



INAOE

**Caracterización de biomarcadores
lagrimales mediante espectroscopia
Raman y análisis de componentes
multivariante encaminada a la
detección de diabetes**

Por:

LFT. Jeiny Nicacia Heredia Rios

Tesis sometida como requisito parcial para
obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias y Tecnologías
Biomédicas**

Agosto 2023

Tonantzintla, Puebla

Asesor:

Dr. Jorge Castro Ramos

INAOE 2023

El autor otorga al INAOE el permiso
de reproducir y distribuir copias de
esta tesis en su totalidad o en partes
mencionando la fuente



Resumen

En este trabajo, se caracterizó a los biomarcadores lagrimales, albumina, glucosa, lactoferrina y lisozima, por medio de una lágrima sintética. Se realizaron diferentes concentraciones químicas de los cuatro biomarcadores seleccionados, de las disoluciones obtenidas con agua destilada se analizó un volumen de 10 μl (volumen mínimo que se puede extraer de una persona), a cada disolución se le aplicó la técnica de espectroscopía Raman en el que se obtuvieron espectros para identificar las bandas espectrales de cada biomarcador. Los espectros obtenidos fueron examinados de manera analógica para después ser procesados por medio de un programa realizado en Matlab aplicando un filtro que retiro el ruido que se obtiene durante las mediciones. De manera complementaria se aplicó un análisis de componentes principales en el que nos permitió observar un conjunto de espectros Raman de diferentes concentraciones clasificados de acuerdo a sus características semejantes. Adicional a esta tesis se presenta un estudio piloto del análisis de lagrima in vivo de 10 voluntarios aleatorios, en este estudio se hace una comparación de espectros de los biomarcadores de albumina y glucosa con el de la lagrima obtenida, para determinar las bandas que coinciden de los biomarcadores en una lagrima real. Lo que permitiría el diagnostico de diabetes entre otro tipo de enfermedades relacionadas con los biomarcadores.

Abstract

This thesis used a synthetic tear to characterize tear biomarkers albumin, glucose, lactoferrin, and lysozyme. Different chemical concentrations of these four selected biomarkers were made. Each solution was analyzed with the Raman spectroscopy technique from the solutions obtained with distilled water using a volume of 10 μ l (minimum volume extracted from a person). The spectra were obtained to identify the spectral bands of each biomarker. The spectra obtained were examined analogously and then processed using a program made in MATLAB, applying a filter that removed the noise obtained during the measurements. In a complementary way, a principal component analysis was applied, which allowed us to observe a set of Raman spectra of different concentrations classified according to their similar characteristics. In addition, this thesis presents a pilot study of in vivo tear analysis of 10 random volunteers. This study compares the spectra of the albumin and glucose biomarkers from the synthetic tear with the real tear to determine the bands that coincide with each other biomarkers. It will allow the diagnosis of diabetes among different types of diseases related to biomarkers.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos, cuñada y sobrinos que siempre me ayudaron y apoyaron con cada una de las adversidades encontradas durante la maestría, así como de contagiarme alegría para seguir.

A mi novio Martín de Jesús Torres Vargas por apoyarme, escucharme y motivarme siempre que era necesario.

A mi asesor el Dr. Jorge Castro, por la inmensa paciencia para explicarme todo aquello que no era de mi conocimiento, por el apoyo tanto económico como motivacional y la confianza para permitirme formar parte de este gran grupo de investigación GIOB.

A mis compañeros de grupo Héctor Nahum Chavarría, Alejandra López, Leopoldo Landaeta y Freddy Narea, por toda su disposición de siempre ayudarme y apoyarme con los conocimientos que me hacían falta, por la motivación que me daban para no dejar de crecer y creer en lo que estaba haciendo.

A todo DFA por el apoyo durante los trámites que fueron necesarios y todo lo que conllevó al final.

DEDICATORIA

A mi Familia

*Por haber estado, por estar y porque estarán en todo apoyando y cuidándome
siempre...*

INDICE

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 ESTADO DEL ARTE	9
1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	13
1.3 HIPÓTESIS	13
1.4 OBJETIVOS	13
CONCLUSIÓN	14
Referencias	15
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO	17
2.1 ANATOMÍA DEL OJO	17
2.2 PELICULA LAGRIMAL.....	19
2.2.1. Fisiología de la lagrima	19
2.2.2 Composición química de la lágrima	22
2.2.3 Diagnóstico a través de las lagrimas	23
2.2.4 Biomarcadores lágrimales	24
2.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	25
2.3.1 Origen del efecto Raman	25
2.3.2 Efecto Raman	26
2.5 VIBRACIONES MOLECULARES.....	28
2.4 Tipos de ruidos Raman	30
2.6 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).....	32
2.6.1 CALCULO DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES	34
CONCLUSIÓN	38
Referencias	39
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA DEL TRABAJO.....	44
3.1 UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO	44
3.3 ARREGLO EXPERIMENTAL	45
3.3.1 Características del espectrómetro Raman	45
3.3.2 SOFTWARE SPECTRA SUITE	49
3.4 OBTENCIÓN DE ESPECTROS RAMAN	52
3.5 APLICACIÓN DE FILTRADO Y SUAVIZADO DE LOS ESPECTROS RAMAN	52

3.6 ANÁLISIS DE ESPECTROS RAMAN	54
CONCLUSIÓN	55
Referencias	56
CAPÍTULO 4 RESULTADOS	57
4.1 CONCENTRACIONES DE LOS BIOMARCADORES.....	57
4.2 RESULTADOS DEL ESPECTRÓMETRO RAMAN	58
4.4 CLASIFICACIÓN A TRAVEZ DEL PCA.....	67
4.4.1 PCA DE LOS ESPECTROS NO PROCESADOS.....	67
4.4.2 RESULTADO DEL ACP CON ESPECTROS PROCESADOS	69
4.5 ESTUDIO PREVIO LAGRIMAL IN VIVO	72
DISCUSIÓN.....	74
CONCLUSIÓN	75
Referencias	75
CONCLUSIÓN A LA TESIS.....	76
TRABAJO A FUTURO	77
GLOSARIO	78
INDICE DE FIGURAS.....	79
INDICE DE TABLAS	81
APENDICES	82

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo, presentaremos las estadísticas de las enfermedades oculares existentes en la actualidad realizadas por algunas organizaciones a nivel mundial y nacional y revelaremos algunos avances en la investigación de biomarcadores en lágrimas. También se presentan la hipótesis, objetivos y preguntas de investigación de este trabajo.

En la actualidad los métodos de diagnóstico para enfermedades oculares son demasiado invasivos y en ocasiones hasta dolorosos para las personas, algunos de estos estudios van desde simples evaluaciones musculares o test oculares, hasta angiografías, ultrasonidos, resonancias magnéticas, tomografías computarizadas y muchas otras pruebas[1]. Sin embargo, el ojo tiene estructuras demasiado sensibles que pueden lesionarse si no son analizadas correctamente.

El Instituto Nacional de la salud o mejor conocido por sus siglas en inglés (NIH) [2], así como la Academia Estadounidense de Oftalmología o en sus siglas en inglés (AAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [3], afirman que el número de personas que padecen enfermedades oculares está aumentando en todo el mundo; se informa que 2,200 millones de personas tienen problemas de visión al enfocar de cerca o lejos, si estos casos se diagnosticaran y trataran a tiempo, al menos mil millones podrían evitarse [4].

El 30% de la población mexicana tiene algún problema visual, sobre todo miopía y astigmatismo. Hay alrededor de 700 mil personas con discapacidad ocular, como ceguera o dificultad visual, fueron adquiridas por enfermedad, accidente o de forma congénita [5].

Se estima que del 40% al 50% de los casos de ceguera en Puebla son causados por cataratas, especialmente enfermedades oculares relacionadas con la edad, seguidas de accidentes y enfermedades que causan pérdida de la visión, como la

previo de los síntomas y signos que se presentan durante el desarrollo de este problema, siendo actualmente una de las enfermedades que ataca principalmente a adultos [6].

Se considera que el ojo seco es una alteración de la unidad funcional lagrimal (UFL), que es un sistema integral que involucra la glándula lagrimal, la superficie ocular (córnea, conjuntiva y glándulas de Meibomio), los párpados y los nervios [7]. El ojo seco afecta primeramente al líquido lagrimal y a la superficie ocular, manifestándose como malestar, alteración visual e inestabilidad de la película lagrimal con posible daño a la superficie ocular. Se acompaña de un aumento de la osmolaridad (concentración de solutos en un fluido) de la lagrime e inflamación de la superficie ocular [8].

Por otro lado, la catarata se va formando cuando las proteínas del cristalino del ojo se agrupan creando una área nublada y blanca. El cristalino o “lente” del ojo, es la parte transparente del que ayuda a enfocar la luz en la retina, esta patología puede hacer que la visión se vuelva borrosa, o de color claro. La mayoría de los casos son causadas por cambios naturales en el ojo a medida que envejecemos.[9].

El glaucoma es una enfermedad que afecta únicamente al nervio óptico del ojo. Generalmente se produce cuando se acumula fluido en la parte delantera del ojo, este exceso de fluido aumenta la presión ocular y daña al nervio óptico [10].

Conociendo las causas de algunas enfermedades y el tipo de lesión que generan en una situación crónica, podemos pensar que si se hicieran diagnósticos tempranos y de bajo costo, algunas enfermedades oculares silenciosas, que no presentan ningún tipo de síntoma o signo en la parte afectada del ojo, permitiría el diagnóstico correcto, la implementación del tratamiento adecuado y la prevención a futuro [10].

1.1 ESTADO DEL ARTE

Con el objetivo de sustituir las pruebas invasivas habituales y mejorar así la calidad de vida de los pacientes que sufren algún tipo de discapacidad visual u otro tipo de

patología. El método de diagnóstico a través de la película lagrimal se está dando a conocer como una de las modalidades no invasivas e indoloras para el ser humano.

Desde hace 26 años se utilizan diferentes técnicas para detectar ciertos biomarcadores lagrimales que pueden diagnosticar no solo patología ocular sino también otro tipo de enfermedades específicas que han afectado a las personas durante décadas. Estos son algunos estudios sobre biomarcadores de la película lagrimal:

En 1997 Bjerrum et.al. buscó la relación que existe entre albumina y lactoferrina en el Síndrome de Sjögren (ojo seco), y otro tipo de enfermedades del tejido conectivo en individuos que estuviera controlados sobre sus padecimientos activos, el método utilizado para realizar este estudio fue por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida el cual retarda el movimiento macromolecular (SDS), con una tinción azul. El resultado de dicho procedimiento reveló que la presencia de albumina y lactoferrina es superior 2:1 y es más frecuente en pacientes con Síndrome de Sjögren primario que en pacientes con alguna otra enfermedad del tejido conjuntivo. En otras palabras encontró que existe una correlación en estos dos biomarcadores de la lágrima [11].

Para 2005 se desarrolló una técnica mejorada de citología de impresión la cual es una prueba para recolectar células epiteliales conjuntivas de una manera mínimamente invasiva, rápida y casi indolora, en el estudio de 2005 se estudiaron la cantidad de células calciformes así como la densidad de dichas células que hay en el ojo seco. Otro punto que marcan como importante en este artículo y el cual se ha estado estudiando y desarrollando en las últimas décadas es la evaluación de parámetros biológicos de la película lagrimal, que permita la examinación de sus proteínas sin necesidad de preparar la muestra, estudiando principalmente a los biomarcadores de lactoferrina y lisozima para ojo seco, lo único que detiene estos procedimientos es la falta de lagrime en la enfermedad de ojo seco, e incluso la poca cantidad de lagrime que llega a producir el ojo sin ninguna patología. Además de ser pruebas que suelen tardar, debido a la preparación de muestras y esto a su vez provoca que sea de un costo elevado [12].

Un estudio de 2008 sobre la película lagrimal al bostezar en el Reino Unido, se llevó a cabo mediante espectroscopía Raman para analizar la composición de las lágrimas humanas, utilizando 3 voluntarios sanos. Las muestras de lágrimas obtenidas se analizaron utilizando tres tipos diferentes de técnicas Raman: (i) por fase de solución, (ii) por adición gota a gota y (iii) por mapeo, dando como resultado que las proteínas estaban presentes con estándares (5 - 15 mg/mL) en la película lagrimal, revelando la abundancia de las propiedades que más contienen las lágrimas [13].

Otro estudio analizó el principal biomarcador de la diabetes (glucosa), realizado en 2020. La idea principal del artículo es descubrir los posibles niveles de glucosa durante el uso de lentes de contacto a través de las lágrimas, además de aportar nuevas ideas para la toma de muestra y detección de este biomarcador de manera no invasiva. El estudio se basó en la detección de cambios en biosensores durante el uso de lentes de contacto mediante espectroscopía de reflectancia en ratones. El muestreo se realizó mediante la comparación de sangre y lágrimas artificiales colocadas en un biosensor de lente de contacto (NECL), el cual se retiró después de 10 minutos de reacción, con el objetivo de observar cambios en la deshidratación y temperatura del ojo en personas con diabetes. Sin embargo, este es un estudio costoso, además se hace énfasis en que lo ideal sería hacerlo en personas que usen el biosensor de lentes de contacto durante al menos 30 días para obtener mejores resultados [14].

Asimismo, se realizaron pruebas de glucosa en sangre en 2020 para determinar niveles que puedan indicar diabetes tipo 2 u otras afecciones médicas, lo que nos ayuda a conocer otros tipos de biomarcadores relacionados con un tipo de enfermedad en específico, en este caso el biomarcador en el que se centró el estudio fue la albúmina glicosilada debido a que es una proteína que abunda en la lágrima así como en la sangre (aproximadamente 80%), puede unirse al azúcar y puede reemplazarse cada 20- 25 días [15]. Esta investigación estudió a 100 adultos diagnosticados con diabetes, se les tomó muestras de lágrimas al mismo tiempo que se extraía sangre que permitiera medir la albúmina glicosilada, las lágrimas

fueron analizadas mediante cromatografía y espectrometría de masas, mientras que las muestras de sangre se midieron por métodos enzimáticos, como resultados preliminares, hubo una correlación del 95% entre la proteína albúmina glicosilada en sangre y lágrimas [15].

Varios estudios han demostrado que los enfoques proteómicos son una herramienta prometedora para el descubrimiento e identificación de marcadores bioquímicos de enfermedades oculares o autoinmunes [16]. Comprender la composición química de cada uno de los biomarcadores de la película lagrimal, es importante para identificar los enlaces o grupos funcionales más fuertes que ayudará a conocerlos mejor para el diagnóstico.

Es importante destacar que, a diferencia de la sangre, el uso de la película lagrimal como fluido de diagnóstico presenta un riesgo mínimo para el personal de salud, en cuanto a microorganismos de transmisión, como son los virus de la hepatitis B y C y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Recientemente ha aumentado el interés por las pruebas de diagnóstico rápidas y no invasivas, ha llevado a investigar a la película lagrimal como fluido biológico para el posible diagnóstico clínico.

Por ello, como estudio nuevo, utilizar un líquido que no es muy abundante en el organismo para las pruebas diagnósticas puede tener tanto ventajas como desventajas (tabla 2). Sin embargo, los beneficios obtenidos al analizarlo podrían ser un cambio nuevo e importante en el sector de la salud.

Tabla 1 Ventajas y limitaciones del estudio

Ventajas	Limitaciones
Fácil obtención con material de bajo costo.	Posibilidad de no obtener lágrima debido a una patología o infección ocular.
Método no invasivo, especialmente para hemofílicos, neonatos, ancianos e incapacitados.	Variabilidad fisiológica de sus componentes a lo largo del día.
Fácil almacenamiento, transporte y manipulación.	El contenido se puede evaporar fácilmente y en un corto tiempo si no se tiene refrigerado
Riesgo mínimo de contaminación entre individuos.	La cantidad de lágrimas que algunos individuos puedan generar.

1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- Dado un biomarcador y un conjunto de disoluciones con su respectivo conjunto de concentraciones y sus espectros, ¿podremos determinar cada una de las diferentes concentraciones de los biomarcadores lagrimales relacionados con alguna patología.
- ¿Podrá la espectroscopia Raman detectar pequeñas cantidades de lágrimas sintéticas?
- ¿Se podrán observar los espectros Raman de los biomarcadores que se encuentran dentro de la lágrima por medio de una lágrima sintética?
- ¿Se podrá remover el ruido y fluorescencia de los espectros Raman de las concentraciones obtenidas de los biomarcadores que nos permita observar los enlaces más intensos.

1.3 HIPÓTESIS

Si la luz interactúa con una pequeña cantidad de película lagrimal sintética, podrá generar vibraciones moleculares que nos permita observar la composición química de este fluido corporal por medio de la dispersión Raman, para diferenciar biomarcadores que se encuentran dentro de la lágrima que permitan diagnosticar alguna enfermedad en específico.

1.4 OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar por medio de espectroscopia Raman una lágrima sintética los biomarcadores que se encuentran dentro de la película lagrimal y que estén relacionados con alguna enfermedad.

ESPECÍFICOS

- Identificar teóricamente la composición fisiológica del ojo y la película lagrimal.
- Examinar información bibliográfica de reconocimiento de biomarcadores de la lagrima por medio de algún tipo de espectroscopía

- Analizar los cuatro biomarcadores que se encuentran dentro de la lagrime en diferentes concentraciones dentro del laboratorio GIOB.
- Identificar los espectros Raman de cada una de las concentraciones de los biomarcadores.
- Mostrar un análisis de los espectros Raman obtenidos de las lágrimas sintéticas.
- Realizar una clasificación cualitativa de diferentes concentraciones de biomarcadores lagrimales.

CONCLUSIÓN

Se presentó en el capítulo la enfermedades y problemas de diagnóstico más comunes que existen en el ojo que hoy en día son una problemática para la sociedad. De igual manera se mostró el estado del arte sobre el estudio de biomarcadores relacionados con un tipo de patología que puede ser diagnosticada por un tipo de estudio invasivo o de mayor costo en la lágrima, así como la hipótesis, objetivos y preguntas de investigación que tendrá este trabajo.

Referencias

1. Khazaeni, L. M. (2023, 18 mayo). Pruebas para detectar trastornos oculares. Manual MSD versión para público general. <https://msdmanuals.com/es-mx/hogar/trastornos-oft%C3%A1lmos/diagn%C3%B3stico-de-los-trastornos-oculares/pruebas-para-detectar-trastornos-oculares>
2. Enfermedades y afecciones de los ojos | National Eye Institute. (s. f.). <https://www.nei.nih.gov/espanol/aprenda-sobre-la-salud-ocular/enfermedades-y-afecciones-de-los-ojos>
3. Salud visual. (s. f.). OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/salud-visual>
4. Bravo, G. R. (2020). Día Mundial de la Visión. ss.puebla.gob.mx. <https://ss.puebla.gob.mx/prevencion/informate/item/1183-dia-mundial-de-la-vision>
5. Gobierno del Estado de Puebla, Secretaria de Gobernación del Estado de Puebla, & Consejo Estatal de Población. (2022). Perfil Sociodemográfico de las personas con discapacidad del Estado de Puebla (Primera) [Conjunto de datos]. <https://coespo.puebla.gob.mx/publicaciones-y-presentaciones/discapacidad>
6. Kantor, P. A. (2010). Actualización clínica en OJO seco para el médico no oftalmólogo. Revista Médica Clínica Las Condes, 21(6), 883-890. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(10\)70613-1](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(10)70613-1)
7. Rojas, R. (2021). Gráfica del día: Las 10 enfermedades de la vista más comunes en México. Saludiarlo. <https://www.saludiarlo.com/grafica-del-dia-las-10-enfermedades-de-la-vista-mas-comunes-en-mexico/>
8. Causas de las cataratas | National Eye Institute. (s. f.). <https://www.nei.nih.gov/espanol/aprenda-sobre-la-salud-ocular/enfermedades-y-afecciones-de-los-ojos/cataratas/causas-de-las-cataratas#:~:text=Una%20catarata%20es%20un%20%C3%A1rea,a%20medida%20que%20usted%20envejece.>

9. ¿Qué es el glaucoma? Causas, síntomas, diagnóstico, tratamiento. (2022, 28 octubre). American Academy of Ophthalmology. <https://www.aao.org/salud-ocular/enfermedades/que-es-la-glaucoma>
10. Bravo, G. R. (2020b). Día Mundial de la Visión. [ss.puebla.gob.mx. https://ss.puebla.gob.mx/prevencion/informate/item/1183-dia-mundial-de-la-vision](https://ss.puebla.gob.mx/prevencion/informate/item/1183-dia-mundial-de-la-vision)
11. Kb, B. (2009). The ratio of albumin to lactoferrin in tear fluid as a diagnostic tool in primary Sjogren's syndrome. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 75(5), 507-511. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.1997.tb00138.x>
12. Rodríguez, A., & Rodríguez, P. H. (2005). Citología de impresión una técnica novedosa y sencilla para el diagnóstico de alteraciones de la superficie ocular. *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular*, 5, 51. <https://doi.org/10.19052/sv.1663>
13. Filik, J., & Stone, N. J. (2008). Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 616(2), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.036>
14. Kim, S. Y., Jeon, H., Park, S., Lee, D. H., & Chung, E. (2020). Tear Glucose Measurement by Reflectance Spectrum of a Nanoparticle Embedded Contact Lens. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65103-z>
15. Español, L. M. E. (2020, 20 octubre). Niveles de albúmina glucosilada en las lágrimas son equivalentes a las pruebas no invasivas de glucosa. *Labmedica.es*. <https://www.labmedica.es/quimica-clinica/articles/294785144/niveles-de-albumina-glucosilada-en-las-lagrimas-son-equivalentes-a-las-pruebas-no-invasivas-de-glucosa.html>
16. Mendoza, H. M. T. (2007). Utilidad de la proteómica en la identificación de nuevos biomarcadores. *Salud Publica De Mexico*, 49, 62-63. <http://www.redalyc.org/pdf/106/10649027.pdf>

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

En este capítulo se describe la anatomía del ojo y la fisiología del líquido lagrimal y sus principales biomarcadores, además de la técnica de espectroscopia Raman y sus efectos al hacer contacto con átomos y moléculas de diferentes sustancias. Del mismo modo, los tipos de ruido que se pueden encontrar al adquirir espectros para identificarlos. También se da a conocer el análisis de componentes principales y algunos ejemplos de cómo usarlo.

