

CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE ADN

**CARLOS AUGUSTO ANDRADE ERASO.
CARLOS ANDRÉS MÉNDEZ HURTADO.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2007.**

CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE ADN

**CARLOS AUGUSTO ANDRADE ERASO.
CARLOS ANDRÉS MÉNDEZ HURTADO.**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
INGENIERO FÍSICO en la modalidad de trabajo de investigación.

Director

Dr. Gilberto Bolaños Pantoja

Codirector

Dr. Jesús Cabrera Moncayo.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2007**

Nota de Aceptación

Aprobado

Tesis Laureada

Director

Gilberto Bolaños Pantoja

Dr. Gilberto Bolaños Pantoja

Director

Jesús Cabrera Moncayo

Dr. Jesús Cabrera Moncayo

Jurado

Patricia Velez

Dr. Patricia Velez.

Jurado

Jorge W. Coronel.

Mg. Jorge W. Coronel.

Fecha de sustentación: Popayán, Diciembre 13 de 2007

“El anuncio de Watson y Crick sobre el ADN es para mí la prueba real de la existencia de Dios”.

Salvador Dalí

DEDICATORIA

El primer autor:

Este trabajo al igual que todas las cosas buenas de mi vida son dedicadas en primer lugar a Jehová Dios, creador de un universo perfecto que pretendemos entender con modelos imperfectos. A El sea toda la honra y la gloria porque por El y con El todo es posible.

A mi hermosa familia por la cual siempre doy gracias, mis papas Augusto y Socorro, quienes son el mejor ejemplo de amor, fe, perseverancia. Gracias por estar ahí siempre a mi lado, por demostrarme que su amor es tan fuerte que su felicidad va de la mano de la mía. A mis hermanos Andrés Felipe y Lorena, por creer en mi, por ser un motivo y una fuerza, por darme la responsabilidad de estar a la altura de sus expectativas.

A mis amigos y compañeros, por mas de 5 años de compañía enfrentándonos a labores quijotescas, a soñar con este momento y no saber que hacer cuando llegara. A el flaco y Leonardo con quienes siempre hicimos un gran equipo. A todo el grupo de Bajas Temperaturas con quienes siempre se genero la mas agradable y divertida atmósfera de trabajo.

A los profesores, quienes mostraron siempre con la mejor intención lo bueno, lo malo y lo feo de la física y la ingeniería. A todas las personas que a lo largo de este tiempo han estado dando apoyo y son o han sido cada una en su momento fuente de inspiración.

Gracias a todos por hacerme creer que los sueños pueden ser la mejor de las realidades.

El segundo autor:

Este trabajo esta dedicado a todas aquellas personas que de alguna manera han dejado huella en el transcurso de mi vida.

A mi padre (Q.E.P.D) por forjarme, por haberme dado la voluntad y la perseverancia de seguir mis sueños y metas, por haberme enseñado que a pesar de los obstáculos que se presenten debes seguir adelante, y se que siempre estarás a mi lado y por siempre te recordaré.

A mi madre que en todos los momentos ha sido mi gran apoyo y bendición, le doy gracias por su inmenso amor y entrega, a mi hermano Omar con quien he pasado gratos e inolvidables momentos de mi vida, mi apoyo, mi consejero y mi ejemplo a seguir.

A Angélica, mi inspiración y mi luz, has sido mi guía y mi tranquilidad, con quien he encontrado la felicidad y el amor verdadero.

A mis compañeros de mil batallas, Carlos y Leonardo, hemos salido victoriosos en muchas de ellas, personas quienes admiro y respeto, quienes se han ganado mi cariño y me han mostrado que la amistad traspasa barreras.

A todos aquellos que me ofrecieron su amistad y han estado conmigo en los buenos y malos acontecimientos.

Al incomparable grupo del Laboratorio de Física de Bajas Temperaturas, personas con una increíble calidad humana, trabajar con ellos ha sido una de las experiencias más enriquecedoras y gratificantes que he tenido a través de mi carrera.

Siempre estarán en mi mente y mi corazón...

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo expresan sus agradecimientos a:

El profesor Gilberto Bolaños Pantoja, director de la investigación, por sus importantes observaciones y aportes además de su sincera amistad.

Al grupo de inmunología de la Universidad del Cauca por su apreciable colaboración y apoyo para las obtención de las muestras de ADN Humano.

A Pedro y Patricia del grupo BIMAC (Biología Molecular ambiental y Cáncer) de la Universidad del Cauca por su idea original y aporte científico a esta investigación.

Al profesor Jesús Cabrera, codirector de la Universidad de Nariño por su excelente guía y dedicación a este trabajo.

A Andrea Coronel Tobar por su incondicional colaboración en las fases iniciales de esta investigación.

