeh, N. Cuando, A. H. Aminfar, M. Cano, and G. Aguilar, "Assessment of bacteria growth under transparent nanocrystalline yttristabilized-zirconia cranial implant using laser speckle imaging," in *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 50 (Wiley, 2018), pp. S5–S6.

# Bibliografía

- [1] World Health Organization. Tuberculosis: Key facts. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>, 2019. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [2] World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2019*. Geneva: World Health Orgn, August 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [3] National Library of Medicine. Enciclopedia médica: Cultivo rutinario de esputo. <https://medlineplus.gov/ency/article/003723.htm>, 2017. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [4] L Barrera, M Sequeira, S Balandrano, and M Velazco. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. *Normas y guía teórica. Parte II. Cultivo*. INEI, ANLIS Dr. Carlos Malbrán. Argentina. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2008.
- [5] Surajit Nayak and Basanti Acharjya. Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatol. Online J.*, 3(1):2–6, 2012.
- [6] Miguel A Arroyo-Ornelas, Ma Concepción Arenas-Arrocena, Horacio V Estrada, Victor M Castaño, and Luz M López-Marín. Immune diagnosis of tuberculosis through novel technologies. *Understanding Tuberculosis: Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*, page 379, 2012.

- [7] National Library of Medicine. Enciclopedia médica: Prueba cutánea de PPD. <https://medlineplus.gov/ency/article/003839.htm>, 2017. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [8] Gobierno de la República de Panamá. Costo de reactivos Xpert MTB-RIF. <http://www.panamacompra.gob.pa/AmbientePublico/VistaPreviaCP.aspx?NumLc=2015-0-12-0-08-CM-014365&esap=1&nnc=0&it=1>, 2011. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [9] Panamerican Health Organization. Preguntas frecuentes Xpert MTB-RIF. [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Preguntas\\_frecuentes\\_Xper\\_MTB-RIF\\_final.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Preguntas_frecuentes_Xper_MTB-RIF_final.pdf), 2011. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [10] World Health Organization. TB diagnóstico y servicios de laboratorio. <http://www.who.int/tb/laboratory/es/>, 2015. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [11] Kin Fong Lei. Microfluidic systems for diagnostic applications: a review. *J. Lab. Autom.*, 17(5):330–347, 2012.
- [12] Gabriel Adrián Rabinovich and Jorge Raúl Geffner. *Qué es el sistema inmune*. Grupo Planeta Spain, 2015.
- [13] John L Ingraham and Catherine A Ingraham. *Introducción a la microbiología*. Editorial Reverté, 1998.
- [14] T M Daniel. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev. Infect. Dis.*, 11 Suppl 2:S471–8, 1989.
- [15] Lee Mackenzie Fischer, Christoffer Pedersen, Karl Elkjær, Nadine-Nicole Noeth, Søren Dohn, Anja Boisen, and Maria Tenje. Development of a microfabricated electrochemical-cantilever hybrid platform. *Sens. Actuators B Chem.*, 157(1):321–327, 2011.

- [16] Wenwen Jing, Xiran Jiang, Wang Zhao, Sixiu Liu, Xunjia Cheng, and Guodong Sui. Microfluidic platform for direct capture and analysis of airborne mycobacterium tuberculosis. *Anal. Chem.*, 86(12):5815–5821, 2014.
- [17] Vigneshwaran Mani, Shuqi Wang, Fatih Inci, Gennaro De Libero, Amit Singhal, and Utkan Demirci. Emerging technologies for monitoring drug-resistant tuberculosis at the point-of-care. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 78:105–117, 2014.
- [18] Lei Mou and Xingyu Jiang. Materials for microfluidic immunoassays: A review. *Adv. Healthc. Mater.*, 6(15), 2017.
- [19] Jie-Long He, Da-Shin Wang, and Shih-Kang Fan. Opto-Microfluidic immunosensors: From colorimetric to plasmonic. *Micromachines (Basel)*, 7(2), 2016.
- [20] Feng Tian, Jing Lyu, Jingyu Shi, Fei Tan, and Mo Yang. A polymeric microfluidic device integrated with nanoporous alumina membranes for simultaneous detection of multiple foodborne pathogens. *Sens. Actuators B Chem.*, 225:312–318, 2016.
- [21] H Wang, G Shen, and R Yu. Aspects of recent development of immunosensors. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier*, pages 237–260, 2008.
- [22] R I Stefan, J F van Staden, and H Y Aboul-Enein. Immunosensors in clinical analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366(6-7):659–668, 2000.
- [23] Peter B Lippa, Lori J Sokoll, and Daniel W Chan. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, 314(1):1–26, 2001.
- [24] Paras N Prasad. *Introduction to Biophotonics*. John Wiley & Sons, 2004.
- [25] Martín A Fernández-Baldo, Francisco G Ortega, Sirley V Pereira, Franco A Bertolino, María J Serrano, José A Lorente, Julio Raba, and Germán A Messina. Nanostructured platform integrated into a microfluidic immunosensor coupled