La forma en que funciona nuestra visión por medio del ojo, ha llamado la atención de muchos investigadores y científicos. De todos los receptores sensoriales del cuerpo, el 70% se encuentran en los ojos. La vista es el sentido que más necesita ser "aprendido", y los ojos parecen ser muy aficionados a engañarse a sí mismos. El viejo refrán que dice "Cada uno ve lo que quiere", en ocasiones suele ser cierto, si el ojo tiene tantas propiedades juntas ¿Por qué no estudiar una de las pequeñas partes que lo protege?.

2.1 ANATOMÍA DEL OJO

El ojo humano es el órgano anatómico que recoge en su interior la estructura sensible que hace posible el inicio del complejo proceso de la visión. Por su forma se le denomina globo ocular, el cual es una esfera de aproximadamente 25 mm de diámetro en adultos [17]. Solo la sexta parte anterior de la superficie ocular puede verse. Es un órgano par situado a ambos lados del plano sagital, protegido por grasa y tejidos blandos y por las paredes óseas que componen las cavidades orbitarias (fig.1).

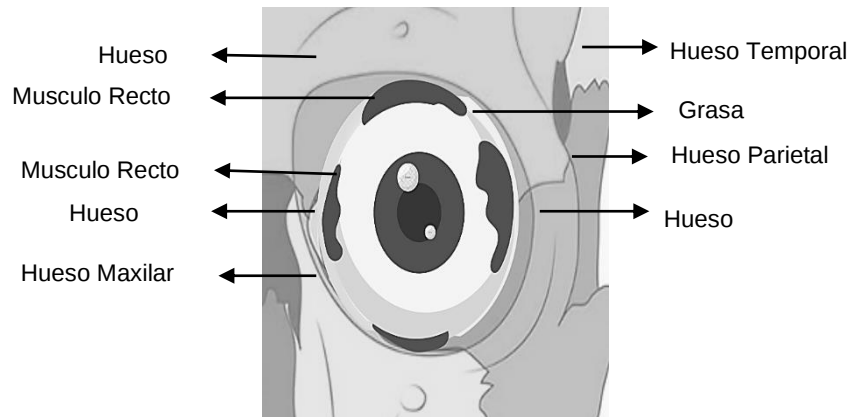


Figura 1 Anatomía del ojo humano

Además del globo ocular se alojan el nervio óptico, los músculos oculares, la glándula lagrimal, vasos y nervios. La parte expuesta del globo ocular, formada por la córnea y la conjuntiva bulbar está cubierta por una delgada capa líquida, mejor conocida como película lagrimal o lagrime, esta última es un componente esencial para nuestra visión [18], además de ser la primera en tener contacto con la luz que entra por los ojos (fig.2).

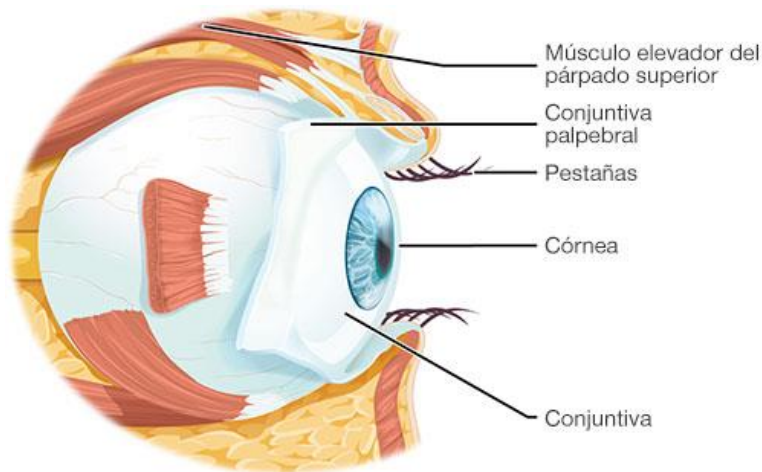


Figura 2 Parte expuesta del globo ocular

Tomada de: <https://www.vista-laser.com/sintomas-queratocono/>

Por otro lado en la parte externa y periférica del ojo se encuentran los párpados, las pestañas y las lágrimas, tal como se muestra en la figura 3 [19].

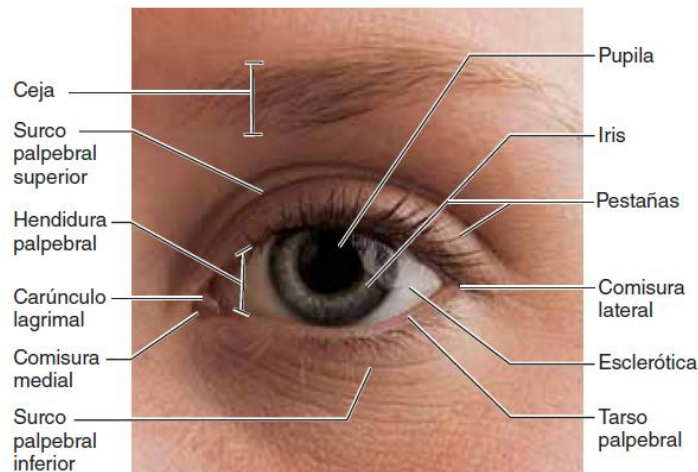


Figura 3 Anatomía externa del ojo
Imagen tomada de la referencia [20]

Tienen muchas funciones: sirven como lente óptico, son las principales fuentes de oxígeno en la córnea, actúan como lubricante entre los párpados y la córnea, eliminan los cuerpos extraños y las células muertas, además previenen infecciones que pueden darse por microorganismos tanto externos como internos que se ubiquen en el cuerpo [19].

2.2 PELICULA LAGRIMAL

La película lagrimal o lágrima es una película húmeda muy delgada que tiene como mínimo de espesor 4 milésimas de milímetro (micrones, μ) y un máximo de 40μ , es una pequeña capa que está muy bien especializada y organizada. Es la encargada de proteger a la conjuntiva bulbar, palpebral y la córnea, además es la pieza principal de proporcionar una superficie suave y refractiva del ojo, que permite una visión clara y precisa. Esta fina capa está formada a su vez por tres capas importantes que evitan ciertos tipos de alteraciones en el sistema ocular, las cuales se explicarán más adelante [20].

2.2.1. Fisiología de la lagrime

El aparato o sistema lagrimal cuenta con componentes secretores, de distribución y excretores. El componente secretor está formado por la glándula lagrimal, el tejido glandular lagrimal accesorio, las glándulas sebáceas de los párpados, las células calciformes y otros elementos secretores de mucina. Por otro lado el componente de distribución se basa principalmente en el movimiento de las lágrimas a través del

ojo, lo que ayuda al parpadeo y al sistema de drenaje. Este último es mejor conocido como el sistema excretor el cual consta de las aberturas u orificios, los canalículos y el saco lagrimal así como del conducto lacrimonasal, lo que permite expulsar a la película lagrimal (fig.4). Este sistema debe tener un perfecto equilibrio entre la producción y evacuación de las lágrimas para evitar complicaciones o enfermedades en el ojo [21].

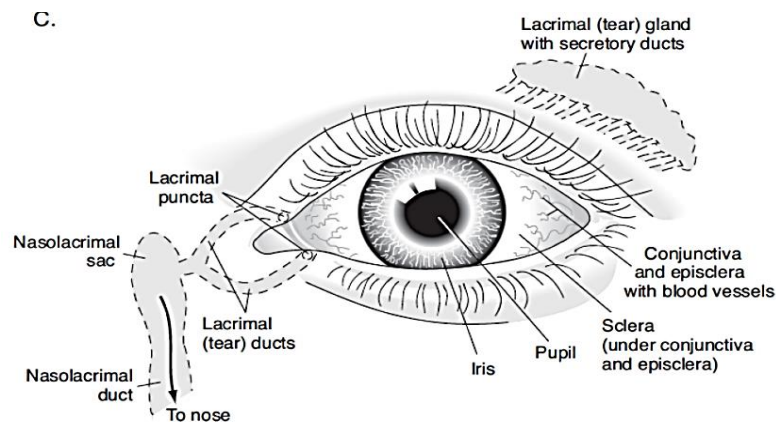


Figura 4 Sistema lagrimal
Imagen tomada de la referencia[19]

Como ya se había mencionado anteriormente, la lagrime está formada por tres finas capas que ayudan a la protección del ojo. La primera se conoce como capa externa o también puede ser llamada capa lipídica e incluso capa grasa, la segunda capa es la capa intermedia, serosa o acuosa y la tercera capa que es la que se encuentra más cercana al ojo y es llamada capa mucosa o capa de mucina. Actualmente se dice que existen solo dos capas, ya que las capas de mucina y acuosa se llegan a complementar tanto que realmente no hay una división como tal. Sin embargo, la mayoría de la literatura sigue manejando las tres capas para comprender mejor la composición de la película lagrimal (fig.5) [22].

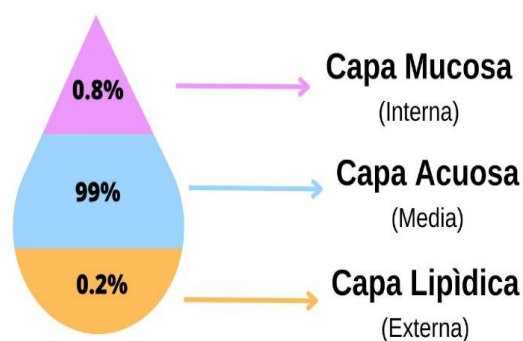


Figura 5 Película lagrimal

La capa de mucosa o mucina forma el 0.8 por ciento de la película lagrimal, dentro de esta capa se encuentran diferentes proteínas y enzimas, entre ellas; el moco ocular, mucina, inmunoglobulinas, sales, glucosa, leucocitos y algunos restos celulares, todas ellas son parte importante en el ojo ya que lo protegen y lo limpian [23].

La capa serosa o acuosa es la de mayor tamaño ya que representa el 99 por ciento de la lagrime y es donde se disuelven todos los elementos nutritivos, está formada por agua, electrolitos, proteínas, factores de crecimiento peptídicos, inmunoglobulinas, citocinas, vitaminas, antimicrobianos así como hormonas secretadas por las glándulas lagrimales. En esta capa se encuentran los biomarcadores principales de defensa para el ojo, la lisozima, lactoferrina, lisina, albumina y las lipocalinas, todas ellas cumplen con la función de evitar que el ojo tenga alguna alteración ya sea provocada por el medio ambiente o por alguno de los dos sistemas que inervan al ojo, el simpático y parasimpático [24].

La capa grasa o lipídica cuenta con un 0.2 por ciento de la película lagrimal, aunque tenga un porcentaje muy bajo no deja de ser importante para el ojo, ya que en ella se produce el aceite de meibomio el cual es secretado por las glándulas de meibomio durante el parpadeo, este aceite permite que la lagrime no se evapore tan fácilmente, si este aceite se deja de producir, entonces comenzaran los síntomas del ojo seco (fig.6) [24].

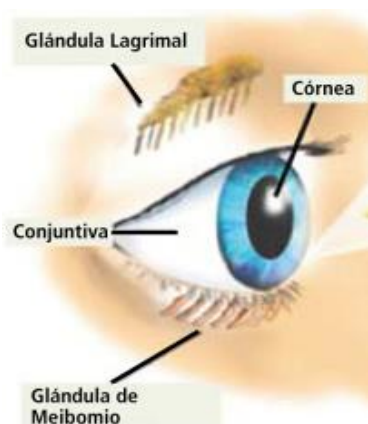


Figura 6 Glándulas de Meibomio
Imagen tomada de: Kantor, P. A. (2010)

El fluido lagrimal se caracteriza por ser una mezcla de moléculas que incluyen, proteínas, metabolitos, lípidos, sales, nutrientes, oxígeno entre muchos otros; estas moléculas pueden jugar un papel importante en la fisiopatología de distintas enfermedades [25]. A pesar del contenido que tienen, no todas las lágrimas funcionarían para realizar diagnósticos, debido a que existen cuatro tipos de lágrima que produce el ojo, la basal, la refleja, la emocional y la cerrada (tabla 2), todas ellas están formadas por diferentes sustancias debido al factor de estimulación.

Tabla 2 Tipos de lágrimas

Lágrima Basal	Las lágrimas basales son fluidos semi presentes que previenen la sequedad en los ojos y ayudan a proteger la córnea. Además actúan como un escudo permanente en los ojos, manteniéndolos lubricados y protegidos de algún tipo de residuo externo
Lágrima de Reflejo	Este tipo de lágrima se produce principalmente cuando los ojos necesitan limpiarse por algún tipo de irritante nocivo o un tipo de cuerpo extraño.
Lágrima emocional	Estas lágrimas destacan cuando se expresan las emociones, alegría, tristeza o miedo. Las lágrimas emocionales contienen mayor número de hormonas y proteínas adicionales que las lágrimas basales
Lágrima cerrada	Son lágrimas sintetizadas única y exclusivamente en el periodo de somnolencia, son importantes para la regulación de la homeostasis.

Información tomada de la referencia [25]

2.2.2 Composición química de la lágrima

La película lagrimal está formada por un 99% por de agua y el otro 1% por componentes que se encuentran dentro de las tres capas importantes de la lágrima que evitan ciertos tipos de alteraciones en el sistema ocular [26].

Dentro de la capa serosa o acuosa, es donde se disuelven todos los elementos nutritivos, ya que está formada por agua, electrolitos, proteínas, factores de crecimiento peptídicos, inmunoglobulinas, citocinas, vitaminas, antimicrobianos así como hormonas secretadas por las glándulas lagrimales.

Esta capa también cuenta con los biomarcadores principales de defensa para el ojo, la lisozima, lactoferrina, lisina, albúmina y las lipocalinas, ellas evitan que el ojo tenga alguna alteración ya sea provocada por el medio ambiente o por alguno de los dos sistemas que inervan al ojo, el simpático y parasimpático[27].

2.2.3 Diagnóstico a través de las lagrimas

Para el estudio y diagnóstico por medio de la película lagrimal, hay numerosas y variadas técnicas, que continúan en desarrollo y expansión, particularmente en investigación clínica. En varios estudios biológicos aplicaron técnicas moleculares para la obtención de 491 proteínas en la lagrimal, en el siglo XXI se identificaron más componentes como: albumina, lisozima, lactoferrina, inmunoglobulinas A y G y proteínas asociadas a sus complementos, siendo estos los principales biomarcadores de la película lagrimal para la detección de ciertas enfermedades [28].

Un tipo de diagnóstico en el ojo, es el tiempo de ruptura lagrimal, este es de modo no invasivo (NIBUT). Se trata de medir el tiempo que tarda en distorsionarse las líneas de una retícula proyectada en la córnea desde el último parpadeo. En los cuales si se obtienen valores inferiores a 15 segundos son indicativos de síndrome de ojo seco [29].

Otro método de diagnóstico que se practica desde 1903 es la prueba de Schirmer y se ha utilizado en la práctica clínica para la producción de lágrimas. Aunque se ha criticado la eficacia de esta técnica, está bien documentada en la literatura y, por ser mínimamente invasiva, es una de las pruebas más realizadas. Con solo colocar un trozo de papel absorbente con un grosor de 5 mm en el párpado inferior durante 5 minutos, la producción de lagrimal normal debe reflejar más de 15 mm de humedad en la tira de papel [30].

La película lagrimal ha sido descrita como el nuevo espejo del cuerpo. En entornos donde los costos de atención médica son altos y el diagnóstico rápido es fundamental para obtener resultados positivos para los pacientes, las lágrimas

pueden ser una nueva alternativa viable a las muestras de sangre para el diagnóstico temprano [31].

2.2.4 Biomarcadores lágrimales

El término “biomarcador” se utiliza para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluado como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad [32]. La principal utilidad de los biomarcadores lagrimales es servir de diagnóstico, identificando la enfermedad incluso antes de que los individuos presenten síntomas o se observen lesiones evidentes, propias de etapas más avanzadas, por medio de su estructura química (fig.7).

C₆H₁₂O₆ Glucosa	C₁₂₃H₁₉₃N₃₅O₃₇ Albumina	C₁₄H₂₂₆N₄₆O₂₉S₃ Lactoferrina	C₁₁H₂₀NO₆ Lisozima
---	--	--	--

Figura 7 Fórmula química de los biomarcadores
Tomadas de: <https://byjus.com/chemical-compound-formulas/>

En su mayoría los biomarcadores son proteínas y pueden ser obtenidos de muestras biológicas como lágrimas, sudor, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva o sangre [33].

Se han realizado diversos estudios en los que han empleado diferentes biomarcadores con la finalidad de relacionarlos con ciertas enfermedades, a continuación, se muestran las características (tabla 4).

Tabla 3 Biomarcadores lágrimales

Estudio	Biomarcador	Acción	Cantidad en lágrima
Rodríguez et al. (2005).	Lactoferrina	Proteína transportadora de hierro, es uno de los biomarcadores principales para la actividad bacteriostática en las lágrimas. Se ve disminuida principalmente en ojo seco (Síndrome de Sjörger) [34].	780 mg/ml

Gálvez et al. (2020)	Lisozima	Sustancia antibacteriana que trabaja junto al pH, si éste se aleja de su valor normal es probable que la actividad enzimática de la lisozima también disminuya. Está asociada principalmente con la enfermedad de ojo seco (síndrome de Sjörgen) [35].	1-2 mg/ml
Shimmura S. et. al. (2003)	Albúmina	La albumina es una proteína transportadora que ayuda a mantener el líquido sin que se filtre de los vasos sanguíneos a otros tejidos. También transporta varias hormonas, vitaminas y enzimas por el cuerpo. [36].	20 mg/ml
Sen DK, et. al. (1980)	Glucosa	Carbohidrato que ayuda a determinar el nivel en el cuerpo, si está elevado o disminuido [37]	3.6 mg/ml

Los descubrimientos moleculares que actualmente se encuentran en las lágrimas pueden servir como biomarcadores prometedores que ampliarán la comprensión de los componentes celulares y moleculares involucrados en enfermedades oculares y/o sistémicas; además, con la información anterior, es posible desarrollar tratamientos y diagnósticos para muchas de ellas [38].

2.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona la información química y la espectroscopía vibratoria en poco tiempo. Esta técnica se puede utilizar para analizar ópticamente los cambios moleculares y estructurales casi de cualquier material [39]. Las bandas espectrales en el espectro vibracional son características de las moléculas y brindan información directa sobre su composición química [40]. Actualmente se considera una de las técnicas más utilizadas para la identificación molecular, ya que lo hace solo con la incidencia de luz de una fuente de radiación monocromática que produce el esparcimiento elástico e inelástico de una muestra [41].

2.3.1 Origen del efecto Raman

El físico Hindú Chandrasekhara Venkata Raman analizó por primera vez el fenómeno Raman en 1928, lo que le valió el Premio Nobel de Física en 1930. El científico nombró en su honor el fenómeno inelástico de la dispersión de la luz, que permite estudiar la rotación y las vibraciones moleculares. Su investigación sobre

este fenómeno se inspiró en el trabajo anterior de Rayleigh. A diferencia de la afirmación de Rayleigh sobre el azul del mar, pensando que no era más que el azul del cielo visto en el reflejo, Raman realizó un experimento simple en el que pudo demostrar que el azul del agua provenía de su propio fenómeno, que luego se explicó como esparcimiento, lo cual era debido a la interacción de la luz y las moléculas de agua [42].

Para 1923, mientras estudiaba la dispersión de la luz en agua y alcohol puro, uno de sus alumnos observó que un rayo de luz solar cambiaba de color a medida que se filtraba y pasaba. Él y su equipo no pudieron eliminar este efecto, por lo que sospecharon que el fenómeno era una propiedad de la materia. Después de realizar varios estudios durante los siguientes cinco años, Raman y su discípulo Krishnan publicaron su famoso artículo en Nature 24 en 1928, en el que describían este nuevo tipo de radiación secundaria [42].

2.3.2 Efecto Raman

Este tipo de espectroscopia se encarga de proporcionar información importante sobre las vibraciones moleculares de un material o sustancia. Las moléculas están formadas por átomos interconectados, y aunque los átomos no son "bolitas" y las conexiones no son "resortes", se comportan de manera muy parecida cuando están juntas, lo que hace que vibren constantemente en torno a una posición de equilibrio [43].

El efecto Raman se basa en la dispersión inelástica de la luz que se produce cuando la materia es irradiada por una fuente de luz monocromática. Después de que esta luz monocromática haya interactuado con la muestra, una parte muy pequeña de ella ha cambiado su longitud de onda [44].

Cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, los átomos y las moléculas que componen la materia, ya sea en estado gaseoso, líquido o sólido, entran en un estado de mayor energía, donde permanecen por un corto período de tiempo y luego regresan a su estado original previamente lleno de energía [45]. El tipo de cambio debido a la energía radiante utilizada, determina los diferentes tipos

de espectroscopía conocidos. Entonces, en términos generales, en el espectro infrarrojo cercano (700 – 2500 nm) se utilizan fuentes de radiación infrarroja, que emiten fotones de menor energía, provocando excitaciones vibratorias y rotacionales en moléculas sin transiciones electrónicas [46].

La espectroscopía vibracional obtiene información analítica de los cambios producidos por las transiciones entre los niveles de energía vibracional de los enlaces químicos moleculares estimulados por la radiación electromagnética. Los átomos que componen las moléculas no están en posiciones fijas, sino que vibran y giran constantemente [46].

En términos más específicos, la espectroscopia Raman se encarga de proporcionar información importante sobre las vibraciones moleculares en un material o sustancia. En este efecto se observan tres vibraciones con frecuencias e intensidades diferentes las cuales proceden según la radiación de esparcimiento. Por ejemplo en la vibración Rayleigh, las moléculas muestran una frecuencia e intensidad igual a la de la luz, mientras que las vibraciones Raman cuenta con una información diferente; las vibraciones Stokes nos brindan menor frecuencia pero mayor intensidad, y las ondas anti-Stokes nos da mayor frecuencia pero menor intensidad (Fig. 7).