A nuestros compañeros del laboratorio de Física de Bajas Temperaturas por su firme apoyo en la búsqueda del conocimiento.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
RESUMEN	7
INTRODUCCION	21
CAPÍTULO 1. ROL BIOLÓGICO	24
1.1 ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO ADN	24
1.1.1 Definición	23
1.1.2 Composición del ADN	26
1.2 BACTERIA <i>Escherichia coli</i> (E. coli)	28
1.3 RETROVIRUS	31
1.3.1 Definición	31
1.3.2 Retrovirus del VIH (Virus de Inmuno Deficiencia Humana)	32
1.3.2.1 Estructura del virus	33

1.3.2.2 Genoma y composición	34
1.3.2.3 Ciclo de replicación del VIH.	35
1.3.2.4 Transmisión del VIH	38
1.3.2.5 Origen y evolución	39
1.3.2.6 Prueba del VIH	40
1.4 SIDA	41
1.4.1 Patología de los pacientes con SIDA	42
REFERENCIAS	45
CAPITULO 2. PROPIEDADES DE TRANSPORTE ELÉCTRICO EN MATERIALES ORGÁNICOS	49
2.1 MODELO FISICO BASICO	50
2.1.1 Existencia de GAP de Energía	52
2.2 PRIMERA MEDIDA DE CONDUCTIVIDAD REALIZADA EN ADN	53
2.3 MODELOS MECANO-CUANTICOS EN LA TRANSFERENCIA DE CARGA EN ADN	54
2.3.1 Tunelamiento Coherente	57
2.3.2 Conductibilidad hopping de rango variable	58

2.4 APLICACIONES USANDO ADN	60
2.4.1 Conductores Orgánicos	61
2.4.2 Diseño de nuevos materiales utilizando el autoensamblaje de ADN	64
2.4.3 Chips de ADN	66
2.4.4 ADN computacional	69
2.4.5 Detección de enfermedades	71
REFERENCIAS	72
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	75
3.1 DISEÑO DEL MONTAJE EXPERIMENTAL	76
3.1.1 Diseño de máscaras	77
3.1.2 Evaporación de metales	77
3.1.2.1. Evaporación térmica en vacío	78
3.1.2.1.1 Evaporación por calentamiento mediante resistencia	79
3.1.3 Sistema de deposición mediante evaporación térmica.	79
3.1.4 Proceso de evaporación de contactos eléctricos de plata	81

3.2 TÉCNICAS DE ALINEACIÓN DE ADN	82
3.2.1 Electroforesis	82
3.2.2 Alineación por campo eléctrico de corriente alterna AC	84
3.2.2.1 Modelo Físico	84
3.2.3 Desarrollo Experimental de la Alineación de ADN.	87
3.3 CARACTERIZACION ELECTRICA	88
3.3.1 Curvas Corriente –Voltaje	88
3.3.2 Curvas Resistencia Temperatura	90
3.4 ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA DE DATOS	92
3.4.1 Descripción del bus GPIB	92
3.4.2 Estructura de un sistema GPIB	93
3.4.3 Modificaciones realizadas en el sistema de Adquisición de datos	95
REFERENCIAS	98
CAPÍTULO 4 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANALISIS	100
4.1 CURVAS CORRIENTE VOLTAJE EN ADN	101
4.1.1 Curvas corriente voltaje sin alineación de ADN	101

4.1.1.1 ADN de <i>Escherichia coli</i> .	101
4.1.1.2 ADN Humano.	105
4.1.2 Curvas corriente voltaje con Alineación de ADN con campo D.C	108
4.1.2.1 Curvas corriente voltaje en ADN de bacteria <i>E coli</i> .	109
4.1.3 Curvas corriente voltaje con Alineación de ADN con campo A.C.	112
4.1.3.1 Curvas corriente voltaje en ADN bacteriano.	113
4.1.3.2 Curvas corriente voltaje en ADN Humano.	115
4.2 CURVAS RESISTENCIA TEMPERATURA EN ADN BACTERIANO	119
4.3 ANALISIS DE RESULTADOS	121
4.3.1 Efecto de la Alineación del ADN.	121
4.3.2 Resultados obtenidos con ADN de bacteria <i>E. coli</i> .	122
4.3.3 Resultados obtenidos con ADN Humano.	123
REFERENCIAS	127

5. CONCLUSIONES	129
RECOMENDACIONES	130
PARTICIPACIÓN EN EVENTOS CIENTÍFICOS	
ANEXOS	

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó caracterización eléctrica mediante curvas corriente-voltaje para muestras de ADN de bacteria *Escherichia coli* (*E coli*) y ADN Humano de personas sanas y de pacientes con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana). Así mismo se obtuvieron curvas de resistencia en función de la temperatura en muestras de ADN bacteriano. La concentración usada en las muestras de ADN Humano fue de 16 $\mu\text{g/ml}$ mientras que las de ADN de *E coli* fue de 160 $\mu\text{g/ml}$. Para obtener resultados reproducibles fue necesario realizar un proceso de alineación de las hebras de ADN previo a la obtención de la caracterización eléctrica. Para ello se diseñó un proceso de alineación de ADN usando un campo eléctrico AC (Corriente Alterna) generado por una señal senoidal con una frecuencia de 60Hz y amplitud de 0.5 V. Estos parámetros fueron encontrados experimentalmente.