- to laser-induced fluorescence for the epithelial cancer biomarker determination. *Microchem. J.*, 128:18–25, 2016.
- [26] Reza Riahi, Seyed Ali Mousavi Shaegh, Masoumeh Ghaderi, Yu Shrike Zhang, Su Ryon Shin, Julio Aleman, Solange Massa, Duckjin Kim, Mehmet Remzi Dokmeci, and Ali Khademhosseini. Automated microfluidic platform of bead-based electrochemical immunosensor integrated with bioreactor for continual monitoring of cell secreted biomarkers. *Sci. Rep.*, 6:24598, 2016.
- [27] Shailaja Agrawal, Kishore Paknikar, and Dhananjay Bodas. Development of immunosensor using magnetic nanoparticles and circular microchannels in PDMS. *Microelectron. Eng.*, 115:66–69, 2014.
- [28] Yu Han, Haiyan Wu, Gang Cheng, and Jiang Zhe. A two-stage microresistive pulse immunosensor for pathogen detection. *Lab Chip*, 16(4):773–779, 2016.
- [29] Shagun Gupta and Vipin Kakkar. Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics—a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 115:14–29, 2018.
- [30] Rongjin Yan, N Scott Lynn, Luke C Kingry, Zhangjing Yi, Richard A Slayden, David S Dandy, and Kevin L Lear. Waveguide biosensor with integrated detector array for tuberculosis testing. *Appl. Phys. Lett.*, 98(1):013702, 2011.
- [31] Seong Cheol Hong, Hongxia Chen, Jaewook Lee, Hye-Kyung Park, Young Sik Kim, Hyun-Chul Shin, Cheol-Min Kim, Tae Jung Park, Seok Jae Lee, Kwangnak Koh, Hwa-Jung Kim, Chulhun L Chang, and Jaebeom Lee. Ultrasensitive immunosensing of tuberculosis CFP-10 based on SPR spectroscopy. *Sens. Actuators B Chem.*, 156(1):271–275, 2011.
- [32] Thomas Nagel, Eva Ehrentreich-Förster, Mahavir Singh, Katrin Schmitt, Albrecht Brandenburg, Alexander Berka, and Frank F Bier. Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches. *Sens. Actuators B Chem.*, 129(2):934–940, 2008.

- [33] Jeonghyo Kim, Seong Cheol Hong, Jong Chul Hong, Chulhun L Chang, Tae Jung Park, Hwa-Jung Kim, and Jaebeom Lee. Clinical immunosensing of tuberculosis CFP-10 antigen in urine using interferometric optical fiber array. *Sens. Actuators B Chem.*, 216:184–191, 2015.
- [34] Md Rajibul Islam, Muhammad Mahmood Ali, Man-Hong Lai, Kok-Sing Lim, and Harith Ahmad. Chronology of Fabry-Perot interferometer fiber-optic sensors and their applications: a review. *Sensors*, 14(4):7451–7488, 2014.
- [35] Daria Majchrowicz, Marzena Hirsch, Paweł Wierzba, Michael Bechelany, Roman Viter, and Małgorzata Jędrzejewska-Szczerska. Application of thin ZnO ALD layers in Fiber-Optic Fabry-Pérot sensing interferometers. *Sensors*, 16(3), 2016.
- [36] Vikram Bhatia, Kent A Murphy, Richard O Claus, Mark E Jones, Jennifer L Grace, Tuan A Tran, and Jonathan A Greene. Optical fibre based absolute extrinsic Fabry-Perot interferometric sensing system. *Measurement Science and Technology*, 7(1):58, 1996.
- [37] Yi Wen Huang, Jin Tao, and Xu Guang Huang. Research progress on F-P Interference—Based Fiber-Optic sensors. *Sensors*, 16(9):1424, 2016.
- [38] ForteBio. Biolayer Interferometry (BLI): How does it work? [http://www.fortebio.com/interactions/Spring\\_2012/page5.html](http://www.fortebio.com/interactions/Spring_2012/page5.html), 2017. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.
- [39] Joy Concepcion, Krista Witte, Charles Wartchow, Sae Choo, Danfeng Yao, Henrik Persson, Jing Wei, Pu Li, Bettina Heidecker, Weilei Ma, Ram Varma, Lian-She Zhao, Donald Perillat, Greg Carricato, Michael Recknor, Kevin Du, Huddee Ho, Tim Ellis, Juan Gamez, Michael Howes, Janette Phi-Wilson, Scott Lockard, Robert Zuk, and Hong Tan. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 12(8):791–800, 2009.