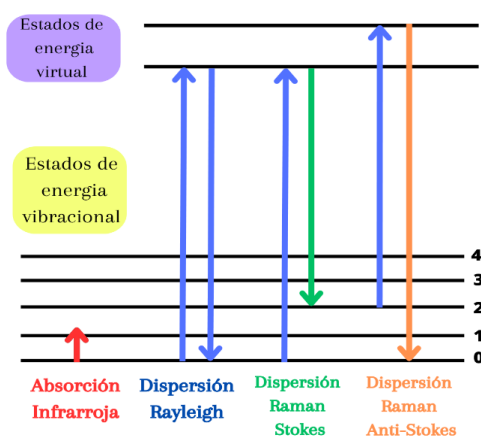


Figura 8 Diagrama de Jablonski que representa transiciones de energía cuántica para el esparcimiento de Rayleigh y Raman

De las tres vibraciones, la vibración observada en el espectro Raman las ondas Stokes son las que se perciben en este tipo de espectroscopía, que ellas nos

permiten ver los enlaces o grupos funcionales más fuertes molecularmente de una sustancia (fig. 8).

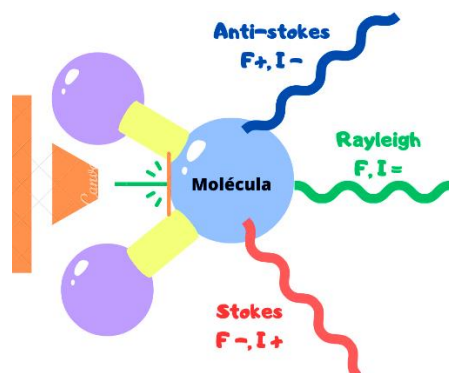


Figura 9 Vibraciones moleculares al contacto con la luz

2.5 VIBRACIONES MOLECULARES

Las moléculas hacen cierta actividad de trasladarse y rotar, mientras que sus átomos están en vibración. De acuerdo a la teoría de movimiento oscilatorio, la vibración puede considerarse como “*la combinación de varios movimientos vibratorios simples*”, dependiendo de la complejidad molecular que tenga la sustancia o el material. Estas vibraciones pueden dividirse en dos grupos principales los de tensión y los de flexión [47]. Las divisiones que tiene cada grupo pueden conocerse como deformaciones ya que el movimiento que realizan es en diferente dirección y sentido, estos son representados por algún tipo de simbología griega, por ejemplo tijereteo como delta (δ) y simétrico como ni (ν), son importantes porque en la mayoría de la literatura se manejan por estos símbolos (fig. 9).

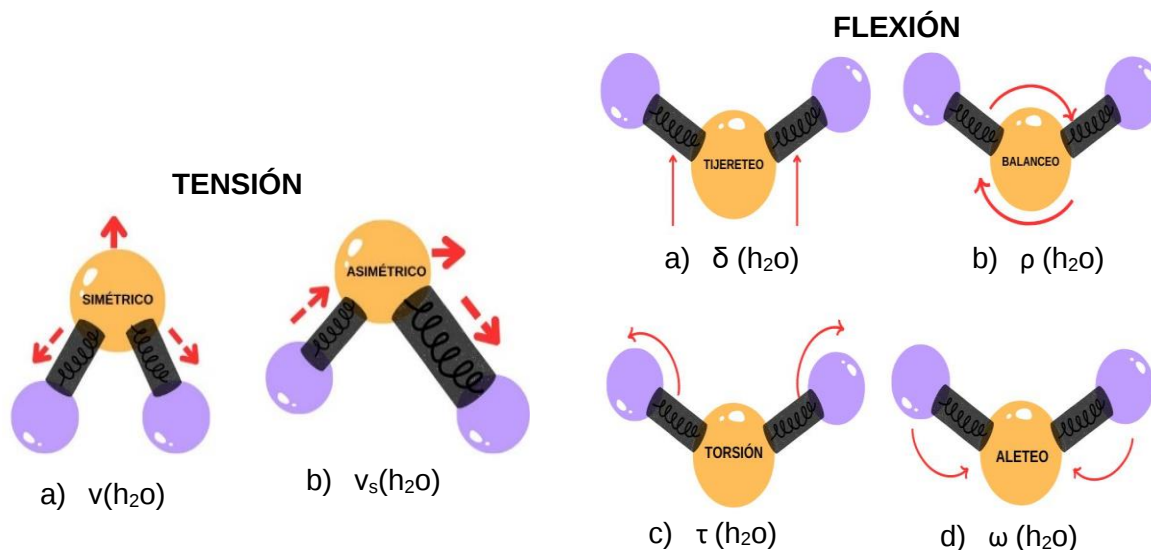


Figura 10 Tipos de vibración molecular

De acuerdo a los movimientos vibracionales, cada sustancia o materia tiene moléculas con cierta energía de vibración, pero ésta energía puede variar en la absorción de fotones conforme a la región del infrarrojo. Cuando la molécula absorbe la energía, se dice que pasa a un estado de vibración superior en el que ni los modos de vibración, ni sus frecuencias llegan a variar, pero sí cambia la amplitud de la vibración [48].

La tabla 5 muestra algunos ejemplos de vibraciones moleculares al estar en contacto con la espectroscopía Raman, indicando su respectiva longitud de onda.

Tabla 4 Vibraciones moleculares de algunos enlaces

Tipos de Vibración	Cm-1
Silicatos	500
NO ₃	500 - 600
C - H	600 - 800
C - F	700-1250
C - I	900 - 1100
C-C	1000 - 1400
C - Cl	1340 - 1465
C - Br	1350 - 1420
O - H	1410 - 1450
H	1620 - 1680
N - H	1640 - 1780
C-H	2100 - 2260
NO ₂	2215 - 2275
C = N	230 - 1250
C C =	2850 - 2960
C = O	3200 - 3500
C = C	3200 - 3570
CO ₂	3590 - 3650

tomada de la referencia [47]

Existen otro tipo de enlaces moleculares que pueden encontrarse en otro tipo de sustancias que en ocasiones están expresados de diferente manera a los elementos que ya conocemos [49], un ejemplo de ellos se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5 Significado de algunas vibraciones moleculares

Vibración molecular	Significado
$\nu(\text{Cs})$	Vibración simétrico de cesio
Tyr	Tirosinasa
$\delta(\text{CH}_2)$	Vibración de tijereteo de metileno
Trp	Triptófano
Phe	Fenilalanina

Tomada de la referencia [49]

Cabe mencionar que de acuerdo al tipo de sustancia las vibraciones que se detecten dependerán del equipo de espectroscopia ya que los rangos que suelen tener pueden mostrar o no los enlaces moleculares.

2.4 Tipos de ruidos Raman

Uno de los problemas que más se pueden observar durante la toma de espectros Raman de cualquier sustancia o material, es la obtención de ruido, ya que este puede alterar la posible determinación de picos o bandas Raman en cuanto a su intensidad o desplazamiento [50]. El ruido se puede definir como el conjunto de señales que no son de interés o que ocasionan perturbaciones a la hora de analizar un conjunto de datos. Los ruidos pueden clasificarse de diferente manera (tabla 6), debido a que pueden ser generados por diferentes fuentes (fig.11) [50].

Tabla 6 Tipos de Ruido que puede obtener un espectro Raman

TIPOS DE RUIDO	CAUSA DEL RUIDO
Ruido de disparo a)	Es el ruido más común en las muestras liquidas, debido a que es causa de las fluctuaciones aleatorias de la corriente eléctrica del dispositivo a través de un conductor, provocadas por el hecho de que la corriente se realiza en cargas discretas en los electrones [50].

Ruido generado por la muestra c)	Este ruido es generado por la propia muestra ya que incluye emisiones no deseadas, como es el caso de la fluorescencia, la cual se produce si al incidir un fotón sobre una molécula, este es absorbido la molécula pasa a un estado electrónico excitado donde permanece por unos nanosegundos, para después saltar a otro estado excitado de menor energía, liberando un fotón de frecuencia más baja que el incidente. Este ruido también incluye los cambios de intensidad debido a los cambios en la muestra no relacionados con la concentración [51].
Ruido generado por la instrumentación	Este tipo de ruido depende específicamente de la instrumentación empleada en el análisis, por ejemplo, del detector, que puede encontrar el ruido térmico y Johnson que se produce por la agitación térmica de los portadores de corriente en un elemento resistivo, de igual forma existe el ruido de lectura o contacto, entre muchos otros [52].
Ruido computacional	Se refiere al ruido que es introducido durante el escaneo de la señal de salida del detector [53].
Ruido generado por fuentes externas d)	Este ruido se genera cuando el detector no solo registra la intensidad de la luz generada por la muestra, si no también, detecta luz de alguna fuente externa de la instrumentación, por ejemplo, una lámpara a la luz del sol entre otros [54].

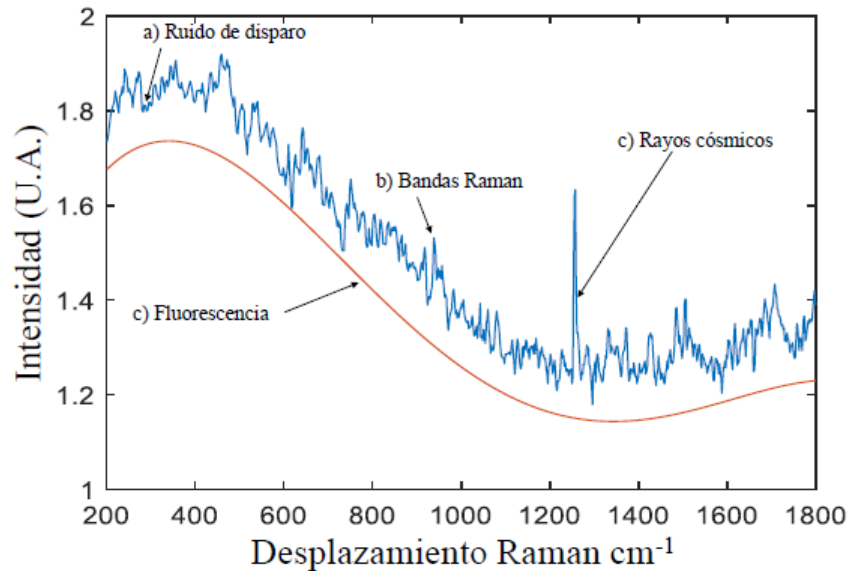


Figura 11 Tipos de ruidos en el espectro Raman
Imagen tomada de la referencia [47]

2.6 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

Al trabajar con muestras se tiene que determinar las variables implicadas en su análisis, a mayor cantidad de variables usadas las combinaciones en parejas aumentan de acuerdo a la ecuación 2.1, (donde $n!$ es el número de variables y $r!$ es el tamaño de grupo), este tamaño de grupo lo fijamos a 2, ya que, es posible observar las correlaciones positivas y negativas que existen entre cada par de variables [55].

$$\frac{n!}{r!(n-r)!} \quad (2.1)$$

Lo ideal es reducir el número de variables sin perder información y una manera de hacerlo es por medio del análisis de componentes principales o mejor conocido por sus siglas en inglés como PCA (Principal Component Analysis), es un método que realiza una proyección en un espacio p -dimensional con p variables a un espacio k -dimensional simplificando la dimensionalidad de los datos ya que $k < p$, esto permite extraer fácilmente información de grandes grupos de datos ideal para la minería de datos, pero usado en campos como: bioestadística, marketing, sociología ya que permite representar datos en espacios bidimensional o tridimensional para un mejor análisis estadístico o de correlación entre variables o grupos de variables [55].

El empleo de PCA, requiere el uso de álgebra lineal, como: vectores propios (eigenvectores) y valores propios (eigenvalores) de la matriz de correlaciones o de la matriz de varianzas-covarianzas [56]. El método PCA calcula una matriz proyectando las variables en un nuevo espacio donde se muestran la similitud entre variables por medio usualmente de la covarianza ya que se aprovechan sus propiedades. En una matriz A de $n \times n$, su eigenvector $\vec{v}$ presenta dimensiones $n \times 1$ tal que [56]:

$$A \cdot \vec{v} = \lambda \cdot \vec{v} \quad (2.2)$$

donde el número λ es el eigenvalor y los eigenvectores son aquellos que, al ser multiplicados por esta matriz, resulten en el mismo vector o en un múltiplo entero de él. Considerando el siguiente ejemplo:

$$\begin{pmatrix} 2 & 3 \\ 2 & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} 6 \\ 4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 24 \\ 16 \end{pmatrix} = 4 \times \begin{pmatrix} 6 \\ 4 \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

El vector resultante de $\begin{pmatrix} 24 \\ 16 \end{pmatrix}$ es múltiplo entero (4 veces) del vector original: $4 \times \begin{pmatrix} 6 \\ 4 \end{pmatrix}$ y, por tanto, un eigenvector de la matriz.

Cabe mencionar que dentro de las propiedades de los eigenvectores se encuentran las siguientes [58]:

- Solo las matrices cuadradas ($n \times n$) tienen n número de eigenvectores, pero existen sus excepciones.
- El eigenvector escala su magnitud al ser multiplicado, pero conserva sus propiedades, manteniendo su dirección y sentido.
- Sin importar el número de dimensiones, todos los eigenvectores son perpendiculares, facilitando la expresión de datos con los eigenvectores.

Es necesario que los eigenvectores sean unitarios (longitud 1). Considerando el siguiente ejemplo:

Necesitamos obtener el módulo del vector:

$$\sqrt{(3^2 + 2^2)} = \sqrt{13} \quad (2.5)$$

Al dividir este eigenvector por el valor de 2.5, se obtiene el vector unitario:

$$\begin{pmatrix} 3 \\ 2 \end{pmatrix} \div \sqrt{13} = \begin{pmatrix} 3 / \sqrt{13} \\ 2 / \sqrt{13} \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

Y para recuperar el valor original de los eigenvectores se emplean los eigenvalores [56].

Cada componente principal calculada es un eigenvector midiendo la cantidad de variabilidad (información), donde la máxima cantidad de variabilidad se encuentra en los primeros 2 o 3 ejes, pero si la variabilidad es > 1 indica que la componente principal explica más varianza que las variables originales, por eso es necesario estandarizar las variables para tener una media 0 y desviación estándar de 1, o las variables con mayor varianza dominarían al resto, podemos no estandarizarlas si tenemos las mismas unidades. La estandarización se lleva a cabo restando a cada componente la media y dividiendo entre la desviación estándar de la variable [57].

A diferencia de las técnicas de aprendizaje supervisado y no supervisado, la estandarización no tiene efecto sobre el resultado.

2.6.1 CALCULO DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES

Los componentes principales son eigenvectores que se calculan sobre variables normalizadas y que se encuentran en la matriz de correlaciones (donde los elementos de la diagonal son igual a 1). Generalmente, se podrán obtener tantos componentes principales distintos como variables disponibles. La elección se realiza de manera que la primera componente principal sea la que mayor varianza obtenga; la segunda debe obtener la máxima variabilidad después de la primera y así sucesivamente, eligiendo un porcentaje suficiente de varianza total que pueda representar o describir bien al problema [58].

El objetivo es identificar las combinaciones lineales que mejor representan las variables $X_1, X_2, X_3 \dots X_P$. y $(Z_1, Z_2, Z_3 \dots, Z_M)$ siendo $M < P$ combinaciones lineales de las p variables originales, es decir [58]:

$$Z_m = \sum_{j=1}^p \phi_{jm} X_j \quad (2.8)$$

donde $\phi_{1m}, \phi_{2m} \dots \phi_{pm}$ son las cargas o loadings de los componentes principales [60].

Los loadings dan idea sobre qué peso tiene cada variable en cada componente, cada loading de longitud ($d = p$), define la dirección en el espacio sobre el cual la varianza de los datos es mayor. La combinación lineal se normaliza para no aumentar la varianza, para que la suma de cuadrados de los loadings se iguale a 1 [59].

Si las variables no se estandarizaran antes de aplicar PCA, los loadings de las variables con mayor varianza serían muy altos con respecto al resto, además de que una componente principal estaría muy influenciada por esta variable [59].

Cabe mencionar que no existe un método objetivo para escoger el número de componentes principales que son suficientes para un análisis, por lo que depende del juicio del analista y del problema en cuestión. Si explican suficiente variabilidad y el objetivo es la visualización de los datos, no se suelen escoger más de tres componentes principales, para así facilitar la representación gráfica y la interpretación [59].

EJEMPLO DE PCA

Se tiene un conjunto de datos aleatorios (columna 1 y 2 de la tabla), de solo 2 dimensiones, esta simpleza es para poder proporcionar apoyo visual por medio de gráficos de los datos, y mostrar cómo funciona el ACP en cada paso.

Paso 1: Obtener los datos iniciales

Paso 2: Calcular la media de los datos con la formula siguiente

$$media = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Cálculo de la media de los datos: $x=1.81$ $y=1.91$

Paso 3: restar la media obtenida a cada uno de los datos

x	y	x'	y'
2.5	2.4	0.69	0.49
0.5	0.7	-1.31	-1.21
2.2	2.9	0.39	0.99
1.9	2.2	0.09	0.29
3.1	3	1.29	1.09
2.3	2.7	0.49	0.79
2	1.6	0.19	-0.31
1	1.1	-0.81	-0.81
1.5	1.6	-0.31	-0.31
1.1	0.9	-0.71	-1.01

Tabla 8 Datos originales y ajustados

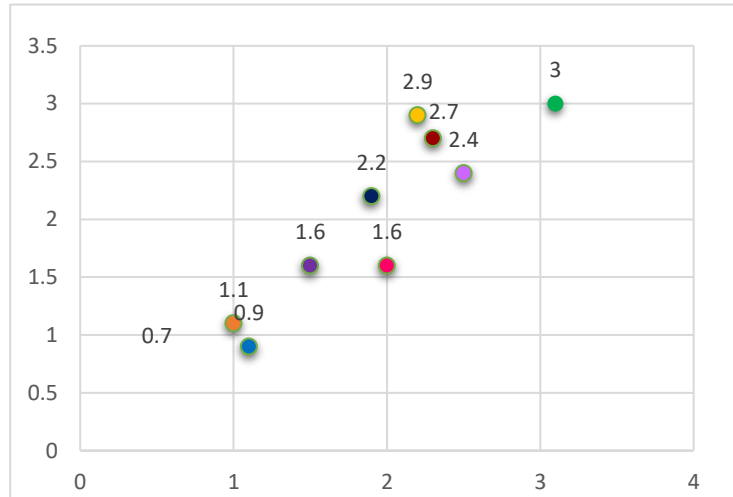


Figura 13 Muestra de datos originales del ejemplo ACP

Paso 4: Calcular la matriz de covarianza de los resultados de varianza y covarianza con las fórmulas siguientes

$$Var(x) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \quad cov(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n}$$

Dado que los datos son bidimensionales, la matriz de covarianza será de 2×2 , la matriz se arma, calculando la covarianza entre la variable x' , y' .

$$Cov = \begin{pmatrix} 0.616555 & 0.615444 \\ 0.615444 & 0.716555 \end{pmatrix}$$

Paso 5: Calcule los eigenvectores y los eigenvalores de la covarianza

Dado que la matriz de covarianza es cuadrada, podemos calcular los eigenvectores y los eigenvalores de esta matriz.

Eigenvector

$$\begin{pmatrix} -0.735178 & -0.677873 \\ -0.677873 & -0.735178 \end{pmatrix}$$

Eigenvalor

$$\begin{pmatrix} 0.490833 \\ 1.284027 \end{pmatrix}$$

Paso 6: elegir componentes y formar un vector de características

$$\begin{pmatrix} -0.677873 \\ -0.735178 \end{pmatrix}$$

Se puede observar en la figura los datos representados de los dos eigenvectores, se debe elegir el vector, que su recta esté más cerca de los puntos que en este caso son los datos ajustados.

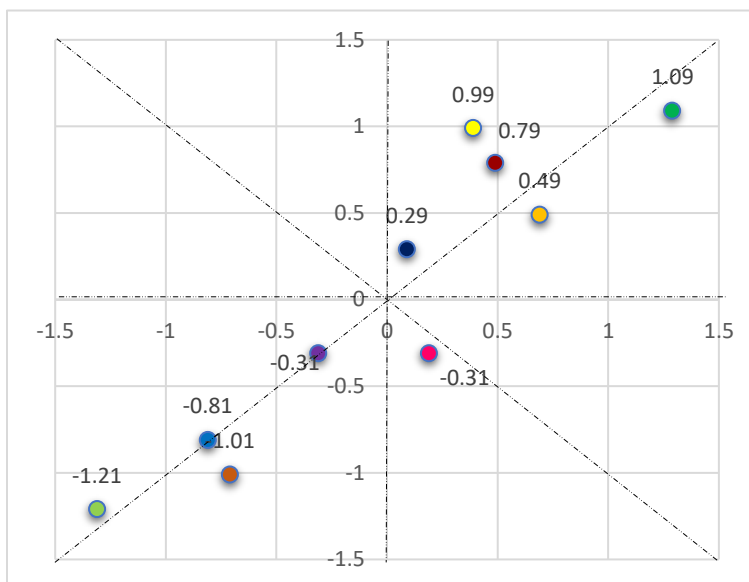


Figura 14 Gráfica de los datos normalizados con los eigenvectores (media restada)

Paso 7: derivación de los nuevos datos

Datos finales = fila característica del vector por la de fila datos ajuste de la tabla 7

x	y
-0.827	-0.175
1.777	0.142
-0.992	0.384
-0.274	0.130
-1.675	-0.209
-0.912	0.175
0.099	-0.349
1.144	0.046
0.438	0.017
1.223	-0.162

Tabla 9 Datos nuevos y ajustados

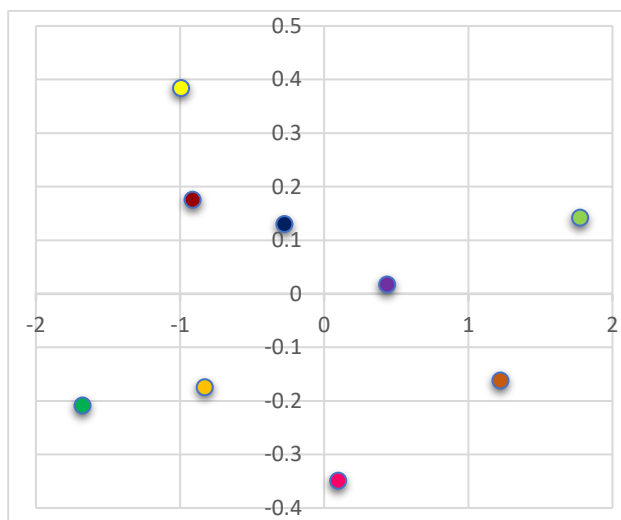


Figura 15 Gráfica de los componentes 1 y 2 del nuevo conjunto de datos

Debido que el ejemplo era solo de dos variables, lo que obtenemos como resultado es un giro de los datos originales sin perder sus características. Como se puede ver en la figura14.