Los resultados obtenidos experimentalmente por medio de la caracterización corriente voltaje en muestras de ADN Humano indican que la influencia del retrovirus del VIH en la cadena de ADN de los pacientes infectados altera directamente las características eléctricas de este material.

La caracterización eléctrica desarrollada por medio de curvas corriente-voltaje y resistencia-temperatura en muestras de ADN bacteriano indican en general un comportamiento tipo semiconductor. Así mismo se observan transiciones que van de semiconductor a conductor y aislante en diversas temperaturas. Estas transiciones observadas, el comportamiento tipo semiconductor y la dependencia en función de la temperatura sugieren que este tipo de ADN se puede utilizar como material para la creación de sensores orgánicos y biotransistores

INTRODUCCION

El ADN juega un papel primordial como portador de la información genética de todo ser viviente. Es una molécula única con impresionantes propiedades químicas, físicas y biológicas. Por esta razón se ha generado gran interés en el estudio de las propiedades físicas, como lo son las propiedades de transporte eléctrico. Esto ha abierto una nueva perspectiva para el desarrollo de interesantes aplicaciones, como es el caso de los nuevos materiales aplicados hacia la electrónica molecular y la nanotecnología.

Debido a su peculiar estructura, el ADN puede presentar estado conductor, semiconductor, aislante e incluso superconductor, dependiendo del tipo y la cantidad de pares de bases (un par de bases es la combinación de bases nitrogenadas dada por Adenina-Timina y Guanina-Citosina) presentes en la molécula. Además posee características de alambre molecular al igual que los nanotubos de carbono. Recientes aplicaciones en biomateriales están en fase de desarrollo y en ellas se crea una especie de simbiosis entre los sistemas orgánicos e inorgánicos. Un ejemplo de estas nuevas tecnologías son los biosensores donde películas delgadas de ADN son depositadas sobre transistores de silicio o arseniuro de galio (fundamentales en la electrónica moderna), con el fin de sensor los cambios en las propiedades eléctricas provocados por los cambios en la estructura molecular.

Este singular efecto en el cual hay una alteración en las propiedades físicas, puede ser usado también para la detección de enfermedades que causen modificación directa en la estructura del ADN, como lo es la alteración provocada por el Virus de Inmuno Deficiencia Humana (VIH), perteneciente a la familia de los retrovirus. La característica principal es que el genoma del VIH (es decir, su

material genético) está constituido por ARN (Acido Ribonucleico) en lugar de ADN, en contraste con las células que él infecta. Para infectar a una célula, los retrovirus deben traducir su ARN en ADN e insertarlo dentro del ADN propio de la célula a infectar. En este proceso de inserción, el material genético adicional es colocado dentro de la cadena principal de ADN de las células huésped. Esta alteración que se realiza por adición, es del orden de los 10000 pares de bases, la cual afectará directamente la cadena de ADN presente en el núcleo de estas células, las cuales son principalmente las células sanguíneas conocidas como linfocitos T4.

Esta investigación esta enmarcada en la caracterización eléctrica de dos tipos diferentes de ADN, enfocada hacia una aplicación independiente para cada uno de ellos. La primera es la caracterización eléctrica obtenida por medio de curvas corriente-voltaje y resistencia- temperatura para el ADN de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) con el fin de ver las posibilidades de desarrollar biotransistores en un futuro cercano. El genoma de esta bacteria es totalmente conocido y se puede atribuir las respuestas eléctricas al orden molecular de este ADN.

El otro tipo de material genético usado es ADN humano. Esta parte de la investigación se centra en estudiar la modificación en la transferencia de carga dentro de este material, provocada por la inserción de ADN no deseable del retrovirus VIH dentro del ADN de las células sanguíneas humanas, la cual es posible observar a partir de la comparación entre las curvas corriente-voltaje obtenidas para ADN de personas entre los 20 y 40 años con VIH en una etapa inicial y personas sanas.

El capítulo 1 del presente trabajo es el rol biológico de la investigación. Se muestran las características biológicas que convierten a la molécula de ADN en un interesante material para investigar. Así mismo se define los conceptos de retrovirus y específicamente se enfatiza en el Virus de Inmunodeficiencia Humana

y la enfermedad que éste puede provocar: el Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

En el capítulo 2 se presentan los modelos físicos teóricos que explican el transporte de carga en moléculas orgánicas, así como las actuales y futuras aplicaciones usando directamente ADN.

El capítulo 3 muestra las técnicas experimentales usadas para el desarrollo de la investigación. Primero se indica la creación del montaje experimental, el proceso de alineación de ADN y finalmente la obtención de las curvas corriente-voltaje y resistencia- temperatura. En este capítulo también se describen las adecuaciones y modificaciones realizadas al sistema de adquisición de datos, es decir, la parte ingenieril de la investigación.