- [40] Sriram Kumaraswamy and Renee Tobias. Label-Free kinetic analysis of an Antibody–Antigen interaction using biolayer interferometry. In Cheryl L Meyerkord and Haiyan Fu, editors, *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*, pages 165–182. Springer New York, New York, NY, 2015.
- [41] Sanna Auer, Tiia Koho, Hanni Uusi-Kerttula, Timo Vesikari, Vesna Blazevic, and Vesa P Hytönen. Rapid and sensitive detection of norovirus antibodies in human serum with a biolayer interferometry biosensor. *Sens. Actuators B Chem.*, 221:507–514, 2015.
- [42] L Escamilla, R Mancilla, W Glender, and L M López-Marín. Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154(6 Pt 1):1864–1867, 1996.
- [43] James Friend and Leslie Yeo. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. *Biomicrofluidics*, 4(2):026502, 2010.
- [44] Ruohui Wang and Xueguang Qiao. Intrinsic Fabry-Perot interferometric sensor based on microfiber created by chemical etching. *Sensors*, 14(9):16808–16815, 2014.
- [45] X Zhang, Y Yu, C Zhu, C Chen, R Yang, Y Xue, Q Chen, and H Sun. Miniature End-Capped fiber sensor for refractive index and temperature measurement. *IEEE Photonics Technol. Lett.*, 26(1):7–10, 2014.
- [46] Shike Liu, Zhichao Deng, Jianwei Li, Jin Wang, Ningning Huang, Ruiming Cui, Qiannan Zhang, Jianchun Mei, Wenyuan Zhou, Chunping Zhang, Qing Ye, and Jianguo Tian. Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region. *J. Biomed. Opt.*, 24(3):1–5, 2019.
- [47] X L Tan, Y F Geng, X J Li, Y L Deng, Z Yin, and R Gao. UV-Curable polymer Microhemisphere-Based Fiber-Optic Fabry–Perot interferometer for simultaneous measurement of refractive index and temperature. *IEEE Photonics J.*, 6(4):1–8, 2014.

- [48] Iván Hernández-Romano, Miguel A Cruz-García, Carlos Moreno-Hernández, David Monzón-Hernández, Efraín O López-Figueroa, Omar E Paredes-Gallardo, Miguel Torres-Cisneros, and Joel Villatoro. Optical fiber temperature sensor based on a microcavity with polymer overlay. *Opt. Express*, 24(5):5654–5661, 2016.
- [49] Oskar Arrizabalaga, Javier Velasco, Joseba Zubia, Idurre Sáez de Ocáriz, and Joel Villatoro. Miniature interferometric humidity sensor based on an off-center polymer cap onto optical fiber facet. *Sens. Actuators B Chem.*, 297:126700, 2019.
- [50] Abdelhak Guermat, Assia Guessoum, Nacer-Eddine Demagh, Monsef Zaboub, and Zaied Bouhafis. Fibre-optic temperature and pressure sensor based on a deformable concave micro-mirror. *Sens. Actuators A Phys.*, 270:205–213, 2018.
- [51] J Hu and C Yu. Microlens-based fiber fabry-pérot interferometer for the measurement of the concentration of sugar solution. In *2014 OptoElectronics and Communication Conference and Australian Conference on Optical Fibre Technology*, pages 821–822, 2014.
- [52] Yuan-Tai Tseng, Yun-Ju Chuang, Yi-Chien Wu, Chung-Shi Yang, Mu-Chun Wang, and Fan-Gang Tseng. A gold-nanoparticle-enhanced immune sensor based on fiber optic interferometry. *Nanotechnology*, 19(34):345501, 2008.
- [53] Luz M López-Marín, Erika Segura, Carlos Hermida-Escobedo, Anne Lemassu, and Mario César Salinas-Carmona. 6,6'-dimycoloyl trehalose from a rapidly growing mycobacterium: an alternative antigen for tuberculosis serodiagnosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 36(1-2):47–54, 2003.
- [54] Ciamak Ghazaei. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J. Res. Med. Sci.*, 23:63, 2018.
- [55] L M López-Marín, N Gautier, M A Lanéelle, G Silve, and M Daffé. Structures of the glycopeptidolipid antigens of mycobacterium abscessus and mycobacterium