CONCLUSIÓN

En este presento la anatomía del ojo, así como la fisiología y composición lagrimal, además de las bases y fundamentos de las características tomadas en las concentraciones por medio de espectroscopia Raman y analizada con PCA que se tomaron en cuenta para la realización de la metodología que se presenta en el capítulo siguiente con los datos obtenidos.

Referencias

17. Marieb, E. N. (2008). Anatomía y fisiología humana (9.a ed.) [Libro web]. ADDISON WESLEY.
[https://ifssa.edu.ar/ifssavirtual/cms/files/LIBRO%20IFSSA%20Anatomia.y.Fisiologia.Humana.Marieb%209aed.%20\(1\).pdf](https://ifssa.edu.ar/ifssavirtual/cms/files/LIBRO%20IFSSA%20Anatomia.y.Fisiologia.Humana.Marieb%209aed.%20(1).pdf)
18. Saladin, K. S. (2013). Anatomía y fisiología: La unidad entre forma y función. Mc Graw Hill, sexta. <https://apunteca.usal.edu.ar/id/eprint/2028/>
19. Cassel, G. H., Billig, M., & Randall, H. G. (1998). The eye book : a complete guide to eye disorders and health. En Johns Hopkins University Press eBooks. <https://ci.nii.ac.jp/ncid/BA45024377>
20. Burkat, C. N., & Lucarelli, M. J. (2006). Anatomy of the Lacrimal System. En Springer eBooks (pp. 3-19). https://doi.org/10.1007/978-0-387-35267-1_1
21. Sánchez Sánchez, A. S., & Rodríguez Mercado, A. (2020). Las lágrimas y sus padecimientos. Revista Digital Universitaria, 21(5). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2020.21.5.6>
22. Wang, E., Uhler, T. (2015). Tear Film (Tears). In: Schmidt-Erfurth, U., Kohnen, T. (eds) Encyclopedia of Ophthalmology. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35951-4_132-3
23. Gerg, A., Sheppard, D., Donnenfeld, D., Meyer, D., & Mehta, C. (2008). Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular (revisado ed.). Panamericana.
24. Mayorga, M. (2008, julio). Película lagrimal: estructura y funciones. Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular, 11(1). Recuperado junio de 2022, de <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/5599183.pdf>
25. Datos sobre las lágrimas. (2023, 18 abril). American Academy of Ophthalmology. <https://www.aaof.org/salud-ocular/consejos/datos-sobre-las-lagrimas>
26. Tiffany, J. M. (2008). The Normal Tear Film. KARGER eBooks, 1-20. <https://doi.org/10.1159/000131066>
27. Corella, D., & Ordovas, J. (2015). Biomarcadores: antecedentes, clasificación y guía para su aplicación en epidemiología nutricional. Revista Española de

- Nutrición Comunitaria, 21(1), 5064.
<https://doi.org/10.14642/RENC.2015.21.sup1.5064>
28. Bachhuber, F., Huss, A., Senel, M., & Tumani, H. (2021). Diagnostic biomarkers in tear fluid: from sampling to preanalytical processing. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89514-8>
 29. Pruebas para diagnosticar el Ojo Seco. (s. f.). Clínic Barcelona. <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/sindrome-de-ojo-seco/diagnostico>
 30. Vilar, E. Y., Parafita-Mato, M. A., Fernández, M. L., Pérez, J. J., González-Méijome, J. M., & Expósito, A. C. (2002). Estudio de la película lagrimal. *The Vision Care Institute*, 41. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6221916>
 31. Acera, A., & Vecino, E. (2012). Biomarcadores de la lágrima como fuente de información de la superficie ocular. ¿Las lágrimas como espejo del ojo? *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. <https://doi.org/10.1016/j.ofal.2012.04.022>
 32. Duran, S., & Gómez, A. (2019, 5 diciembre). Biomarcadores en película lagrimal y su aplicación clínica. | *Revista Salud Bosque*. *Salud Bosque*. Recuperado junio de 2022, de <https://revistasaludbosque.unbosque.edu.co/index.php/RSB/article/view/2787/2430>
 33. Rápido, D. (2023, 5 abril). Aplicaciones de Pruebas No Invasivas en Medicina. *Diagnóstico Rápido*. <https://www.diagnosticorapido.mx/avances-en-pruebas-no-invasivas-innovaciones-y-aplicaciones-en-el-mundo-medico/>
 34. Rodríguez, Vázquez, Ramos, D. A. L. G. (2005, octubre). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3–4). Recuperado junio de 2022, de https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-3_4g.pdf
 35. Gálvez-Irriqui, Alma Carolina, Plascencia-Jatomea, Maribel, & Bautista-Baños, Silvia. (2020). Lisoizimas: características, mecanismo de acción y

- aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 360-383. Epub 27 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-6>
36. Shimmura S, Ueno R, Matsumoto Y, Goto E, Higuchi A, Shimazaki J, Tsubota K. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye. *Br J Ophthalmol*. 2003 Oct;87(10):1279-83. doi: 10.1136/bjo.87.10.1279. PMID: 14507766; PMCID: PMC1920766.
 37. Sen DK, Sarin GS. Tear glucose levels in normal people and in diabetic patients. *Br J Ophthalmol*. 1980 Sep;64(9):693-5. doi: 10.1136/bjo.64.9.693. PMID: 7426593; PMCID: PMC1043796.
 38. Loscos López, A., Colomer Rubio, E., Marco Úbeda, M. F., & Bel Reverter, M.. (2002). Actitud a seguir en el caso de accidente biológico. *Medifam*, 12(9), 16-35. Recuperado en 02 de junio de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682002000900002&lng=es&tlng=es.
 39. Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5):493–541, 2007. doi:10.1080/05704920701551530.
 40. J. M. Shaver. *Chemometrics for Raman Spectroscopy*. Taylor & Francis Group, New York, 2001. ISBN 0-8247-0557-2.
 41. Smith, E., & Dent, G. (2005). Modern Raman spectroscopy: a practical approach. *Choice Reviews Online*, 43(02), 43-0956. <https://doi.org/10.5860/choice.43-0956>.
 42. Castro, J., Villanueva, A., & Ortiz, C. (2013). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones. *Sociedad Española de Óptica*, 1, 83-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.7149/OPA.46.1.83>
 43. E. (2023). Espectroscopía infrarroja (I): Vibraciones moleculares. TRIPLÉN LACE. <https://triplenlace.com/2012/12/29/espectroscopia-infrarroja-i-vibraciones-moleculares/>
 44. Pons, R. C. (2017). Técnicas de espectroscopía Raman para el estudio de mucosa oral. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=124579>

45. Guía de espectroscopía Raman. (s. f.). Bruker.
<https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-spectrometers/what-is-raman-spectroscopy.html#:~:text=Se%20basa%20en%20la%20dispersi%C3%B3n,se%20llama%3A%20el%20efecto%20Raman.>
46. Hess, C. (2021). New advances in using Raman spectroscopy for the characterization of catalysts and catalytic reactions. *Chemical Society Reviews*, 50(5), 3519-3564. <https://doi.org/10.1039/d0cs01059f>
47. González, N., & Castro, J. (2021). Cuantificación de hemoglobina glicosilada y glucosa in vivo usando espectroscopia Raman y redes neuronales artificiales [Tesis Doctorado]. INAOE.
48. Sanchez, G., & Linares, R. (1991). VIBRACIONES MOLECULARES Y ESPECTROMETRIA INFRARROJO Y RAMAN. *REVISTA DE CIENCIA*, 1. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/4927/VIBRACIONES%20MOLECULARES.pdf?sequence=1>
49. Adapa, P., Karunakaran, C., Tabil, L. G., & Schoenau, G. (2009). Potential applications of infrared and Raman spectromicroscopy for agricultural biomass. *Agricultural Engineering International: The CIGR Journal*, 11. <http://cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/viewFile/1081/1151>
50. Ruiz-Carbajal J. (2012). Reconocimiento de Picos y Eliminación de Ruidos de Espectros Raman de Muestras Químicas y Biológicas [posgrado]. Instituto Nacional en Astrofísica, óptica y electrónica (INAOE).
51. Ramos, J. L. C., Luna, A. E. B., & Lima, C. F. R. A. C. (2013). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones. *Optica Pura y Aplicada*, 46(1), 83-95. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4213970>
52. R. Sarpeshkar, T. Delbruck, and C. A. Mead. White noise in mos transistors and resistors. *IEEE Circuits and Devices Magazine*, 9(6):23–29, Nov 1993. doi:10.1109/101.261888.
53. B. Schrader, editor. Tools for infrared and Raman spectroscopy, chapter 3, pages 63–188. John Wiley & Sons, Ltd, 1995. ISBN 9783527615438. doi:10.1002/9783527615438.ch03.

54. R. L. McCreery. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. John Wiley & Sons, Inc., 2000. ISBN 0471252875.
55. RPubS - Análisis de componentes principales (PCA). (s. f.).
https://rpubs.com/Cristina_Gil/PCA
56. Amat, J. (2017). Análisis e Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA) y t-SNE. Ciencia de datos, 1.
https://www.cienciadedatos.net/documentos/35_principal_component_analysis#Ejemplo_c%C3%A1lculo_eigenvalues_y_eigenvalues
57. Flores, M. J. S. (2021, 19 agosto). Capítulo 3 Análisis de Componentes Principales | Técnicas Multivariadas con R.
https://bookdown.org/jsalinas/tecnicas_multivariadas/acp.html
58. R, W. S. (2022, 15 agosto). Análisis de Componentes Principales.
https://rstudio-pubs-static.s3.amazonaws.com/931871_33029808c35b48c3a2f598cf34ba0dad.html
59. Fanjul, J. M. (2022, 4 diciembre). ¿Qué es el Análisis de Componentes Principales y cómo reducir el tamaño de una base de datos? Blog de Hiberus Tecnología. <https://www.hiberus.com/crecemos-contigo/analisis-de-componentes-principales/>

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA DEL TRABAJO

En este capítulo se explican los métodos utilizados para caracterizar biomarcadores lagrimales, se describe la manera de obtener espectros Raman de cada biomarcador y su respectivo análisis de datos.

3.1 UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO

Las actividades de investigación se desarrollaron dentro del laboratorio del Grupo de Instrumentación de Óptica Biomédica (GIOB), ubicado dentro del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), entre enero y mayo de 2023, donde, se realizaron concentraciones de lágrimas sintéticas de los principales biomarcadores de la película lagrimal, y la adquisición de sus respectivos espectros Raman.

3.2 CONCENTRACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

Se conoce como concentración química a la cantidad de soluto (sustancia), que hay en una determinada cantidad de disolvente (líquido) [60], el componente con mayor proporción debe ser el disolvente, si hay poco soluto y la concentración es pequeña, se le conoce como concentración diluida, pero si hay mucha concentración del soluto y la concentración es grande a esta se le denomina *saturada*. Para determinar la cantidad necesaria del soluto en una concentración se debe utilizar la fórmula de porcentaje masa volumen tal como se muestra a continuación [61]:

$$\%mV = \frac{m}{v} \times 100 \quad (3.1)$$

En esta fórmula ***m*** es la masa medida en gramos y ***V*** el volumen medida en ml. Esta ecuación tiene tres variables, proponemos usar como constantes una masa conocida de soluto y un porcentaje conocido, lo que debemos calcular es el volumen de los biomarcadores encontrados en la lagrima, despejando el volumen de la ecuación se obtiene la ecuación 3.1.

$$V = \frac{m \times 100}{\%mc} \quad (3.2)$$

Esta fórmula permite calcular el volumen dependiente de la masa del soluto y el porcentaje, permitirá calcular con precisión concentraciones pequeñas. Las unidades deben ser representadas en partes por millón (ppm), ya que es la unidad usada frecuentemente para medir el volumen que ocupan pequeñas cantidades de elementos dentro de una mezcla. Generalmente se refieren a porcentajes en peso en el caso de los sólidos, y en volúmenes en el caso de gases, por lo que la fórmula 3.2 debe quedar de la siguiente manera [62]:

$$ppm = \frac{\text{gramos del soluto}}{\text{mililitros del solvente}} \times 1,000,000 \quad (3.3)$$

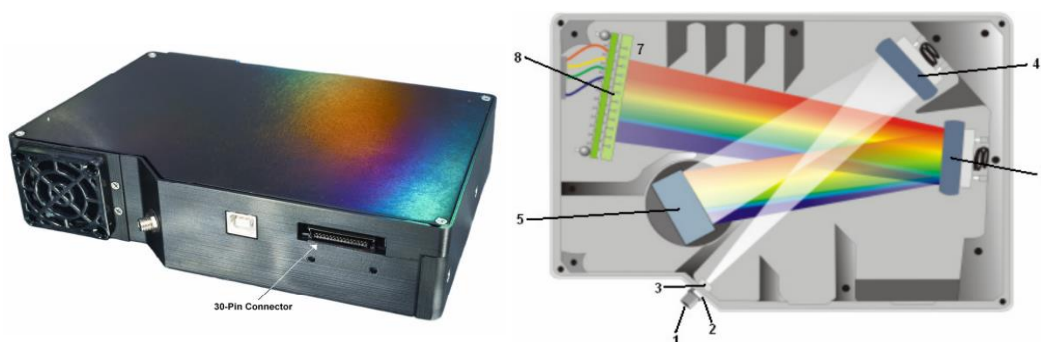
De esta manera se calculan las diferentes concentraciones de los biomarcadores de las lágrimas sintéticas.

3.3 ARREGLO EXPERIMENTAL

En esta sección se describe el tipo de espectrómetro que se utilizó y aquellas características necesarias para obtener los espectros Raman de cada una de las concentraciones de los biomarcadores lagrimales.

3.3.1 Características del espectrómetro Raman

El espectrómetro Raman que se utilizó dentro del laboratorio GIOB es un modelo QE65000 de la compañía Ocean Optics®, el cual incluye un arreglo lineal de pixeles CCD conectados con todos los circuitos necesarios para la operación. Este usa un detector de enfriamiento TEC de 1044x64 elementos CCD Hamamatsu, el cual opera a través de una USB (sin funcionamiento del TEC), o de una fuente de alimentación +5VDC, controlada por un microcontrolador, por lo tanto todos los parámetros operativos se ejecutan por medio del software de interfaz a la unidad, la resolución óptica está entre 0.14 a 7.7nm FWHM (~ 6 cm⁻¹), sus dimensiones son 182mm x 110mm x 47mm y su peso es de 1.18 Kg (fig.15) [63] .



a) b)
Figura 16 Componentes del espectrómetro Ocean Optics®, a) vista exterior del espectrómetro, b) componentes internos del espectrómetro. Tomadas de: Manual de Ocean Optics

Los Componentes principales del espectrómetro Raman QE65000 son parte esencial para el análisis de las muestras (tabla 8) los cuales cumplen con ciertas funciones de operación [64], en la tabla 9 mostramos las funciones fundamentales del espectrómetro, sus componentes son mostradas en la figura 15.

Tabla 10 Componentes del espectrómetro y su función

Componentes	Función
1. Conector	Asegura la entrada de la fibra en el espectrómetro para que la luz entre y pase por la fibra que la conducirá al banco óptico desde el conector.
2. Rendija	Es una pieza de material oscuro que contiene una abertura rectangular. Esta abertura regula la cantidad de luz que pasa al banco óptico y controla la resolución espectral.
3. Filtro	Se encarga de restringir las radiaciones ópticas para la validez de las regiones de longitud de onda determinada.
4. Espejo colimador	Después de que la luz entre por el espectrómetro y pase a través del conector, la rendija y el filtro, reflejan la luz en el espejo colimador y este se hace un haz de luz paralelo para incidir en la rejilla de difracción.
5. Rejilla de difracción	Se encarga de descomponer la luz que le incide del espejo colimador, lo que permite especificar la longitud de onda y las resoluciones del espectrómetro.
6. Espejo de Enfoque	Recibe la luz reflejada desde la rejilla y enfoca la luz en el detector CCD.

7. Lente de colección del detector	Capta la luz proveniente del espejo de enfoque. Este lente se encarga de arreglar cada pixel que proviene de alguna zona del espectro y este genera una respuesta digital (datos que vemos en la computadora), a este arreglo se le conoce como enfriador TE que mantiene la temperatura del detector.
8. Detector CCD	Este detector elimina los efectos de segundo orden y utiliza una rejilla HC-1 en un sistema de 200-959 nm de longitud de una onda en el espectrómetro QE65000.

Información tomada de: Ocean Optics, Installation and Operation Manual

Adicional a los elementos descritos el espectrómetro requiere de otros aditamentos para su funcionamiento como la punta de prueba (fig. 16) cuenta con un filtrado óptico de 10 y ofrece una atenuación eficiente de la línea Rayleigh para espectros de fondo, de igual forma tiene una sonda liviana y compacta, además contiene un obturador de seguridad manual, para proteger al usuario de la luz láser de excitación. Está conectado para acoplar a la mayoría de las combinaciones del láser del espectrómetro.



Figura 17 Punta de prueba del espectrómetro Raman.
Tomada de: <http://www.inphotonics.com/probeRPB.htm>

Siendo un poco más específicos, en la tabla 10 se señalan con mejor precisión algunas de las partes importantes que integran a la punta del espectrómetro Raman.

Tabla 11 Características y especificaciones de las partes de la punta de muestra del espectrómetro Raman QE65000

PARTES DE LA PUNTA	ESPECIFICACIONES
Cabezal de muestreo	Son de aluminio anodizado 4,2 x 1,5 x 0,5, con punta de sonda de acero inoxidable.
Rango espectral	250 – 3900 (Stokes)
Longitud de onda de excitación	785nm (espectrómetro Raman QE65000)
Distancia de trabajo	7mm (estándar) 5 o 10mm opcional
Fibras	combinación permanente alineada de dos fibras individuales de 105µm y 200µm, con micro óptica de filtrado y dirección, cubiertas de poliuretano resistente
Filtro	Diseño patentado para el filtrado completo de la línea láser y las contribuciones espectrales de cuarzo de las fibras de entrada y salida.

Información tomada de: <http://www.inphotonics.com/probeRPB.htm>

Combinando todos estos componentes, como se muestra en la Figura 17, el espectrómetro Raman desempeña su función correctamente para la detección de los biomarcadores de la película lagrimal.

El láser emite luz infrarroja a una longitud de onda de excitación de 785 nm, lo que hace que la luz se bifurque a través de la punta con dos fibras, una para recolectar y conectar al espectrómetro, y otra que va a la fuente de iluminación. Una vez que la señal llega al espectrómetro, donde se produce el efecto Raman, se envía a un ordenador conectado al espectrómetro vía USB, y el programa Spectral Suite permite la observación de los espectros obtenidos de la sustancia.

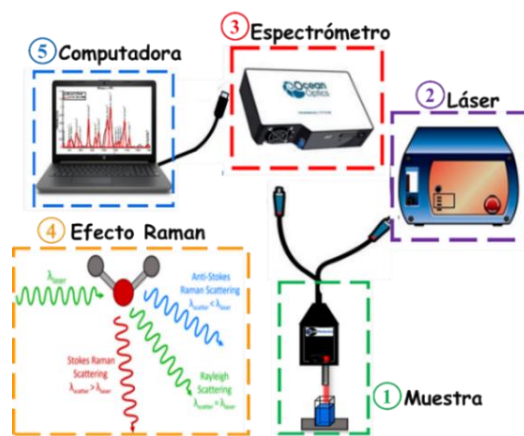


Figura 18 Esquemático que muestra la partes en las que se ensambla el espectrómetro Raman

3.3.2 SOFTWARE SPECTRA SUITE

Después de adquirir la muestra con el espectrómetro en conjunto, se utiliza el software Spectra Suite®, es la plataforma más completa para la recopilación, almacenamiento y análisis de datos espectrales de Ocean Optics. Este programa permite manipular y observar diferentes características durante su uso (fig. 18).

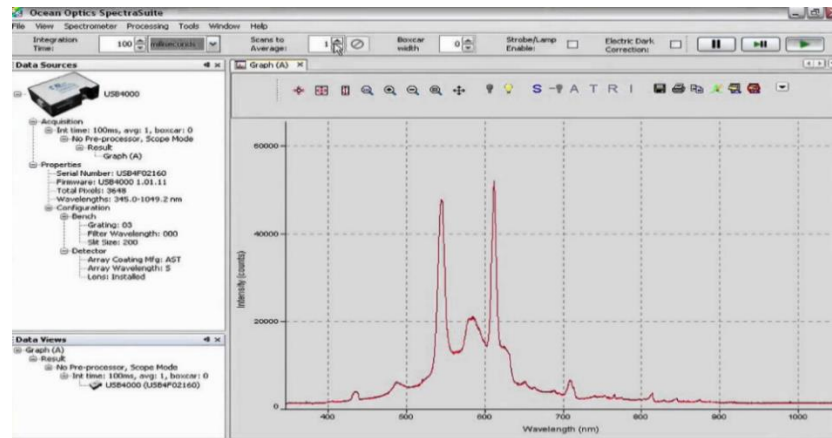


Figura 19 Vista previa de la interfaz del programa Spectra Suite

Siendo un poco más específicos dentro del programa podemos observar que éste dividido en 5 áreas diferentes tal como se muestra en la figura 19.



Figura 20 Áreas principales del programa Spectra Suite, 1) Top menú, 2) Barra de herramientas, 3) Panel de fuentes de datos, 4) Visualización de datos, 5) Área grafica

Cada área del software cumple con una función diferente, la cual nos proporciona información sobre la muestra y el equipo utilizado (fig. 20).

a) área de panel de fuentes



b) visualización de datos

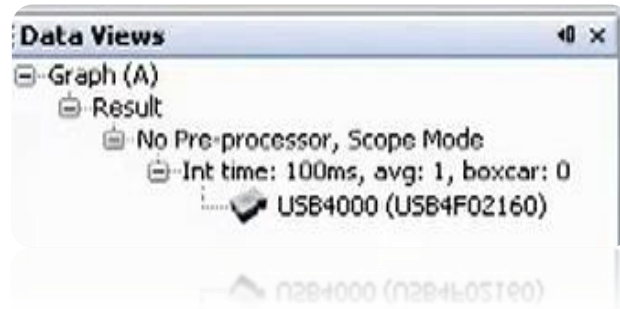


Figura 21 Área de panel de fuentes y de visualización de datos, a) área del panel, b) visualización de datos eliminar o describir qué funciones tiene.