En el capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos de las curvas corriente-voltaje para ADN humano y de (la) bacteria *E coli* y las curvas de resistencia-temperatura tomadas para ADN bacteriano. Aquí se muestra la relevancia de la alineación de las fibras de ADN en la reproducibilidad de los resultados. Finalmente el capítulo 5 contiene las conclusiones de la investigación.

En nombre del Grupo de Bajas Temperaturas de la Universidad del Cauca es motivo de orgullo mencionar que este trabajo de investigación es pionero a nivel nacional y de muchos países latinoamericanos en el estudio experimental de las propiedades eléctricas en biomoléculas como el ADN.

1. BIOLÓGICO

1.1 Acido Desoxirribonucleico (ADN)

1.1.1 Definición

El ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye el principal componente del material genético de la inmensa mayoría de los organismos, junto con el ARN (Acido Ribonucleico), siendo el componente químico primario de los cromosomas y el material en el que los genes están codificados [1].

En las bacterias, el ADN se encuentra en el citoplasma mientras que en organismos más complejos, tales como plantas, animales y otros organismos multicelulares la mayoría del ADN reside en el núcleo celular. El material genético se conoce desde hace más de cien años. El ADN fue identificado inicialmente en 1868 por Friedrich Miescher [2], biólogo suizo, en los núcleos de las células del pus obtenidas de los vendajes quirúrgicos desechados y en el esperma del salmón. Él llamó a la sustancia nucleína, aunque no fue reconocida como material genético hasta 1943 gracias al experimento realizado por Oswald Avery y colaboradores [3].

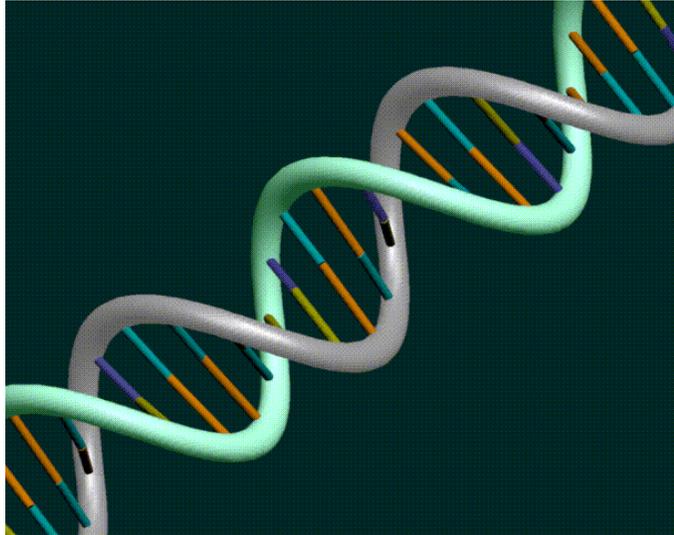


Figura 1.1 Esquema general de la estructura del ADN.

Su función principal es codificar las instrucciones esenciales para fabricar un ser vivo idéntico a aquel del que proviene, o similar, en el caso de mezclarse con otra cadena como es el caso de la reproducción sexual o de sufrir mutaciones. Para ello, las cadenas de ADN se organizan en secuencias de pares de bases de tal manera que crean los genes, los cuales contienen la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica como por ejemplo las proteínas. Esta función puede estar vinculada al desarrollo o funcionamiento de una función fisiológica normal y específica. Las moléculas codificadas por el ADN pueden ser estructurales como las proteínas de los músculos, cartílagos, pelo, etc., o bien funcionales como las de la hemoglobina o las innumerables enzimas del organismo [1]. La función principal de la herencia es la especificación de las proteínas, siendo el ADN una especie de receta primaria para fabricar nuestras proteínas.

1.1.2 Composición del ADN

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. El ADN lo forman cuatro tipos de nucleótidos, diferenciados por sus bases nitrogenadas divididas en dos grupos: dos purinas (o bases púricas) denominadas adenina **A** y guanina **G** y dos pirimidinas (o bases pirimídicas) denominadas citosina **C** y timina **T** [1]. La estructura del ADN es una pareja de largas cadenas de nucleótidos. La estructura de doble hélice (ver figura 1) del ADN fue descubierta en 1953 por James Watson y Francis Crick [4] y dejaba claro el modo en que el ADN se podía "desenrollar" para que fuera posible su lectura o copia.