- chelonae and possible chemical basis of the serological cross-reactions in the mycobacterium fortuitum complex. *Microbiology*, 140 ( Pt 5):1109–1118, 1994.
- [56] Xiaotian Tan, Maung Kyaw Khaing Oo, Yuan Gong, Yaixin Li, Hongbo Zhu, and Xudong Fan. Glass capillary based microfluidic ELISA for rapid diagnostics. *Analyst*, 142(13):2378–2385, 2017.
- [57] Fenghua Hou, Qin Zhang, Jianping Yang, Xinchun Li, Xiujuan Yang, Shuping Wang, and Zhiyi Cheng. Development of a microplate reader compatible microfluidic chip for ELISA. *Biomed. Microdevices*, 14(4):729–737, 2012.
- [58] M E Hamid, M Ridell, D E Minnikin, and M Goodfellow. Serotaxonomic analysis of glycolipids from mycobacterium chelonae-m. fortuitum complex and bovine farcy strains. *Zentralbl. Bakteriol.*, 288(1):23–34, 1998.
- [59] A Santiago-Alvarado and S Vázquez-Montiel. Propiedades físico-químicas de membranas PDMS empleadas en lentes líquidas. *Superficies y vacío*, 22(3):61–66, 2009.
- [60] Florian Schneider, Jan Draheim, Robert Kamberger, and Ulrike Wallrabe. Process and material properties of polydimethylsiloxane (PDMS) for optical MEMS. *Sens. Actuators A Phys.*, 151(2):95–99, 2009.
- [61] Kunqiang Jiang, Peter C Thomas, Samuel P Forry, Don L DeVoe, and Srinivasa R Raghavan. Microfluidic synthesis of monodisperse PDMS microbeads as discrete oxygen sensors. *Soft Matter*, 8(4):923–926, 2012.
- [62] Chantal Badre, Jean Paul Chapel, and Shu Yang. Selective dry and reversible transfer-printing of nanoparticles on top of PDMS wrinkles. *Soft Matter*, 7(21):9886–9889, 2011.
- [63] Jasbir N Patel, Bonnie L Gray, Bozena Kaminska, and Byron D Gates. Flexible glucose sensor utilizing multilayer PDMS process. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2008:5749–5752, 2008.

- [64] Fabien Gaudière, Ingrid Masson, Sandrine Morin-Grognon, Olivier Thoumire, Jean-Pierre Vannier, Hassan Atmani, Guy Ladam, and Béatrice Labat. Mechanochemical control of cell behaviour by elastomer templates coated with biomimetic Layer-by-Layer nanofilms. *Soft Matter*, 8(32):8327–8337, 2012.
- [65] Dhananjay Bodas and Chantal Khan-Malek. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—an SEM investigation. *Sens. Actuators B Chem.*, 123(1):368–373, 2007.
- [66] Elzbieta Jastrzebska, Agnieszka Zuchowska, Sylwia Flis, Patrycja Sokolowska, Magdalena Bulka, Artur Dybko, and Zbigniew Brzozka. Biological characterization of the modified poly (dimethylsiloxane) surfaces based on cell attachment and toxicity assays. *Biomicrofluidics*, 12(4):044105, 2018.
- [67] Tatsuro Goda, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Toru Moro, and Kazuhiko Ishihara. Biomimetic phosphorylcholine polymer grafting from polydimethylsiloxane surface using photo-induced polymerization. *Biomaterials*, 27(30):5151–5160, 2006.
- [68] Ji-Hun Seo, Takashi Shibayama, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara. Quick and simple modification of a poly (dimethylsiloxane) surface by optimized molecular design of the anti-biofouling phospholipid copolymer. *Soft Matter*, 7(6):2968–2976, 2011.
- [69] David L Nelson, Albert L Lehninger, and Michael M Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [70] José Prisco Palma-Nicolás and Virgilio Bocanegra-García. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Archivos de bronconeumología*, 43(4):225–232, 2007.
- [71] Simion Gocan. Two-dimensional thin-layer chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 27(6):1105–1113, 2004.