En este programa se encuentra una de las áreas más importantes que lleva por nombre barra de herramientas la cual tiene las siguientes funciones (fig.21):



Figura 22 Barra de Herramientas, tiempo de integración, exploraciones promedio, boxcar y el control de adquisición.

- Tiempo de integración: se refiere al tiempo en el cual el CCD recoge los fotones, se puede considerar como un tiempo de detección o colección de la luz.
- Exploraciones promedio: permite promediar los espectros colectados.
- Boxcar: permite reducir el ruido y suavizar los espectros.

De igual manera el programa nos permite capturar cada uno de los espectros que se van obteniendo de las muestras, estas deben irse almacenando en una carpeta específica y en un formato txt que nos permita observar los valores, esta captura se muestra en la figura 22:

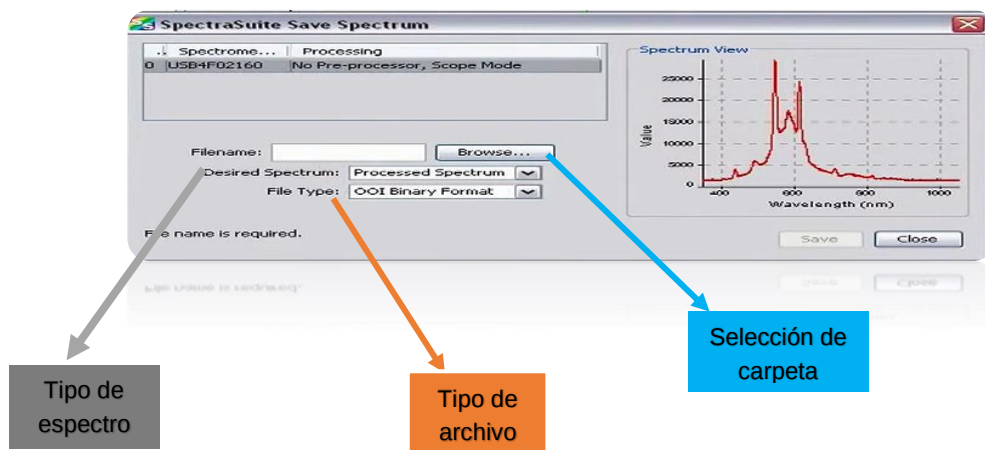


Figura 23 Ventana para guardar y almacenar los espectros obtenidos de la muestra

Este programa nos permite calibrar el espectrómetro Raman, el cual debe colocarse con los parámetros de control y adquisición, como muestra la figura 23, se da clic en ambos iconos que tienen la bombilla en color gris, este paso nos deja almacenar el espectro oscuro de la muestra y luego muestra la señal más aproximado al cero.

Durante las mediciones se pueden ver dos ejes en la pantalla del software, el eje "Y" representa la intensidad en unidades arbitrarias y el eje "X" representa el cambio de intensidad Raman en unidades $[cm^{-1}]$ (fig. 23). Al iniciar la medición en el eje de la intensidad se debe observar una señal entre -5 y 5 de intensidad, si es menor mucho mejor. Esto representa el rango del ruido inicial del software ya que la señal de ruido debe mantenerse al mínimo en comparación con la señal que se va a recopilar.

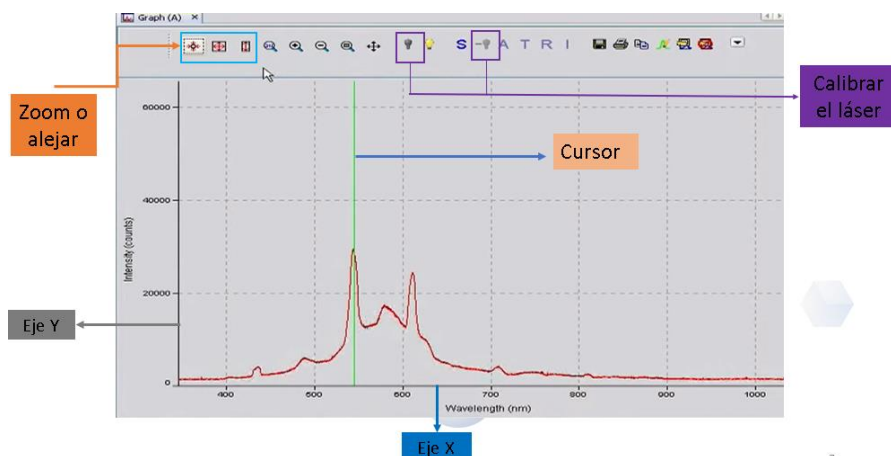


Figura 24 Área de gráficas, son importantes durante la toma de los espectros

3.4 OBTENCIÓN DE ESPECTROS RAMAN

Para la obtención de espectros Raman bien definidos y sin demasiado ruido, lo primero que se debe realizar es colocar el equipo en un lugar que le permita estar lo más oscuro posible para que el láser de emisión evite interactuar con algo externo a la muestra (lagrime sintética), esto es debido a que cuando la muestra entra en contacto con la luz infrarroja se esparce en todas direcciones mediante vibraciones moleculares.

Para el proceso de medición de espectros con los biomarcadores propuestos (albumina, lactoferrina, lisozima, glucosa) que forman parte de la lagrime. Se consideraron los siguientes parámetros que fueron ajustados experimentalmente y que se presentan a continuación:

- Temperatura ambiente de 20 a 26 grados Celsius
- Contenedores de cuarzo
- Distancia láser a la muestra de 7 a 10 mm
- Rango espectral de ruido al iniciar mediciones de -5 a 5 en intensidad.
- Biomarcadores puros: albumina, lactoferrina, lisozima y glucosa de la empresa SIGMA, (<https://www.sigmaaldrich.com>).
- Software Spectra Suite

De cada biomarcador se obtuvieron 12 espectros por cada uno de los porcentajes de concentración y de los cuales se adquirió una media espectral para un rango de longitud de onda de 200 a 1800 cm^{-1} .

3.5 APLICACIÓN DE FILTRADO Y SUAVIZADO DE LOS ESPECTROS RAMAN

Dado los espectros de cada una de las concentraciones de los biomarcadores, el siguiente paso consistió en la aplicación de filtrado y disminución de fluorescencia obtenido por la muestra durante su medición espectral.

Esta reducción de fluorescencia se realiza a través de la aplicación de mínimos cuadrados, es decir que se va ajustando una línea recta a los puntos del espectro. La función para ajustar a los datos experimentales del espectro Raman puede acoplarse desde un polinomio de grado uno[65], hasta el polinomio que se asemeje

más a la forma del espectro que se está filtrando, esto lo podemos observar mejor en la figura 24

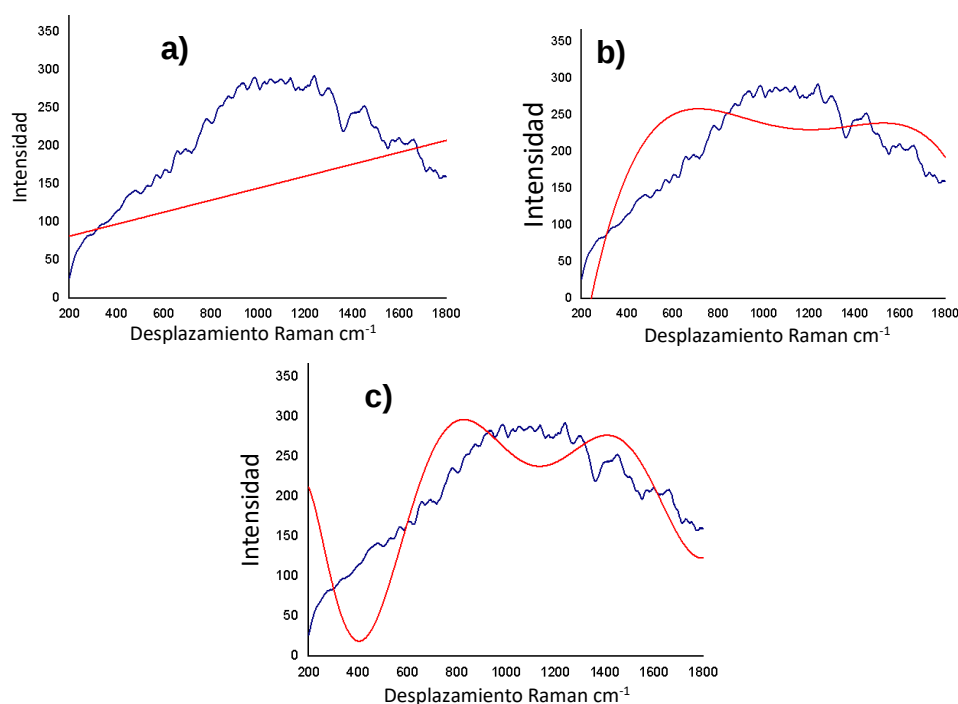


Figura 25 Ejemplo del ajuste de curva con mínimos cuadrados para disminuir la fluorescencia del espectro aplicando ecuaciones de a) primer grado, b) cuarto grado, c) octavo grado

Los ejemplos anteriores muestran cómo se llevarían a cabo el filtrado de manera manual. Sin embargo, aplicando el programa realizado en el grupo de instrumentación óptica biomédica (GIOB) en el software de MATLAB® [66], este proceso se ejecuta de manera rápida, ajustando una curva que pase lo más cerca posible del espectro obtenido (fig. 25) [66].

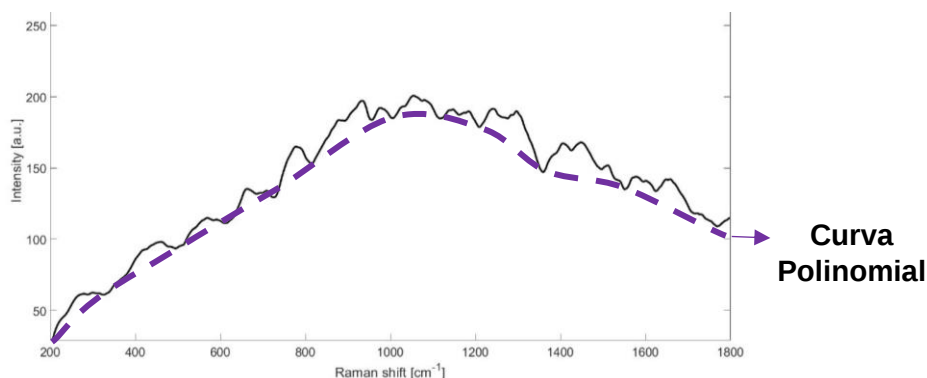


Figura 26 Ajuste de curva polinomial con el programa de Matlab del espectro obtenido

Después de encontrar la curva más semejante al espectro, esta se va restando a cada punto del espectro un valor de la curva obtenida (fig. 26), lo que permite la reducción de fluorescencia, conociéndose como un pequeño ajuste que normaliza todo al mismo nivel, creando una mejor visualización de los picos con mayor definición para cada sustancia (fig. 27).

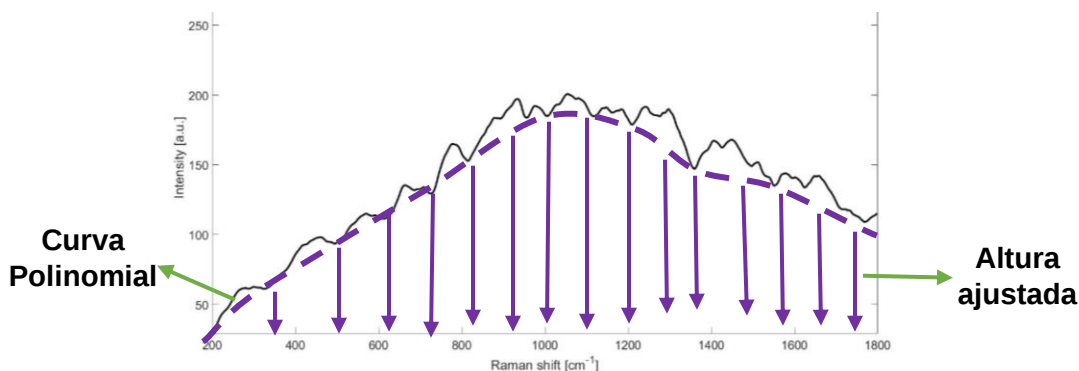


Figura 27 Ejemplo del ajuste de altura que hace el software de MATLAB®, para restar la fluorescencia

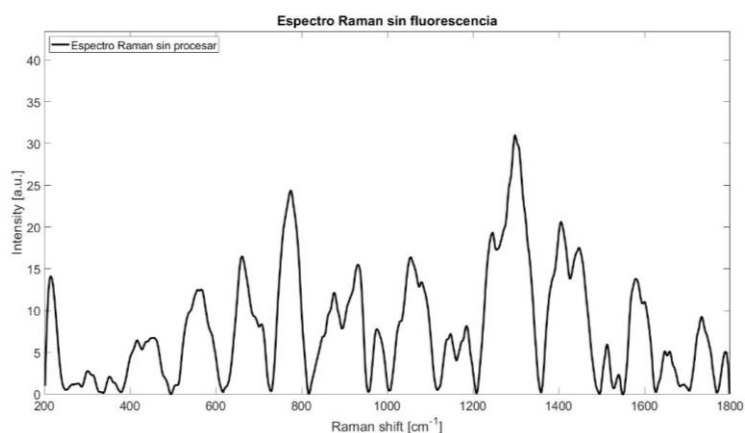


Figura 28 Espectro Raman sin fluorescencia

El mismo programa de MATLAB®, también nos permite realizar el suavizado del espectro, es decir que nos ayuda a eliminar el ruido de alta frecuencia que llega a percibir el espectrómetro Raman durante las mediciones y con esto dejar en mejor calidad el espectro.

3.6 ANÁLISIS DE ESPECTROS RAMAN

Para comenzar con la caracterización de la lagrime, lo primero fue la adquisición espectral de los biomarcadores presentes en la película lagrimal, albumina,

lactoferrina, glucosa y lisozima, cuestión que no se ha reportado en la literatura, para después poder localizar las bandas Raman características de cada uno.

Utilizando el software de Matlab, después de tomar las 21 muestras de cada una de las concentraciones de los biomarcadores, se obtuvo un espectro promedio de las muestras, para posteriormente realizar el suavizado y filtrado de los espectros Raman, así como la detección de las bandas Raman y poder contrastar lo que detectamos con los estudios encontrados en la literatura.

Por último, se implementó un proceso de clasificación mediante análisis de componentes principales con el objetivo de conseguir el porcentaje de relación entre las bandas espectrales principales.

CONCLUSIÓN

Este capítulo presentó la metodología que se utilizó para la caracterización de las concentraciones de los biomarcadores , así como el equipo óptico y softwares para el análisis y desarrollo de esta tesis.

Referencias

60. UNIVERSIDAD CATÓLICA SILVA HENRÍQUEZ, U. C. S. H., & Quintriqueo, A. (2018). Guía de disoluciones UCSH. Pag. 11, UCSH. Recuperado 2022, de http://vinculacion.ucsh.cl/wp-content/uploads/Gu%C3%ADa-de-Disoluciones-UCSH_.pdf
61. Libretexts. (2020, 30 octubre). 11.3: La Solubilidad. LibreTexts Español. Recuperado agosto de 2022, de [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Libro%3A_Quimica_General_\(OpenSTAX\)/11%3A_Las_soluciones_y_los_coloides/11.3%3A_La_Solubilidad](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Libro%3A_Quimica_General_(OpenSTAX)/11%3A_Las_soluciones_y_los_coloides/11.3%3A_La_Solubilidad)
62. Otras unidades para las concentraciones de las soluciones - química 2ED | OpenStax. (s. f.). <https://openstax.org/books/qu%C3%ADmica-2ed/pages/3-4-otras-unidades-para-las-concentraciones-de-las-soluciones>
63. Wayback Machine. (s. f.). http://web.archive.org/web/20170701143915/https://www.usna.edu/Users/physics/vanhoy/_files/SP425/LabDocs/Ocean%20Optics%202000/SpectraSuite/070131_1347%20R/documentation/Spectrometers%20and%20Software/QE65000.pdf
64. Raman Probes | Ocean Insight. (s. f.). <https://www.oceaninsight.com/products/fibers-and-probes/probes/raman-probes/>
65. Hu, H., Bai, J., Xia, G., Zhang, W., & Ma, Y. (2018). Improved baseline correction method based on polynomial fitting for Raman spectroscopy. Photonic Sensors, 8(4), 332-340. <https://doi.org/10.1007/s13320-018-0512-y>
66. Chavarría-Lizárraga HN (2019) Biological tissue mapping with Raman Spectroscopy. Master Thesis, National Institute of Astrophysics, Optics and Electronics.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

En este capítulo se explican los resultados obtenidos con las concentraciones de los cuatro biomarcadores. De igual manera, se muestra el espectro Raman para cada biomarcador y se realiza un PCA para separar las diferentes concentraciones mediante su espectro o las bandas espectrales dominantes.

4.1 CONCENTRACIONES DE LOS BIOMARCADORES

Como se mencionó en el capítulo anterior de este trabajo, los biomarcadores albumina, lactoferrina, glucosa y lisozima se obtuvieron de forma 100% natural, los cuales fueron adquiridos de la empresa SIGMA tal como se muestran en la figura 28.

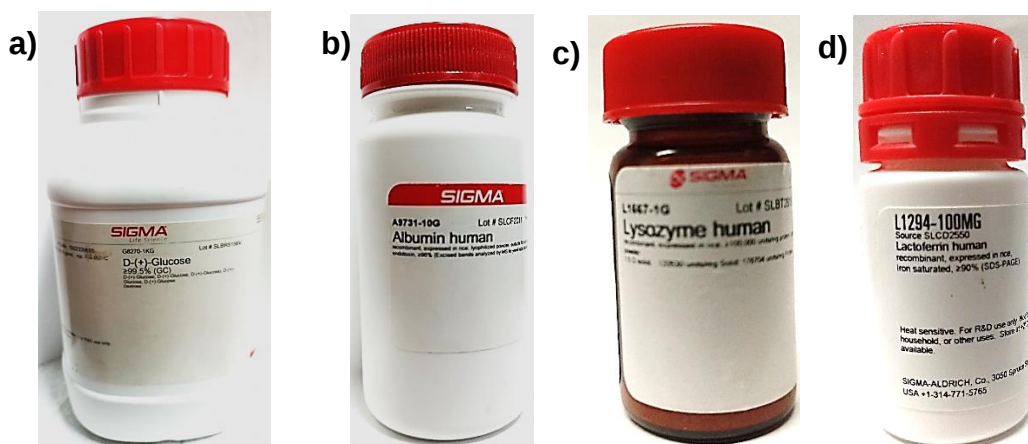


Figura 29 Biomarcadores 100% naturales en sus respectivos frascos a) glucosa, b) albumina, c) lisozima, d) lactoferrina

Una vez obtenidos los biomarcadores puros, se inicio el proceso de preparación de muestras con la fórmula de porcentaje masa volumen (Ecuación 3.3), de la cual se conoce el porcentaje de concentración y masa aproximada del soluto dentro de la lágrima, por lo que se calculó el volumen del solvente, hasta encontrar el que más se parece a una lágrima ($5-10 \mu\text{l}$) [24]. La tabla 11 muestra las diferentes concentraciones expresadas en porcentaje masa volumen y partes por millón preparadas para cada uno de los 4 biomarcadores de líquido lagrimal analizados.

Tabla 12 Resultados del volumen con cada biomarcador de acuerdo a sus partes por millón, utilizando 0.02 gramos de masa

PPM	% m/v	Masa	Volumen
10.000	1 %	0.02 g	2 ml
100.000	10 %	0.02 g	200 μ l
200.000	20 %	0.02 g	100 μ l
300.000	30 %	0.02 g	60 μ l
400.000	40 %	0.02 g	50 μ l
500.000	50 %	0.02 g	40 μ l

Después de haberse obtenido los valores correspondientes de volumen en cuanto a las concentraciones. Se hicieron disoluciones de cada biomarcador, en el cual el solvente utilizado fue agua destilada y el soluto fue cada uno de los biomarcadores puros. La muestra se colocó en un vaso de precipitados, la cual fue mezclada con un imán magnético que se hizo girar a 80 revoluciones por minuto (rpm) hasta obtener una muestra lo más homogénea posible (fig.30).

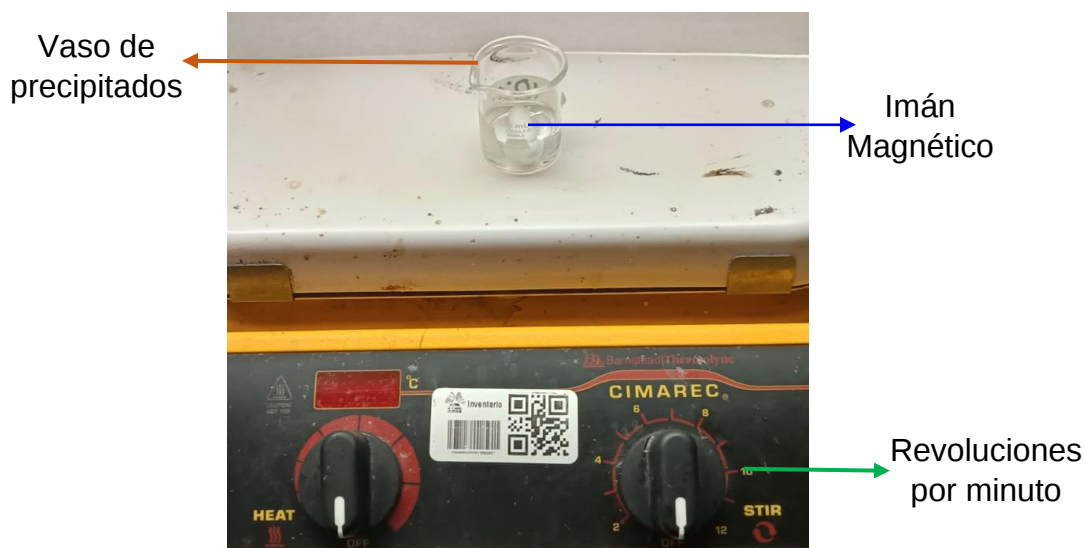


Figura 30 Vaso de precipitados con el imán magnético sobre la mezcladora

Posteriormente de haber logrado obtener la mezcla homogénea, la muestra se colocó en contenedores de cuarzo para su análisis en el espectrómetro Raman.