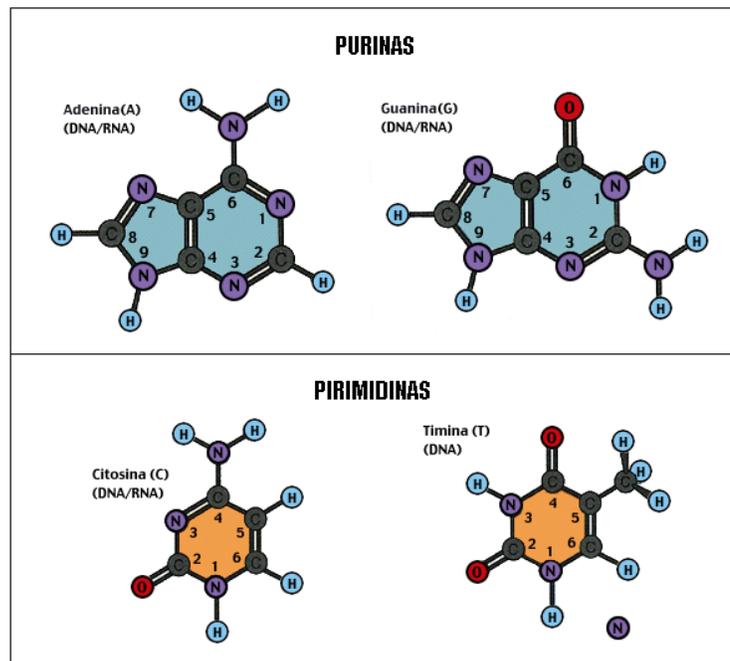


Figura 1.2 Esquema de las 4 bases nitrogenadas presentes en el ADN.

Una larga hebra de ácido nucleico está enrollada alrededor de otra hebra formando un par entrelazado. Dicha hélice mide 3,4 nm de paso de rosca y 2,37 nm de diámetro, y está formada, en cada vuelta, por 10,4 pares de nucleótidos enfrentados entre sí por sus bases nitrogenadas [5]. El rasgo fundamental es que cada base nitrogenada de una hebra se hibridiza con la base de la otra, en el sentido de que la adenina siempre se enfrenta a la timina (lo que se denomina par **A-T**) y la guanina siempre a la citosina (**G-C**) [1]. La adenina se une a la timina mediante dos puentes de hidrógeno, mientras que la guanina y la citosina lo hacen mediante tres puentes de hidrógeno; de ahí que una cadena de ADN que posea un mayor número de parejas de C-G es más estable.

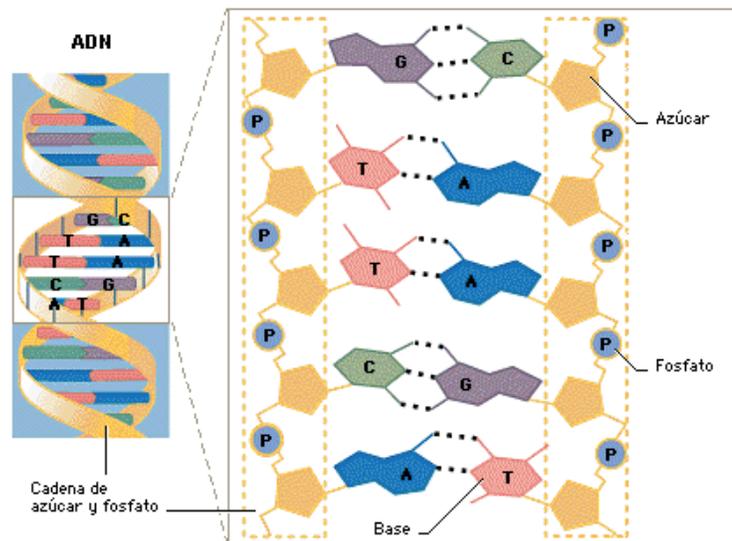


Figura 1.3. Hibridación de las bases nitrogenadas en la estructura helicoidal del ADN.

La adhesión de las dos hebras de ácido nucleico se debe a un tipo especial de unión química conocido como enlace de hidrógeno o puente de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno son uniones más débiles que los típicos enlaces químicos, tales como enlaces covalentes y enlaces iónicos, pero son más fuertes que las interacciones hidrófobas, y las fuerzas de Van der Waals, etc [1]. Esto significa que las dos hebras de la hélice pueden separarse con relativa facilidad, quedando intactas.

Este emparejamiento corresponde a la observación ya realizada por Erwin Chargaff de que en todas las muestras de ADN la cantidad de adenina es siempre la misma que la timina, e igualmente con la guanina y la citosina. El número de purinas (A+G) es siempre igual a la cantidad de pirimidinas (T+C). Así una purina, de mayor tamaño, está siempre emparejada con una pirimidina, más pequeña, siendo de este modo uniforme la doble hélice en el sentido que a través de toda la estructura no hay bultos ni estrechamientos.

El modelo de doble hélice permite explicar las propiedades que se presentan en el ADN:

- Capacidad para contener información: lenguaje codificado en la secuencia de pares de nucleótidos.
- Capacidad de replicación: dar origen a dos copias iguales.
- Capacidad de mutación: justificando los cambios evolutivos.
- Capacidad de regulación: El genoma contenido regula la expresión de los genes prendiéndolo y apagándolos dependiendo de las necesidades intrínsecas y extrínsecas (Epigenéticas).