- [72] Helmut K Mangold. Thin-layer chromatography of lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 38(12):708–727, 1961.
- [73] Thomas Kohl and Carl Ascoli. Protocol: Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protocols*, 125(5):1128–1129, 2003.
- [74] Mildred S. Cano-Velázquez and Juan Hernández-Cordero. Fabrication of polymer Fabry-Perot fiber sensors using optical fiber microheaters. In Manuel Filipe P. C. Martins Costa, editor, *8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications*, volume 8785, pages 1248 – 1254. International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2013.
- [75] Violeta A Márquez-Cruz and Juan A Hernández-Cordero. Fiber optic Fabry-Pérot sensor for surface tension analysis. *Optics express*, 22(3):3028–3038, 2014.
- [76] T. Liu and G. F. Fernando. A frequency division multiplexed low-finesse fiber optic Fabry-Perot sensor system for strain and displacement measurements. *Review of Scientific Instruments*, 71(3):1275–1278, 2000.
- [77] W. Wang, D. Ding, N. Chen, F. Pang, and T. Wang. Quasi-distributed IFPI sensing system demultiplexed with FFT-based wavelength tracking method. *IEEE Sensors Journal*, 12(9):2875–2880, 2012.
- [78] Stephen C Warren-Smith, Ricardo M André, Jan Dellith, Tina Eschrich, Martin Becker, and Hartmut Bartelt. Sensing with ultra-short Fabry-Perot cavities written into optical micro-fibers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244:1016–1021, 2017.
- [79] Dow Chemical Company. Sylgard 184 silicone elastomer. <https://www.dow.com/content/dam/dcc/documents/en-us/productdatasheet/11/11-31/11-3184-sylgard-184-elastomer.pdf>, 2017. Visitado por última vez el 22 de enero del 2020.

- [80] Z L Ran, Y J Rao, W J Liu, X Liao, and K S Chiang. Laser-micromachined Fabry-Perot optical fiber tip sensor for high-resolution temperature-independent measurement of refractive index. *Opt. Express*, 16(3):2252–2263, 2008.
- [81] John E Saunders, Connor Sanders, Hao Chen, and Hans-Peter Loock. Refractive indices of common solvents and solutions at 1550 nm. *Appl. Opt.*, 55(4):947–953, 2016.
- [82] Bryan E Schubert and Dario Floreano. Variable stiffness material based on rigid low-melting-point-alloy microstructures embedded in soft poly (dimethylsiloxane)(PDMS). *RSC Advances*, 3(46):24671–24679, 2013.
- [83] Bei-Bei Li, Qing-Yan Wang, Yun-Feng Xiao, Xue-Feng Jiang, Yan Li, Lixin Xiao, and Qihuang Gong. On chip, high-sensitivity thermal sensor based on high-q polydimethylsiloxane-coated microresonator. *Applied Physics Letters*, 96(25):251109, 2010.
- [84] Hui Li, Lei Lin, and Shusen Xie. Refractive index of human whole blood with different types in the visible and near-infrared ranges. In *Laser-Tissue Interaction XI: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical*, volume 3914, pages 517–521. International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2000.
- [85] R Bruck, E Melnik, P Muellner, R Hainberger, and M Lämmerhofer. Integrated polymer-based mach-zehnder interferometer label-free streptavidin biosensor compatible with injection molding. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(9):3832–3837, 2011.
- [86] Karol Wysokiński, Dawid Budnicki, Janusz Fidelus, Łukasz Szostkiewicz, Łukasz Ostrowski, Michal Murawski, Marcin Staniszewski, Magdalena Staniszewska, Marek Napierała, and Tomasz Nasiłowski. Dual-core all-fiber integrated immunosensor for detection of protein antigens. *Biosensors and Bioelectronics*, 114:22–29, 2018.

- 
- [87] Melanie J Stables and Derek W Gilroy. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in lipid research*, 50(1):35–51, 2011.
- [88] Charles N Serhan. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503):92, 2014.
- [89] Takehiko Yokomizo and Makoto Murakami. *Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols*. Springer, 2015.
- [90] Verenice Bautista Arce. Desarrollo y caracterización de una microestructura a base de grafeno para aplicación de biosensor. Master's thesis, UNAM, México, 2017.
- [91] Daniel Pérez-Calixto, Diego Zamarrón-Hernández, Aarón Cruz-Ramírez, Mathieu Hautefeuille, Juan Hernández-Cordero, Victor Velázquez, and Marcela Gretcher. Fabrication of large all-pdms micropatterned waveguides for lab on chip integration using a rapid prototyping technique. *Optical Materials Express*, 7(4):1343–1350, 2017.