4.2 RESULTADOS DEL ESPECTRÓMETRO RAMAN

Dado que los valores de volumen y masa de las soluciones semejantes a la lágrima son pequeñas del orden de micro litros y miligramos, realizamos una escala de estos

valores en un factor de 10, es decir aumentamos 10 veces el tamaño de la masa y el volumen en proporción a lo obtenido en la literatura con respecto a los biomarcadores de la película lagrimal. Aunque se hizo este aumento en el volumen para el análisis Raman solo se ocupó el volumen de $10\ \mu\text{l}$, la cual se manipuló con una jeringa de insulina (fig. 30), ya que es la cantidad de lagrima que queremos analizar con el espectrómetro.

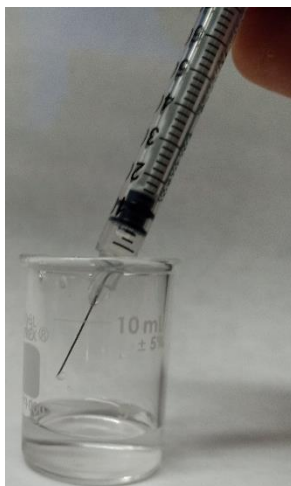


Figura 31 Toma del volumen cercano de la lagrima a una concentración de un biomarcador por medio de una jeringa de insulina de 100ul

Los $10\ \mu\text{l}$ por concentración de cada biomarcador se fueron colocando en un contenedor de cuarzo (fig.31), este se utilizó debido a que no genera ruido extra en la muestra.

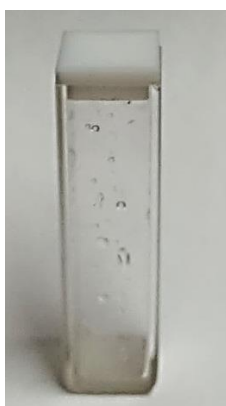


Figura 32 Contenedor de cuarzo transparente con la muestra

Justo después de colocar correctamente la muestra, se acomoda el contenedor debajo de la punta del espectrómetro Raman, dejando una distancia alrededor de 7

a 10 mm desde la muestra hasta la punta, que es la distancia ideal para obtener el análisis molecular del espectro.

Después de ajustar los parámetros anteriores entre la punta y la muestra, la muestra y el espectrómetro se aísla de radiaciones externas, colocándolo en un lugar oscuro (fig.32).



Figura 33 Láser en contacto con la muestra

Posterior a la colocación de la muestra, se debe calibrar el espectrómetro Raman en el software Spectra Suite a un rango de -5 a 5 de intensidad, con un tiempo de exposición de 8 segundos, boxcar de 2 y exploraciones promedio de 6, el láser de excitación con una longitud de onda de 785 nm, el cual se dejó con una potencia de 200 mW, que es una potencia suficiente para hacer vibrar las moléculas de las disoluciones y registrar el espectro Raman.

Cabe mencionar que para llegar a los parámetros ideales que se mencionan en el párrafo anterior, se realizaron diferentes tipos de pruebas, tanto en la cantidad de lagrima necesaria para la detección de las vibraciones moleculares comenzando con el mínimo de 5 μ l, así como de la potencia necesaria, el tiempo de integración, los boxcar y las exploraciones promedio que nos ayudaran a mantener la muestra y nos permitiera tomar más de 10 espectros por concentración. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 33, en el cual se maneja un volumen de 5 μ l y la potencia se fue cambiando para evitar la evaporación de la lágrima sintética y podemos observar que al disminuir la potencia el ruido se hace más presente en cada uno de los

espectros, de igual manera se puede notar la disminución de intensidad en sus bandas espectrales debido a la disminución de energía que provoca que las vibraciones moleculares disminuyen de igual manera.

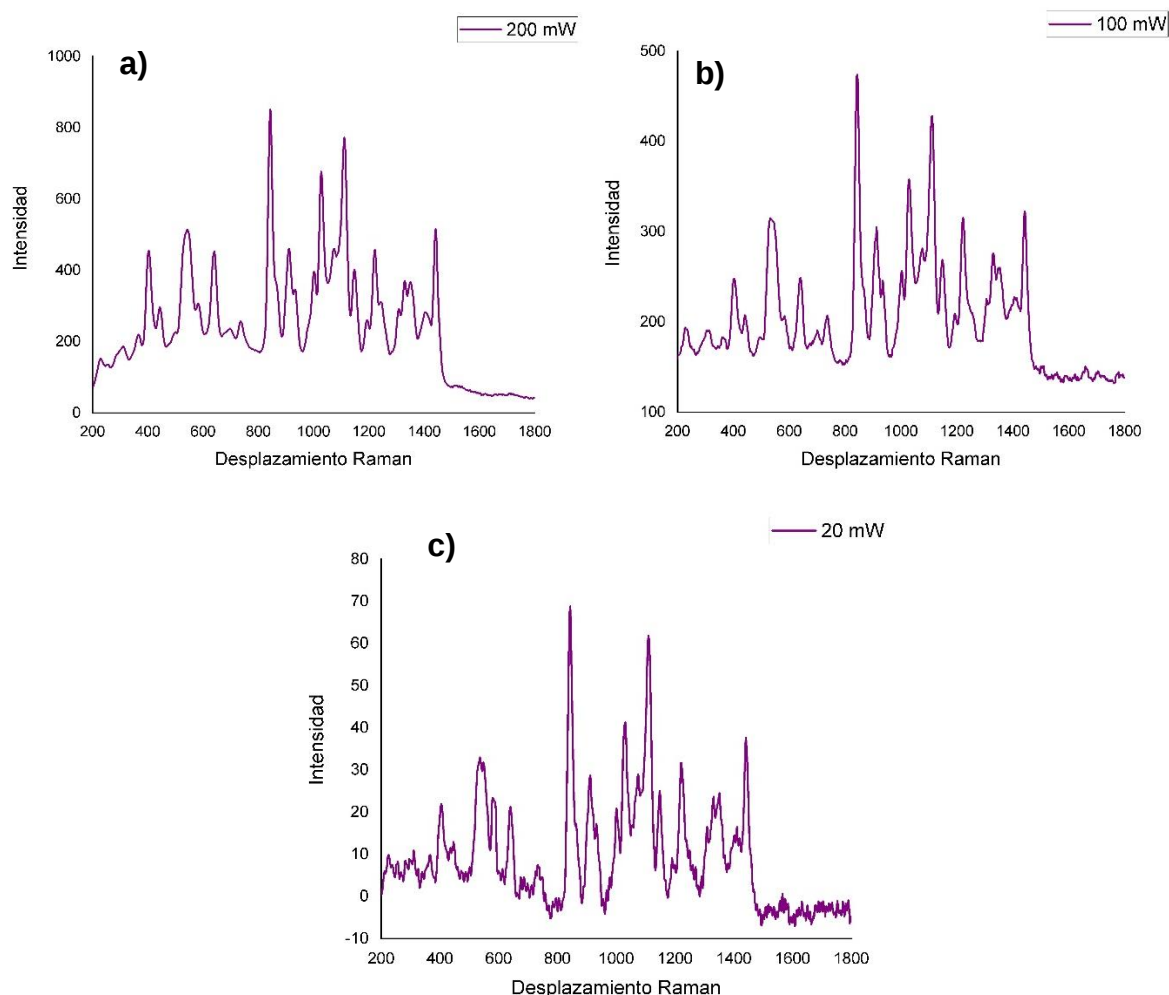


Figura 34 Espectros tomados con diferente potencia, a) 200 mW, b) 100 mW, c) 20 mW, con el mismo tiempo de integración de 8 segundos el boxcar de 1 y las exploraciones promedio de 3, teniendo la misma distancia del láser a la muestra

Al observar el comportamiento de las sustancias al disminuir la potencia, otra prueba que se realizó, fue mantener la potencia y cambiar el tiempo de integración, este se fue aumentando de los 8 segundos como mínimo hasta los 12 segundos como máximo para obtener el espectro bien definido, de igual manera al hacerlo, solo se tenía tiempo de conseguir 12 espectros en un tiempo más extenso que abarcaba hasta los 144 segundos, tal como se muestra en el ejemplo de la figura 34. En este podemos observar que al ir aumentando el tiempo de integración la intensidad

también a aumentando a pesar de tener la misma potencia, es decir que si incrementa el tiempo incrementa la señal vibracional.

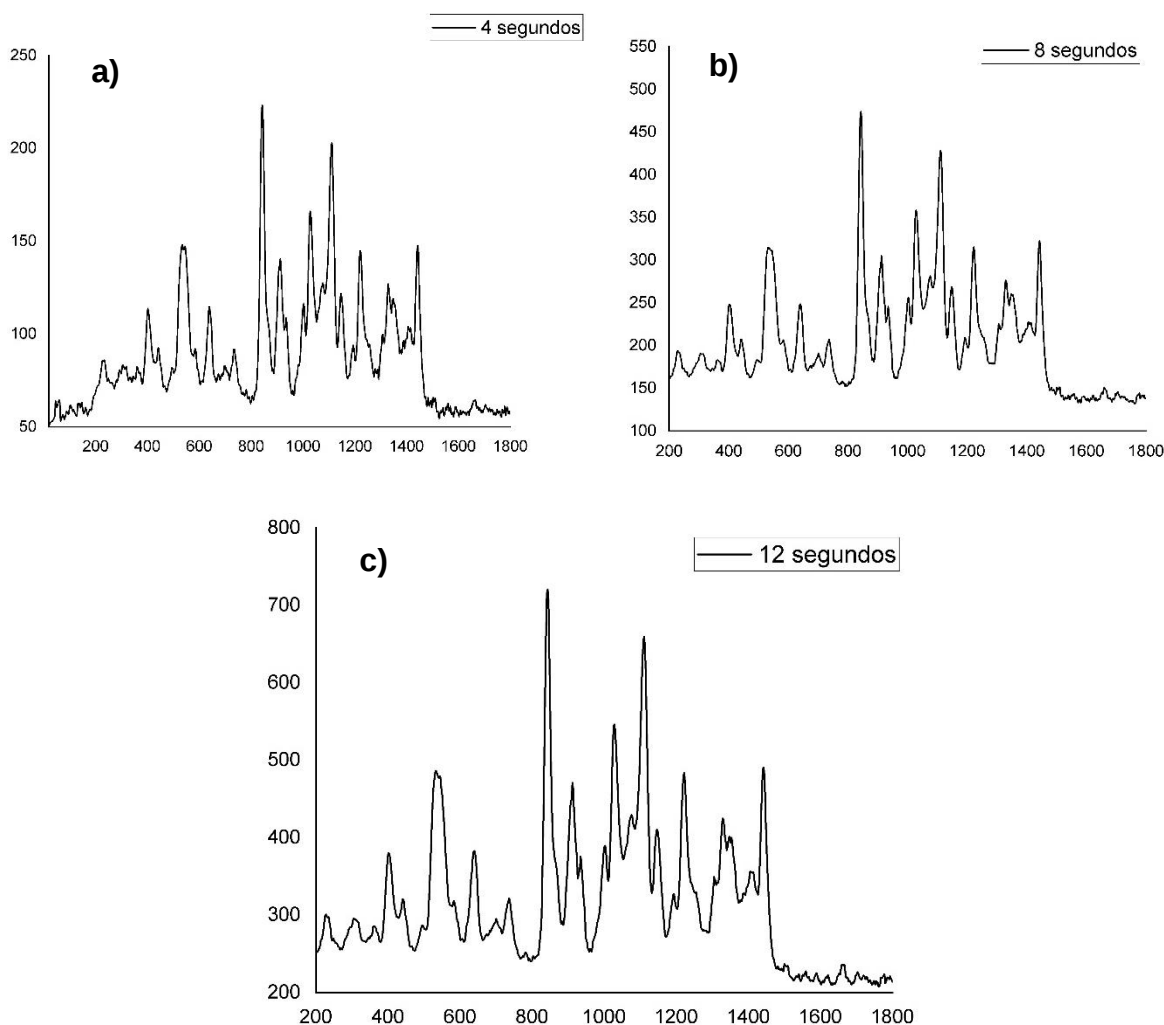


Figura 35 Espectros tomado con una potencia de 100 mW y con tiempos de integración diferentes, a) 4 segundos, b) 8 segundos, c) 12 segundos, teniendo un boxcar de 1, exploraciones promedio de 3 y teniendo la misma distancia de láser a la muestra

Después de realizar las pruebas necesarias, los resultados obtenidos fueron tener 10 μl de lagrime como mínimo, un tiempo de exposición de 8 segundos, boxcar de 2 y exploraciones promedio de 6, con una potencia de 200 mW, que al final dejaba tomar los 12 espectros por concentración, pero que se conseguían en menos de la mitad del tiempo que con las otras pruebas, es decir que de 144 segundos para obtener los espectros, simplemente se pasó a 96 segundos en cada concentración de los biomarcadores.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOMARCADORES LAGRIMALES

En esta sección se presentan los espectros de cada biomarcador puro, con fluorescencia antes de ser suavizados y filtrados, es decir en espectro crudo el cual muestra algunos de sus picos más intensos a simple vista (figura 35). Lo que nos permitió obtener los grupos funcionales de cada uno de los biomarcadores en diferentes desplazamiento Raman e intensidad.

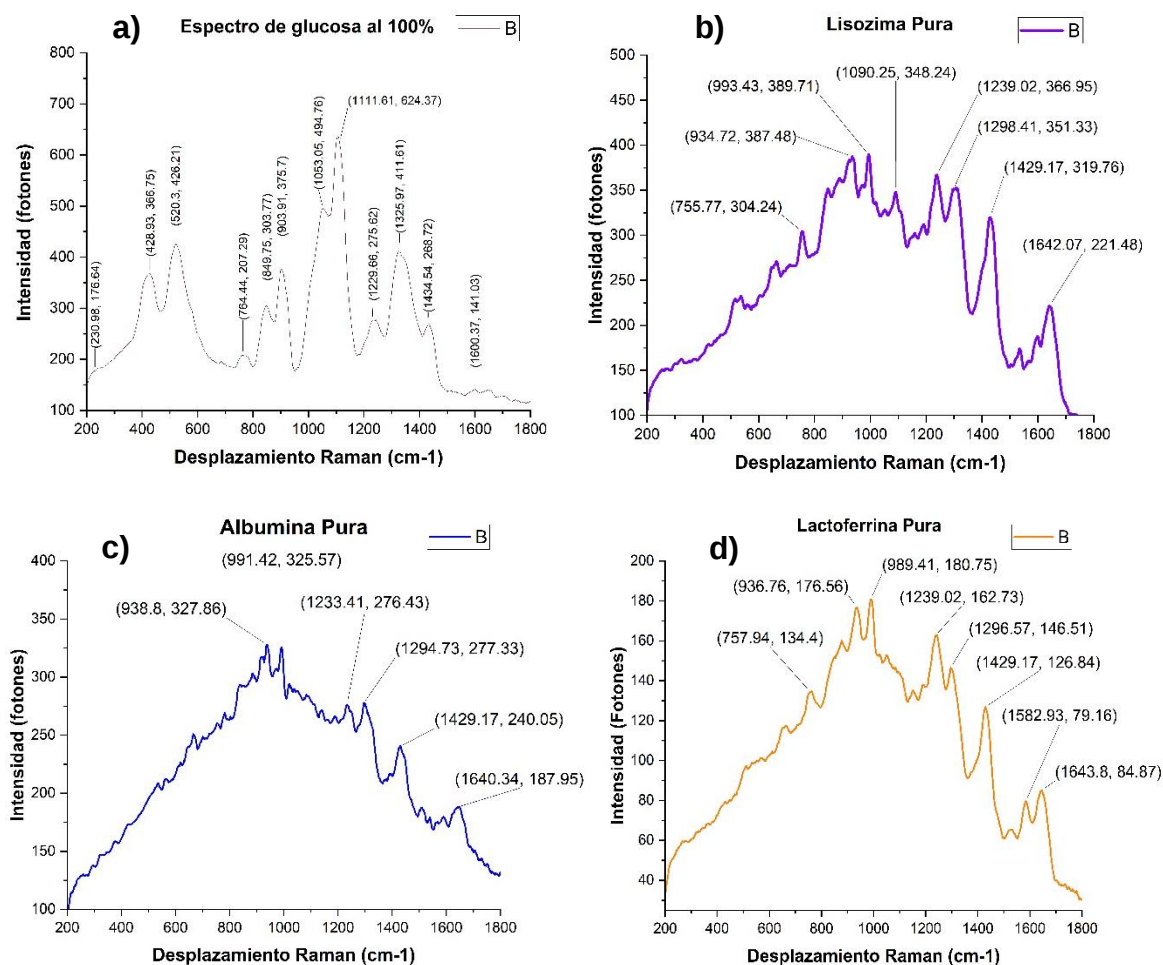


Figura 36 Espectros crudos de los biomarcadores lagrimales puros, indicando los picos más intensos que se pueden observar a simple vista, a) glucosa, b) lisozima, c) albumina, d) lactoferrina

Teniendo el espectro de cada uno de los biomarcadores, el siguiente paso fue utilizar el programa de Matlab, el cual realiza el suavizado, filtrado y normalizado de cada espectro, por medio de los mínimos cuadrados, con la finalidad de hacer más visibles los picos importantes, además de hacer más fácil su lectura, tal como se muestran los espectros procesados de la lactoferrina desde un espectro crudo hasta

uno suavizado y normalizado (fig.36). Nos permitió observar con mejor claridad los grupos funcionales con mayor enlace molecular de acuerdo a su intensidad, desplazamiento Raman y su forma.

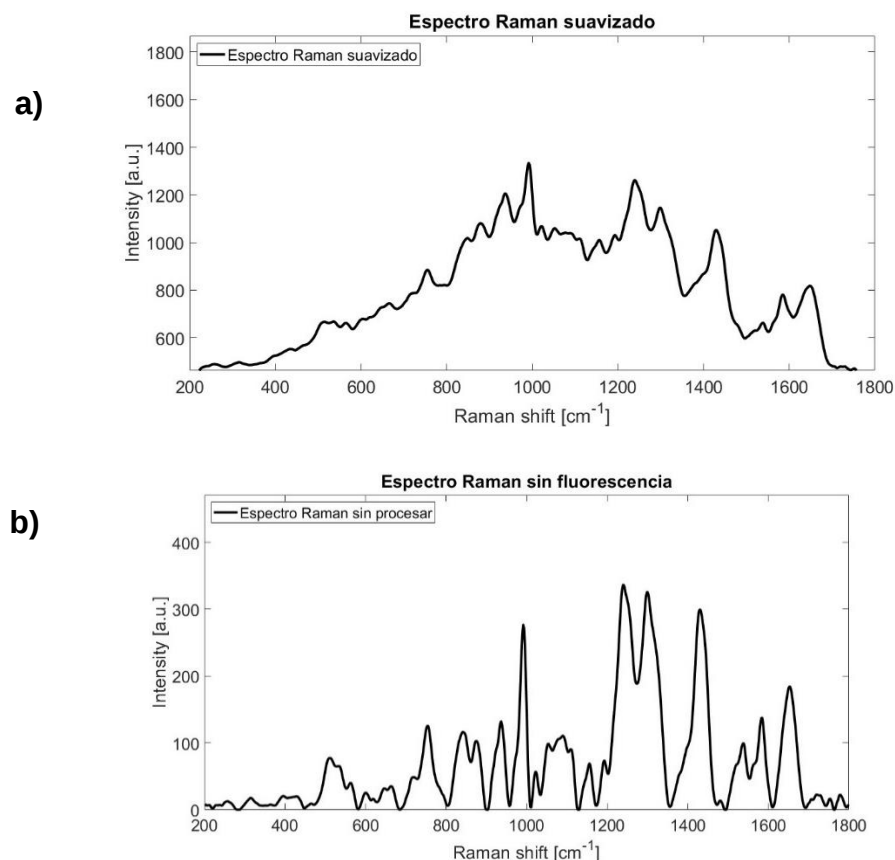


Figura 37 Proceso del programa de Matlab para los espectros a) espectro suavizado, b) espectro sin fluorescencia

Una vez comprendido el programa de Matlab, el siguiente paso con cada uno de los biomarcadores fue obtener los espectros Raman para las disoluciones en concentraciones de 20%, 10%, 5%, 4%, 2% y 1%. Con la finalidad de observar la tendencia de los picos, además de visualizar el cambio de intensidad que van teniendo cada uno sin desaparecer, es decir que pueden alcanzarse a percibir a pesar de que el solvente es más alto que el soluto, poniendo como ejemplos a la sustancias de glucosa y albumina para entender mejor lo que se realizó. De igual manera se muestran los espectros suavizados y filtrados (fig. 37-38) después de pasar por el programa de Matlab obteniendo todos las concentraciones en conjunto

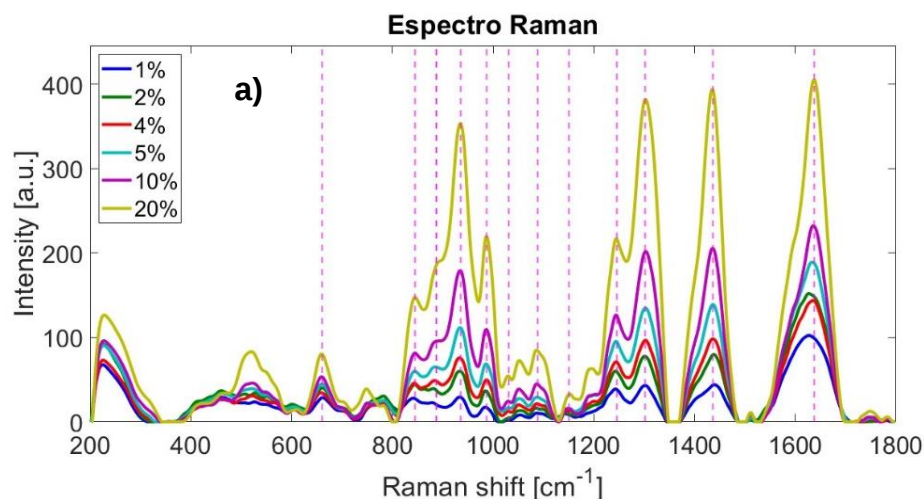


Figura 38 Espectros suavizados y filtrados de las concentraciones del 20%, 10%, 5%, 4%, 2%, 1% de los biomarcadores de albumina, mostrando la tendencia en el desplazamiento Raman de sus picos.