Sin embargo, el ADN también se puede presentar en forma circular en bacterias o de manera lineal en virus, en los cuales la cantidad de pares de bases es mucho menor [6]. Se estima que el genoma humano haploide tiene alrededor de 3.000 millones de pares de bases [7]. Dos unidades de medida muy utilizadas son la kilobase (kb) que equivale a 1.000 pares de bases, y la megabase (Mb) que equivale a un millón de pares de bases.

<u>Organismo</u>	Nº de genes	pares de bases
<u>Plantas</u>	<50000	<10 ¹¹
<u>Humanos</u>	23000	3 × 10 ⁹
<u>Moscas</u>	12000	1,6 × 10 ⁸
<u>Hongos</u>	6000	1,3 × 10 ⁷
<u>Bacterias</u>	500-6000	5 × 10 ⁵ - 10 ⁷
<u><i>Mycoplasma genitalium</i></u>	500	580.000
<u>Virus DNA</u>	10-300	5.000 - 800.000
<u>Virus RNA</u>	1-25	1.000 - 23.000
<u>Viroides</u>	0-1	~500

Tabla 1.1 Numero de Genes y Pares de Bases para algunos Organismos.

La presente investigación se enfoca principalmente en el estudio de las propiedades de transporte eléctrico de dos tipos diferentes de ADN, a saber, ADN bacteriano obtenido de la bacteria *E. Coli* y ADN humano.

1.2 BACTERIA *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales —incluido el humano— y por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli* [8]. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa [9].

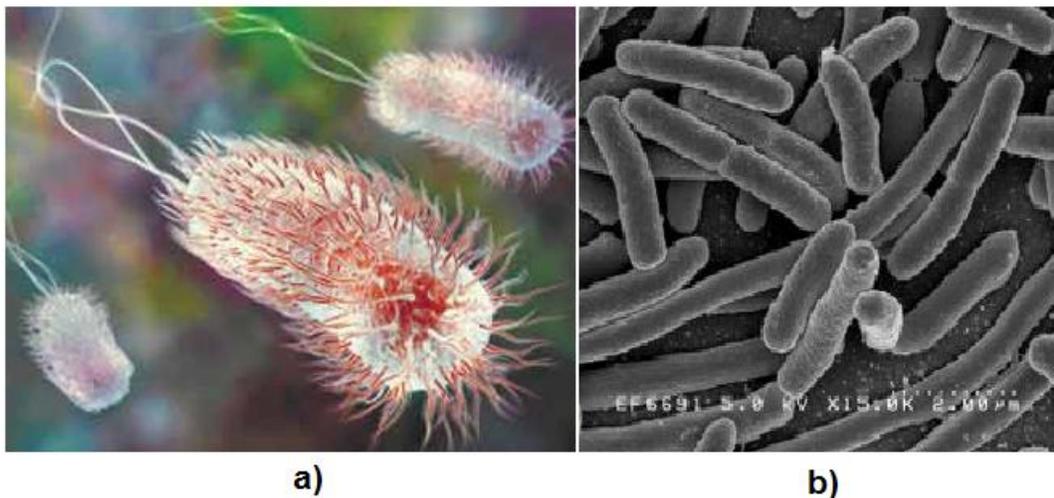


Figura 1.4 a) Bacteria *E. coli*, b) Colonia de bacterias.

Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular debido a que su genoma se conoce perfectamente. Además, la longitud de la cadena de ADN es relativamente pequeña si se compara con la de otros organismos (Ver tabla 1). Por esta razón, se puede atribuir una respuesta obtenida por la caracterización eléctrica al orden molecular presente en el ADN de *E. coli*. Todo esto con el fin de analizar posibles aplicaciones en biomateriales utilizando ADN.

1.3 RETROVIRUS

1.3.1 Definición

Los retrovirus son virus pertenecientes a la familia *Retroviridae*. Poseen dos copias de ARN (Acido Ribonucleico) monocatenario (cadena simple), que se replican de manera inusual a través de una forma intermedia de ADN bicatenario (cadena doble) [10]. Este proceso se lleva a cabo mediante una enzima: la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, que dirige la síntesis de ADN a través de ARN [1]. Una vez se ha pasado de ARN monocatenario a ADN, este se inserta dentro del ADN propio de la célula infectada [11].

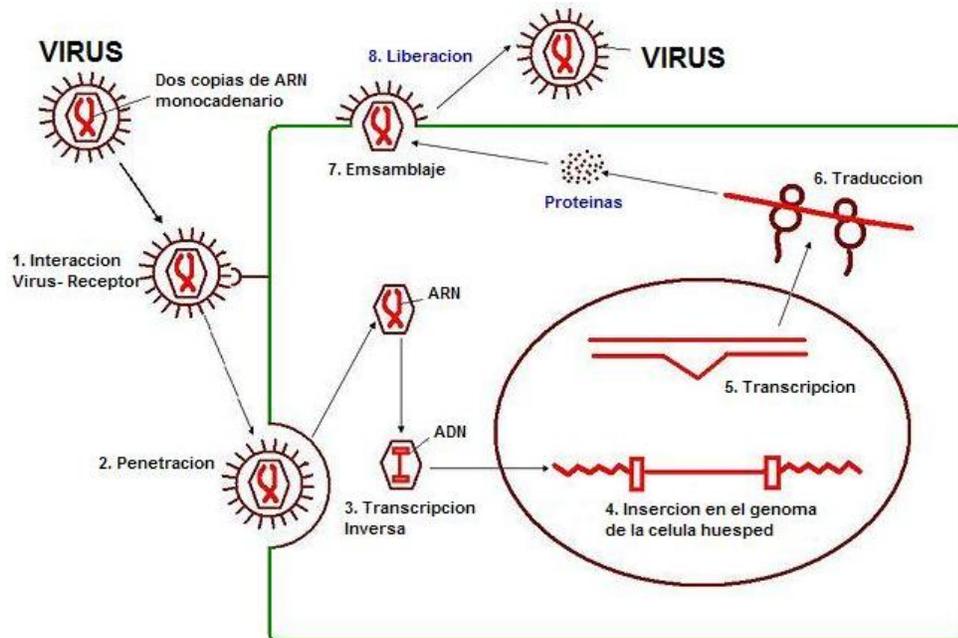


Figura 1.5. Ciclo típico de Replicación de los Retrovirus.

Los retrovirus pueden causar muchas enfermedades, incluyendo algunos cánceres y el SIDA. Así mismo, la cantidad de material genético que pueden insertar dentro de células huésped en casos como el del VIH es del orden de 10 Kb, lo cual altera significativamente las propiedades fisicoquímicas del ADN de las células infectadas.

1.3.2 Retrovirus VIH (Virus de Inmuno Deficiencia Humana)

El VIH (acrónimo de Virus de la Inmunodeficiencia Humana) es el agente infeccioso determinante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) el VIH se incluye en el género *Lentivirus*, encuadrado en la subfamilia *Orthoretrovirinae* de la familia *Retroviridae* [12]. Fue descubierto e identificado como el agente generador de la naciente epidemia de SIDA por el equipo de Luc Montagnier en Francia en 1983 [13]. En el mismo año en que se identificó el virus, diversos equipos empezaron a trabajar en la secuencia de su genoma, publicada a principios de 1985 y comenzó también la caracterización de sus proteínas [12].

El virión es esférico, dotado de una envoltura y con una cápside proteica [14]. Su genoma consiste en dos cadenas de ARN monocatenario que debe(n) copiarse provisionalmente a ADN para poder multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula que infecta [11]. Los antígenos proteicos de la envoltura exterior se acoplan de forma específica con proteínas de la membrana de las células infectables, especialmente de los linfocitos T4 [15].

1.3.2.1 Estructura del virus

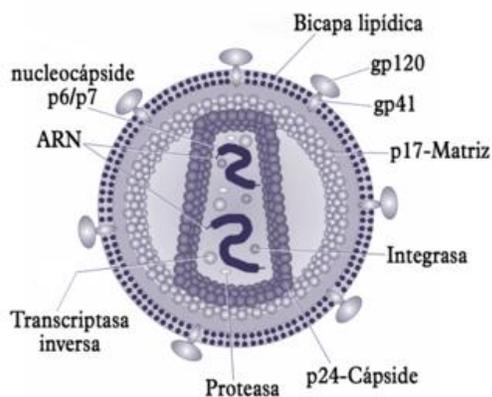


Figura 1.6. Estructura del virión del VIH.

El virión (partícula infectante) del VIH difiere en su estructura de los previamente conocidos de otros retrovirus. Mide unos 120 nm de diámetro y es aproximadamente esférico [14].

Se basa físicamente en dos copias de ARN monocatenario positivo (su secuencia es como la del ARN mensajero correspondiente) cubierta por proteínas, que forman la nucleocápside, y encerradas dentro de una cápside troncocónica, a su vez rodeada por una envoltura de bicapa lipídica, “robada” primero a la membrana plasmática de la célula huésped, pero dotada de proteínas propias [14]. Dentro de la envoltura hay también enzimas propias del virus, incluidas una transcriptasa inversa, una integrasa dentro de la cápside y una proteasa. La primera es necesaria para la retrotranscripción, la síntesis de ADN tomando el ARN vírico como molde, y la segunda para que el ADN así fabricado se integre en el genoma humano convirtiéndose en provirus [16].