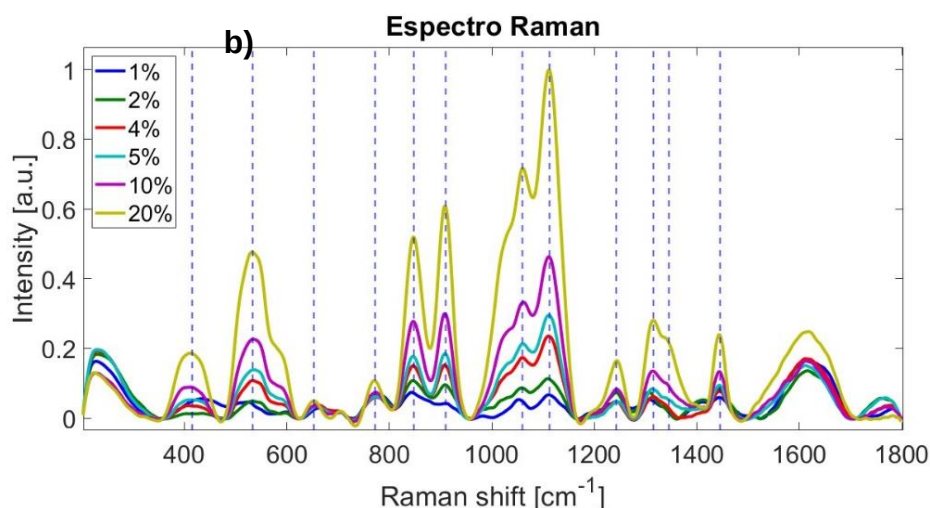


Figura 39 Espectros suavizados y filtrados de las concentraciones del 20%, 10%, 5%, 4%, 2%, 1% de los biomarcadores de glucosa

Dado que se pudieron encontrar las tendencias entre picos e intensidades, el siguiente paso es comparar la ubicación de los picos junto el de los enlaces químicos de cada biomarcador, con los que se encontraron en la lectura y los cuales se presentan en la tabla 12.

Tabla 13 Ubicación de bandas principales respecto a su desplazamiento Raman de cada biomarcador

Literatura (Dinagari et al. 2012)	Albumina Raman	Enlaces
667	663	v(Cs)
828	837	Tyr
940	936	v(CC)
1131	1125	v(CC)
1189	1179	v(CN)
1447	1439	δ (CH ₂)
1584	1577	Phe
1605	1605	Phe
1616	1614	Tyr
1655	1665	Amide I

Literatura (Castellanos et al., 2020)	Glucosa Raman	Enlaces
425	421	S (C ₂ -C ₁ -O ₁)
608	604	v(C-C)
779	777	v(C-C)
843	843	δ (COH)
916	906	δ (CCH)
1109	1111	C-O-C
1225	1227	δ (CCH)
1297	1307	δ (CH ₂)
1332	1336	δ (CH ₂)
1406	1407	δ (CH ₂ OH)

Literatura (Carpentier et al., 2010)	Lisozima Raman	Enlaces
509	510	v(S-S)
529	534	Trp
577	567	Trp
603	610	Phe
661	663	v(C-S)
700	705	V(C-S)
761	755	Trp
879	876	Trp
936	930	v(C-C)
1014	1021	Trp
1198	1191	Tyr and Phe
1240	1240	Amide III
1304	1312	Trp
1432	1432	N-H

Literatura (Ainscough et al., 1980)	Lactoferrina Raman	Enlaces
521	513	c-Si
939	936	SiO ₂
1005	995	Phe
1247	1247	Amide III
1290	1300	Trp
1447	1437	δ CH ₂
1500	1510	Tyr
1575	1585	Trp
1657	1654	Amide I

Cabe mencionar que de acuerdo con la literatura los picos que se obtienen de las muestras, pueden tener un desplazamiento considerado de ± 10 para que sean tomados en cuenta en comparación con el espectro que obtuvo al realizarse el estudio de los biomarcadores. Después de filtrar los espectros, el obtener las banda espectrales, nos ayudó a encontrar una comparación de diferentes enlaces de acuerdo al desplazamiento Raman de cada biomarcador.

4.4 CLASIFICACIÓN A TRAVEZ DEL PCA

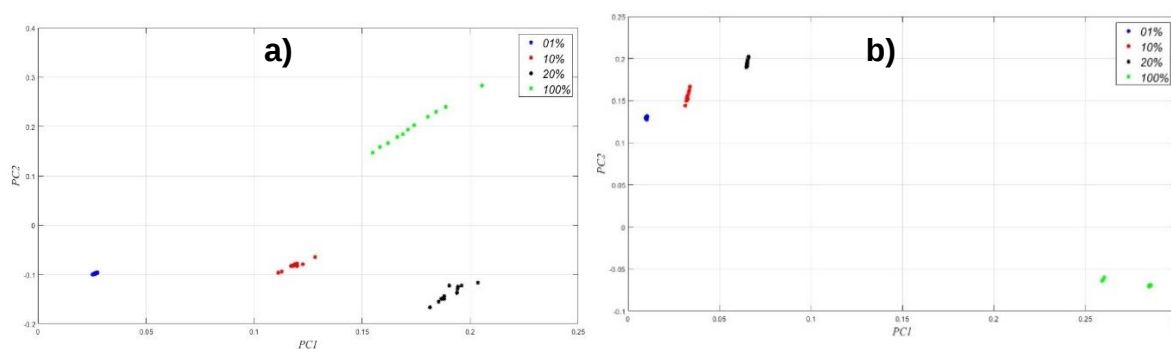
Luego de encontrar los enlaces funcionales de cada uno de los biomarcadores, se realizó el proceso, para el análisis estadístico, además de presentar los gráficos obtenido de toda la experimentación adquirida.

En esta primera sesión se presentarán los 12 espectros de cada uno de los biomarcadores sin estar procesados, es decir antes sin quitar la fluorescencia que cada espectro tuvo durante la toma de la muestra.

4.4.1 PCA DE LOS ESPECTROS NO PROCESADOS

Se tomaron los 4 biomarcadores, de cada concentración se obtuvieron 12 espectros, cada uno de los espectros dio una longitud de onda e intensidades para realizar la matriz que nos ayudó a procesar los datos, se tomó la longitud de onda de los 12 espectros obtenidos por cada concentración, en este caso se presentaran las de 100, 20, 10, 1 por ciento ya que así se podrán visualizar mejor los resultados de cada uno.

Una vez obtenidos todos los espectros de cada muestra, se prosigue a analizarlos con un código en el software de Matlab (apéndice A), con la finalidad de obtener las gráficas con los nuevos componentes. Teniendo los resultados que se presentan a continuación:



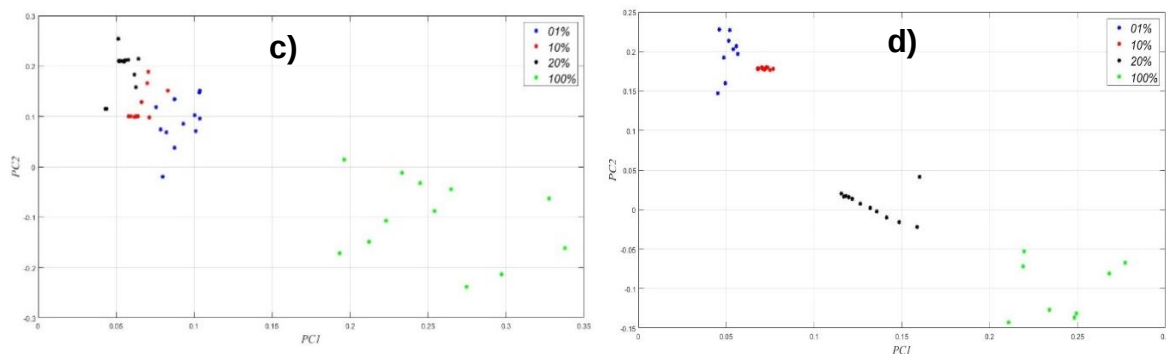
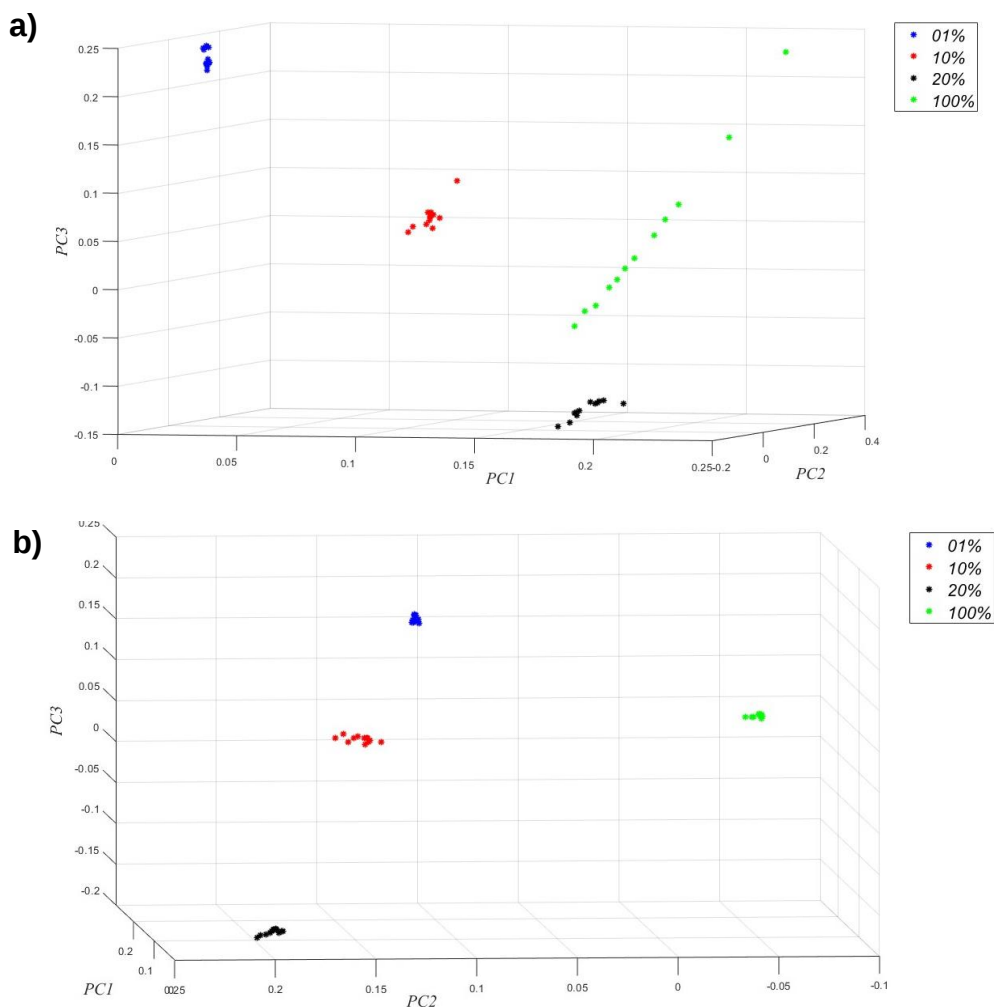


Figura 40 Resultado del ACP en 2D de los cuatro biomarcadores, a)albumina, b)glucosa, c)lactoferrina, d) lisozima

De igual manera se obtuvieron resultados en 3 dimensiones antes de ser procesados por el programa de filtrado, que nos permitió observar la separación en la que se encuentra cada una de las concentraciones por biomarcador.



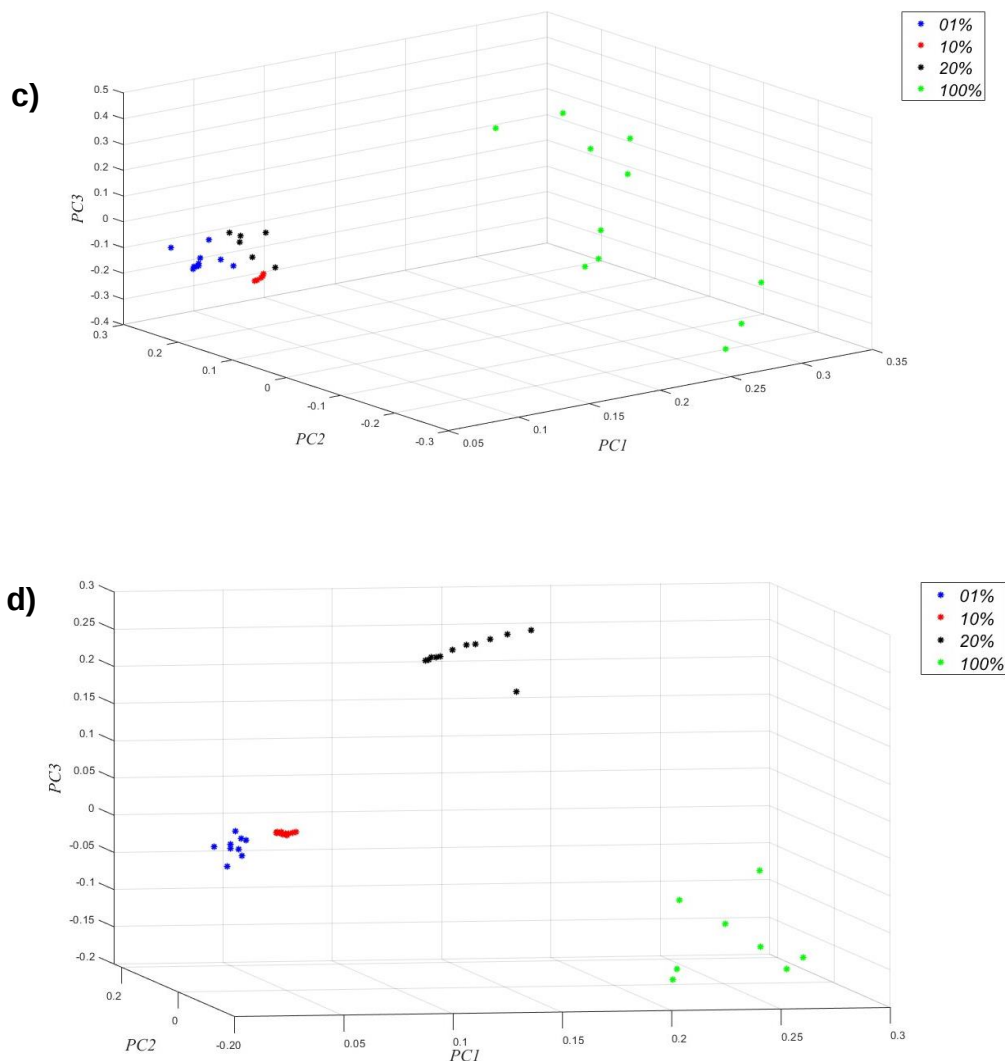


Figura 41 Resultados en 3 dimensiones del ACP con la concentraciones de 100%, 20%,10%,1%, de los 4 biomarcadores a) albumina, b) glucosa, c) lactoferrina, d) lisozima

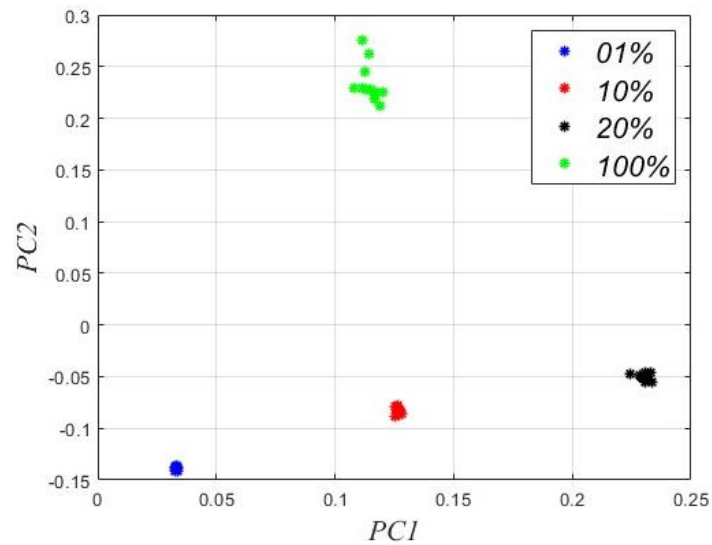
De esta manera podemos observar cómo se colocan las concentraciones por regiones dentro de las diferentes dimensiones a pesar de no ser espectros procesados, tomando en cuenta las características de los porcentajes de 100%, 20%, 10% y 1%, como la intensidad en promedio de cada una de ellas, agrupándolas en un solo sector en específico.

4.4.2 RESULTADO DEL ACP CON ESPECTROS PROCESADOS

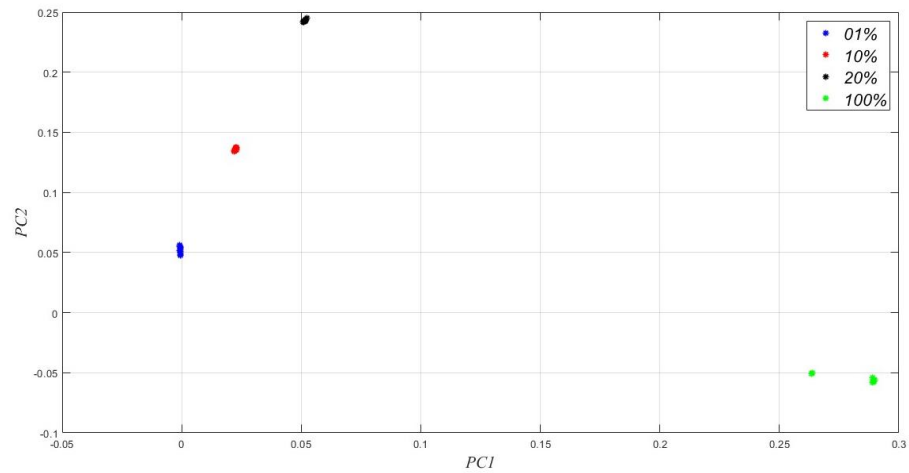
Debido a la fluorescencia que los espectros tomados tenían, llegan a colocarse demasiado separado uno de otros, los que nos podría dar a entender que el análisis

estaría mal, por esta razón se decidió realizar el ajuste de curvas y reducir esta fluorescencia, quedando los resultados de la siguiente manera:

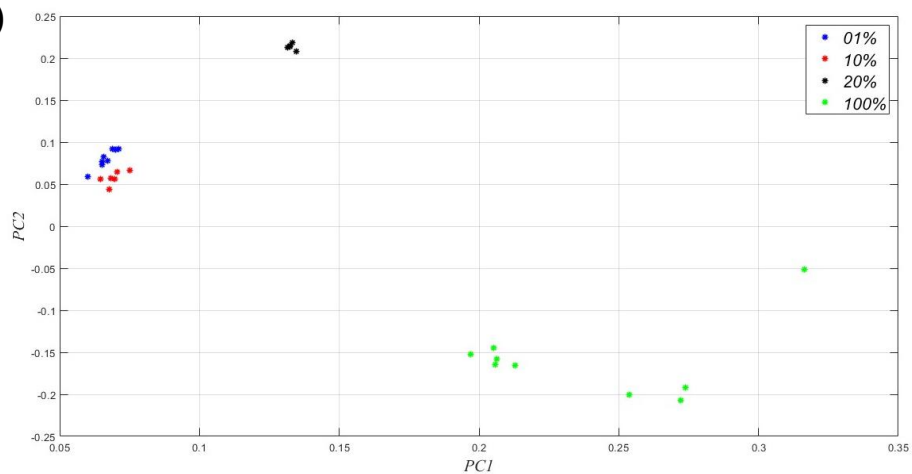
a)



b)



c)



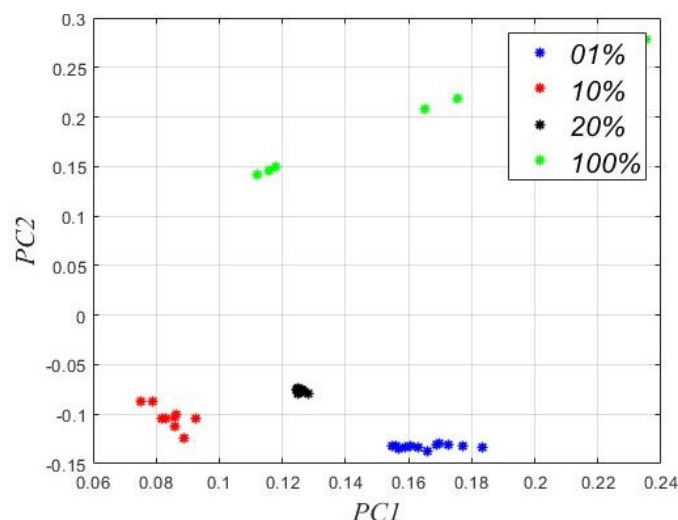


Figura 42 Resultados en 2 dimensiones de los espectros procesados de las concentraciones al 100%, 20%, 10%, 1% de los biomarcadores a) albumina, b) glucosa, c) lactoferrina, d) lisozima

Al igual que en los resultados de los espectros no procesados, en estos también se hicieron los de 3 dimensiones para observar mejor el agrupamiento de los espectros en una región.

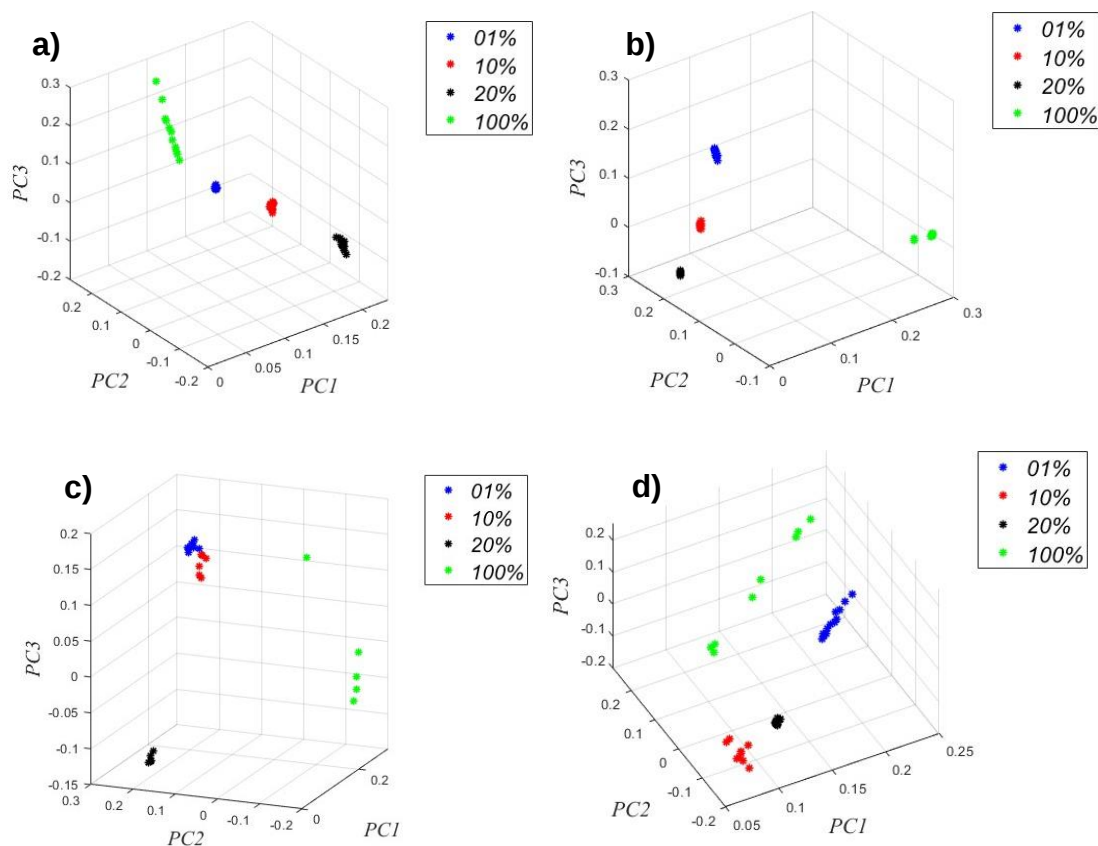


Figura 43 Resultados en 3 dimensiones de ACP en las concentraciones de 100%, 20%, 10%, 1% de a) albumina, b) glucosa, c) lactoferrina, d) lisozima

Como podemos observar con los espectros procesados (fig.42), se nota una mejor región y agrupación de ellos en cada uno de los biomarcadores, que con los espectros no procesados (fig.41), lo que facilita la comparación entre ellos, de igual manera se considera realizar mejores concentraciones con mayor cantidad de biomarcadores que nos ayuden a obtener resultados más satisfactorios, ya que en algunos biomarcadores las regiones están colocadas las características de cada concentración pueden llegar a confundirse.

4.5 ESTUDIO PREVIO LAGRIMAL IN VIVO

En este estudio previo se comparó los espectros obtenidos de lágrimas sintéticas con espectros de lágrimas extraídas *in vivo* de 10 voluntarios aleatorios, es decir que podían tener una patología en específico o no, en este estudio previo se obtuvieron 6 voluntarios sanos y 4 con diabetes mellitus tipo 2.

Las lágrimas in vivo fueron obtenidas por medio de un capilar sin heparina que cuentan con un diámetro interno de 0.5mm y de largo con 100mm (fig.43). Esta técnica es el método que nos permite recuperar el mayor volumen sin irritar la superficie ocular, además está reconocida desde los años 80 (Jones et al., 1997).



Figura 44 Capilares de vidrio utilizados para obtener lagrima in vivo

Una vez obtenidas las lágrimas se colocaron en el espectrómetro Raman donde se encontraron las bandas espectrales más intensas para los biomarcadores (albumina y glucosa) relacionados con la diabetes mellitus tipo 2.

Para obtener estos datos se llevó a cabo dos tipos de comparaciones, la primera fue para ubicar los desplazamientos Raman que tenían las bandas espectrales, como se muestra en la tabla 13. Donde se encontró que hay más de 7 bandas

espectrales que coinciden con las de la literatura encontrada, dándonos un resultado favorable al encontrar los biomarcadores en la lágrima *in vivo*.

Tabla 14 Comparación de bandas espectrales de los biomarcadores de albumina y glucosa con la lagrima de un paciente

Albumina	P _x	Glucosa	P _x
667	665	608	604
828	828	779	783
940	938	843	843
1089	1082	916	914
1125	1130	1109	1111
1447	1450	1225	1235
1584	1579	1406	1409
1605	1610		
1616	1622		
1655	1657		

El segundo método fue evaluar los espectros obtenidos de cada biomarcador con la forma de lágrima *in vivo*, es decir que se trabajó observando los espectros filtrados de cada biomarcador con el de la lágrima *in vivo*. Se obtuvieron resultados de igual manera favorables, ya que pudimos comparar ciertas formas de los espectros obtenidas e identificarlos por cada biomarcador, lo que nos indica que se pueden encontrar en un paciente sano.

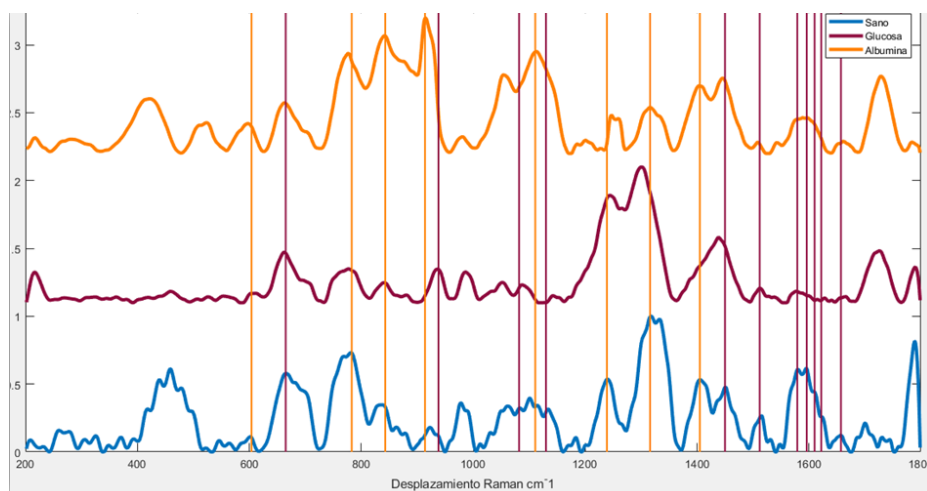


Figura 45 Comparación de espectros de un paciente Sano (azul) con los de glucosa (vino) y albumina (amarilla)

DISCUSIÓN

De acuerdo al estudio de 2008 realizado en Reino Unido con lagrimeado en el que fueron utilizadas diferentes técnicas de espectroscopia Raman en el que se tuvieron 3 voluntarios para el análisis de la lagrimeado, se tuvo que realizar una preparación especial para cada muestra. Sin embargo, en esta tesis se descubrió que no es necesario realizar algún tipo de preparación en la muestra lagrimal antes de colocarla en el espectrómetro, además de que se puede conseguir la lágrima completamente basal, lo que permitió encontrar los parámetros y volumen necesario para obtener las vibraciones moleculares.

De igual manera en 2020 y en 2013 se realizaron estudios con los biomarcadores de albumina y lactoferrina que están relacionados con diferentes enfermedades del organismo y del ojo, fueron estudiadas con sustancias completamente puras y analizadas con espectroscopia Raman, es decir que no se maneja con algún tipo de concentración como lo realizamos en esta tesis en la que podemos observar la disminución de intensidad en los picos pero prevaleciendo en su desplazamiento Raman. Lo que nos llevó a obtener resultados favorables con la espectroscopia Raman, los espectros individuales que se obtuvieron por cada concentración de los biomarcadores, nos ayudaron a conocer como trabajaban al estar mezclado con el agua, ya que esto último es lo que más se encuentra en la lágrima.

Además de mencionar que la técnica más común que se utiliza para la detección de diabetes es por medio de la extracción de sangre y es de forma invasiva, mientras que para la obtención de lagrimeado es mínimamente invasiva y presenta un riesgo mínimo para el personal de salud, en cuanto a con microorganismos de transmisión, como son los virus de la hepatitis B y C y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

De esta manera los resultados obtenidos, encontraron que los biomarcadores seleccionados de albumina y glucosa, asimismo la técnica de obtención de lagrimeado, desempeñaron un rol importante y significativo para la detección de ciertas

enfermedades, no solo oculares sino también aquellas que puedan estar afectando a todo el sistema inmune.

CONCLUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en cada una de las concentraciones con su respectivo espectro procesado y analizado, además de presentar una pequeña prueba de ensayo para detección de grupos funcionales de los biomarcadores de la lagrima in vivo. De igual manera dando una pequeña discusión comparativa con lo encontrado en la literatura presentada en capítulos anteriores.

Referencias

67. Dingari, N. C., Horowitz, G. T., Kang, J. W., Dasari, R. R., & Barman, I. (2012). Raman Spectroscopy Provides a Powerful Diagnostic Tool for Accurate Determination of Albumin Glycation. PLOS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406>
68. Castellanos, Y., & Galindo, C. (2020). ANÁLISIS DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA DETECCIÓN DE LA DIABETES [Tesis de Grado para el título de ingeniero en electronia]. Universidad Catolica de Colombia.
69. Ainscough, E. W., Brodie, A. M., Plowman, J. E., Bloor, S. J., Loehr, J. S., & Loehr, T. M. (1980). Studies on human lactoferrin by electron paramagnetic resonance, fluorescence, and resonance Raman spectroscopy. Biochemistry, 19(17), 4072-4079. <https://doi.org/10.1021/bi00558a026>
70. Carpentier, P., Royant, A., Weik, M., & Bourgeois, D. (2010). Raman-Assisted Crystallography Suggests a Mechanism of X-Ray-Induced Disulfide Radical Formation and Reparation. Structure, 18(11), 1410-1419. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.010>

CONCLUSIÓN A LA TESIS

La metodología desarrollada y los experimentos realizados nos permiten contribuir en el estado del arte con los objetivos y preguntas de investigación que se plantearon al principio de esta tesis. Se concluye que con el espectrómetro Raman logramos conocer las bandas espectrales de cada biomarcador lagrimal importante para el diagnóstico de cierto tipo de enfermedades oculares: albumina, glucosa, lactoferrina y lisozima.

Hemos contribuido con una metodología no encontrada en la literatura para obtener bandas Raman de emisión de cada biomarcador lagrimal albumina, glucosa, lactoferrina y lisozima, en pequeñas concentraciones al nivel de una lagrime real humana.

Desarrollamos un método experimental apoyado en Matlab que nos permite discriminar entre ruido y señal Raman de los biomarcadores empleados albumina, glucosa, lactoferrina y lisozima.

Desarrollamos una metodología basada en el análisis de componentes principales para clasificar diferentes concentraciones de cada uno de los biomarcadores analizados.

Se desarrollo un estudio previo que permitirá detectar la presencia de los biomarcadores analizados en una lagrime real en pacientes diabéticos.

TRABAJO A FUTURO

Encontrar las bandas espectrales de cada uno de los biomarcadores en la película lagrimal in vivo. Discriminar apropiadamente las concentraciones de cada biomarcador presente en una película lagrimal.

En un futuro próximo los biomarcadores analizados serán empleados para el diagnóstico de cierto tipo de enfermedades oculares: albumina, glucosa, lactoferrina y lisozima. Entre las inmediatas diabetes y ojo seco.

Realizar un estudio clínico en paciente con diabetes y ojo seco.

GLOSARIO

AAO: American Academy of Ophthalmology

ACP: Análisis de Componentes Principales

COESPO: Consejo Estatal de Población

GIOB: Grupo de Instrumentación y Óptica Biomédica

INEGI: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática

ml: mililitros

NECL: Biosensor en lententes de contacto

NIH: National Institute of Health

nm: nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

rpm: revoluciones por minuto

SSA: Secretaria de Salud

SDS: Electroforesis en gel

UFL: Unidad Funcional Lagrimal

μl: microlitros

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Anatomía del ojo humano.....	18
Figura 2 Parte expuesta del globo ocular	18
Figura 3 Anatomía externa del ojo.....	19
Figura 4 Sistema lagrimal.....	20
Figura 5 Película lagrimal.....	20
Figura 6 Glándulas de Meibomio	21
Figura 7 Fórmula química de los biomarcadores	24
Figura 8 Diagrama de Jablonski que representa transiciones de energía cuántica para el esparcimiento de Rayleigh y Raman.....	27
Figura 9 Vibraciones moleculares al contacto con la luz	28
Figura 10 Tipos de vibración molecular	29
Figura 11 Tipos de ruidos en el espectro Raman	32
Figura 12 Muestra de datos originales del ejemplo ACP	35
Figura 13 Muestra de datos originales del ejemplo ACP	36
Figura 14 Gráfica de los datos normalizados con los eigenvectores (media restada)	37
Figura 15 Gráfica de los componentes 1 y 2 del nuevo conjunto de datos	37
Figura 16 Componentes del espectrómetro Ocean Optics®, a) vista exterior del espectrómetro, b) componentes internos del espectrómetro. Tomadas de: Manual de Ocean Optics.....	46
Figura 17 Punta de prueba del espectrómetro Raman.	47
Figura 18 Esquemático que muestra la partes en las que se ensambla el espectrómetro Raman.....	48
Figura 19 Vista previa de la interfaz del programa Spectra Suite	49
Figura 20 Áreas principales del programa Spectra Suite, 1) Top menú, 2) Barra de herramientas, 3) Panel de fuentes de datos, 4) Visualización de datos, 5) Área grafica ...	49
Figura 21 Área de panel de fuentes y de visualización de datos, a) área del panel, b) visualización de datos eliminar o describir qué funciones tiene.	50
Figura 22 Barra de Herramientas, tiempo de integración, exploraciones promedio, boxcar y el control de adquisición.	50
Figura 23 Ventana para guardar y almacenar los espectros obtenidos de la muestra.....	51
Figura 24 Área de gráficas, son importantes durante la toma de los espectros	51
Figura 25 Ejemplo del ajuste de curva con mínimos cuadrados para disminuir la fluorescencia del espectro aplicando ecuaciones de a) primer grado, b) cuarto grado, c) octavo grado.....	53
Figura 26 Ajuste de curva polinomial con el programa de Matlab del espectro obtenido ..	53
Figura 27 Ejemplo del ajuste de altura que hace el software de MATLAB®, para restar la fluorescencia	54
Figura 28 Espectro Raman sin fluorescencia	54
Figura 29 Biomarcadores 100% naturales en sus respectivos frascos a) glucosa, b) albumina, c) lisozima, d)lactoferrina.....	57
Figura 30 Vaso de precipitados con el imán magnético sobre la mezcladora.....	58
Figura 31 Toma del volumen cercano de la lagrima a una concentración de un biomarcador por medio de una jeringa de insulina de 100ul.....	59
Figura 32 Contenedor de cuarzo transparente con la muestra.....	59

Figura 33 Láser en contacto con la muestra.....	60
Figura 34 Espectros tomados con diferente potencia, a) 200 mW, b) 100 mW, c) 20 mW, con el mismo tiempo de integración de 8 segundos el boxcar de 1 y las exploraciones promedio de 3, teniendo la misma distancia del láser a la muestra.....	61
Figura 35 Espectros tomado con una potencia de 100 mW y con tiempos de integración diferentes, a) 4 segundos, b) 8 segundos, c) 12 segundos, teniendo un boxcar de 1, exploraciones promedio de 3 y teniendo la misma distancia de láser a la muestra.....	62
Figura 36 Espectros crudos de los biomarcadores lagrimales puros, indicando los picos más intensos que se pueden observar a simple vista, a) glucosa, b) lisozima, c)albumina, d)lactoferrina	63
Figura 37 Proceso del programa de Matlab para los espectros a) espectro suavizado, b) espectro sin fluorescencia.....	64
Figura 38 Espectros suavizados y filtrados de las concentraciones del 20%, 10%, 5%, 4%, 2%, 1% de los biomarcadores de albumina, mostrando la tendencia en el desplazamiento Raman de sus picos.	65
Figura 39 Espectros suavizados y filtrados de las concentraciones del 20%, 10%, 5%, 4%, 2%, 1% de los biomarcadores de glucosa	65
Figura 40 Resultado del ACP en 2D de los cuatro biomarcadores, a)albumina, b)glucosa, c)lactoferrina, d) lisozima	68
Figura 41 Resultados en 3 dimensiones del ACP con la concentraciones de 100%, 20%,10%,1%, de los 4 biomarcadores a) albumina, b) glucosa, c) lactoferrina, d) lisozima	69
Figura 42 Resultados en 2 dimensiones de los espectros procesados de las concentraciones al 100%, 20%, 10%, 1% de los biomarcadores a) albumina, b)glucosa, c) lactoferrina, d) lisozima.....	71
Figura 43 Resultados en 3 dimensiones de ACP en las concentraciones de 100%, 20% 10% 1% de a) albumina, b) glucosa, c) lactoferrina, d) lisozima	71
Figura 44 Capilares de vidrio utilizados para obtener lagrima in vivo.....	72
Figura 45 Comparación de espectros de un paciente Sano (azul) con los de glucosa (vino) y albumina (amarilla).....	73

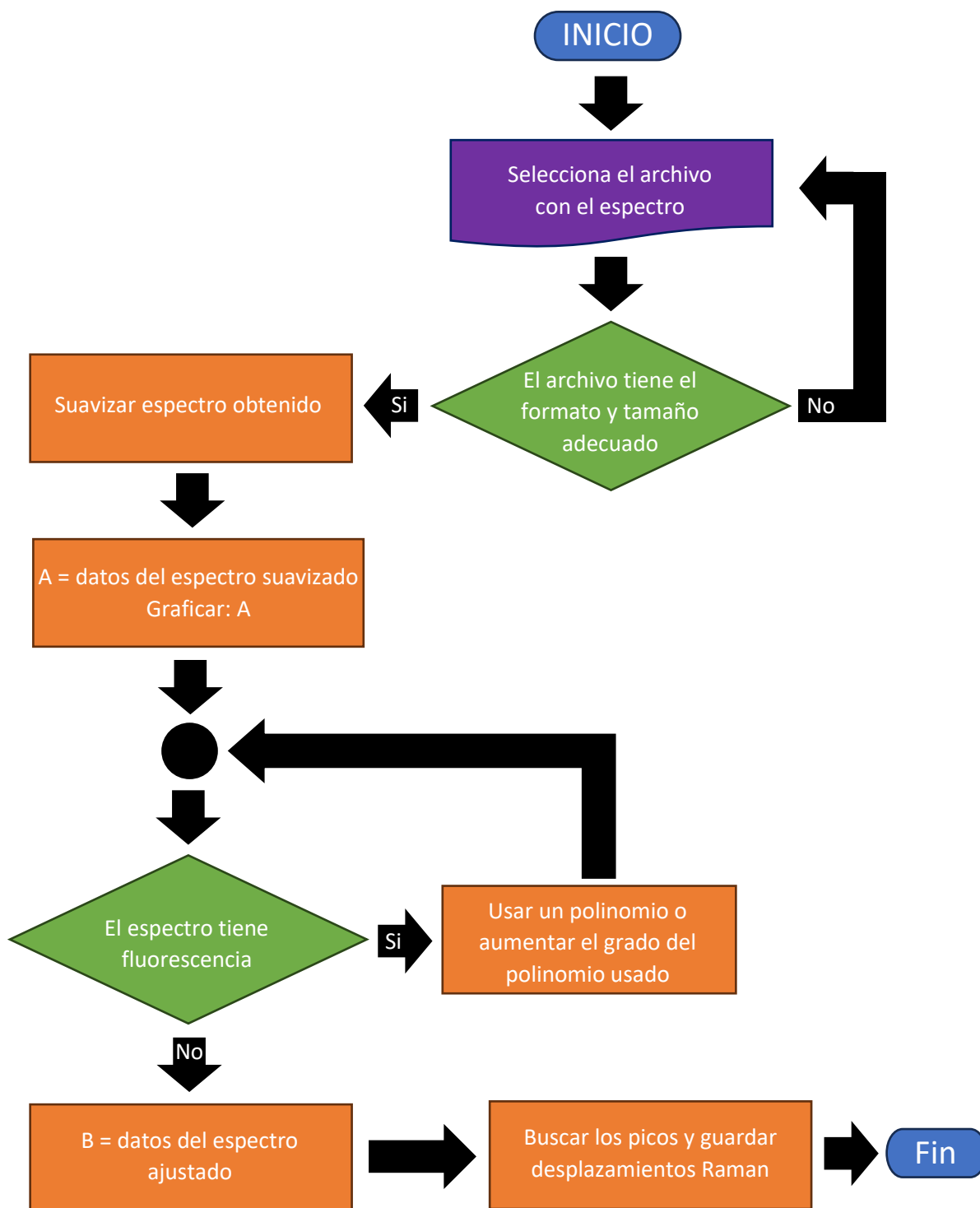
INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ventajas y limitaciones del estudio	12
Tabla 2 Tipos de lágrimas.....	22
Tabla 3 Biomarcadores lágrimalos	24
Tabla 4 Vibraciones moleculares de algunos enlaces	29
Tabla 5 Significado de algunas vibraciones moleculares	30
Tabla 6 Tipos de Ruido que puede obtener un espectro Raman	30
Tabla 7 Datos originales y ajustados	35
Tabla 8 Datos originales y ajustados	36
Tabla 9 Datos nuevos y ajustados.....	37
Tabla 10 Componentes del espectrómetro y su función.....	46
Tabla 11 Características y especificaciones de las partes de la punta de muestra del espectrómetro Raman QE65000	48
Tabla 12 Resultados del volumen con cada biomarcador de acuerdo a sus partes por millón, utilizando 0.02 gramos de masa	58
Tabla 13 Ubicación de bandas principales respecto a su desplazamiento Raman de cada biomarcador.....	66
Tabla 14 Comparación de bandas espectrales de los biomarcadores de albumina y glucosa con la lagrima de un paciente.....	73

APENDICES

Apéndice A

Diagrama de flujo para remover la fluorescencia.



Apéndice B

Diagrama de flujo para el PCA