1.3.2.2 Genoma y composición

El genoma del VIH-1, cuando está integrado en el ADN del huésped, es decir en forma de provirus, mide 9,8 kpb (9.800 pares de nucleótidos) [17]. El provirus contiene 9 genes. Tres de ellos codifican para proteínas estructurales comunes a todos los retrovirus (los genes *gag*, *pol* y *env*), siendo los seis restantes genes no estructurales, que codifican para dos proteínas reguladoras (genes *tat* y *rev*) y cuatro para proteínas accesorias (genes *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*) [18].

El genoma del VIH-2 es algo más largo (10,3 kpb) y le falta el gen *vpu*, presentando en su lugar otro llamado *vpx*. Las proteínas estructurales son

codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*, y su secuencia cubre la mayor parte del genoma viral, quedando sólo una parte menor para el resto de los genes [19].

1.3.2.3 Ciclo de replicación del VIH.

Las células que el VIH invade son esencialmente los linfocitos T CD4+ [15], pero también en menor medida los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de microglía del cerebro [20]. La replicación viral tiene lugar en tejidos diversos: ganglios linfáticos, intestino, cerebro, timo, etc. Los órganos linfoides, sobre todo los ganglios linfáticos, constituyen la principal sede de su replicación [21]. El virus está presente en numerosos líquidos del organismo, en particular la sangre y las secreciones genitales.

La replicación del virus VIH se desarrolla específicamente en las siguientes etapas:

- La fijación representa la primera etapa en la invasión de una célula. Se basa en el reconocimiento mutuo y acoplamiento de proteínas de la envoltura del virión, las gp120 y gp41, y los receptores de la célula blanco, los CD4. Este reconocimiento no es posible sin ayuda de correceptores propios de las células susceptibles de ser invadidas; en el caso de los macrófagos son los CCR5 y en el caso de los LT4, los CXCR4, que interactúan con la proteína superficial. Macrófagos y LT4 tienen en común su principal receptor: el receptor CD4. Este reconocimiento es condición obligada para que el virus llegue a penetrar en la célula y continuar con el proceso de infección.

- La penetración es el segundo paso: una vez reconocido el virión por los receptores de superficie, se vacía dentro de la célula fusionándose la envoltura lipídica del virión con la membrana plasmática de la célula. Protegidos por la cápside y las nucleocápsides, los dos ARN genómicos que forman el genoma viral y sus proteínas asociadas se encuentran ahora en el citoplasma.
- Eliminación de las cubiertas proteicas, cápside y nucleocápside, quedando el ARN vírico libre en el citoplasma y listo para ser procesado.
- Se realiza la transcripción inversa del ARN vírico para formar ADNc (ADN complementario, monocatenario) con la misma información. Cada una de las dos moléculas de ARN llega desde el virión asociada a una molécula de transcriptasa inversa que se ocupa del proceso. Las dos moléculas de ADNc como parte del proceso de transcripción inversa sirven como molde para sintetizar sendas moléculas de ADN de doble cadena, que es la forma química de guardar la información que una célula eucariota es capaz de procesar y el virus VIH aprovecha este mecanismo genial para “guardar su información” y aprovecha la maquinaria replicativa de la célula huésped en su momento adecuado.
- El paso siguiente es la integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped. Para ello penetra en el núcleo y se inserta en el ADN celular con ayuda de una integrasa, que procede del virión infectante.
- La transcripción del ADN vírico por los mecanismos normales de la célula. El resultado de la transcripción es un ARNm (ARN mensajero) y un ARN genómico viral, que son producidos en dos ondas transcripcionales separadas.

- El ARNm obtenido es complejo, constituido por una sucesión de intrones (partes no informativas) y exones (partes informativas). Debe ser procesado por cortes y re empalmes antes de que la información que contiene pueda servir para fabricar las proteínas correspondientes. Una vez procesado, el ARNm puede salir del núcleo a través de los poros nucleares.
- Una vez en el citoplasma el ARNm proporciona la información para la traducción, es decir, la síntesis de proteínas, que es realizada a través del aparato molecular correspondiente, del que forman la parte fundamental los ribosomas. El resultado de la traducción no consiste inmediatamente en proteínas funcionales, sino en poliproteínas que aún deben ser cortadas en fragmentos.
- Por acción de proteasas específicas del VIH, las poliproteínas producto de la traducción son procesadas, cortándolas, para formar las proteínas constitutivas del virus.
- Las proteínas víricas fabricadas se ensamblan, junto con ARN provirales, para formar los componentes internos de la estructura del virión, los que constituyen la cápside y su contenido.
- El último paso es la gemación, cuando los nucleoides víricos se aproximan a la membrana plasmática y se hacen envolver en una vesícula que termina por desprenderse, formando un nuevo virión o partícula infectante. En cada célula infectada se ensamblan varios miles de nuevos viriones, aunque muchos son incompletos y no pueden infectar [21].

1.3.2.4 Transmisión del VIH

Hasta el momento, sólo se han demostrado y documentado tres formas de transmisión [22]:

- 1) **Sexual.** (Acto sexual sin protección). El contagio se produce por el contacto de secreciones infectadas con la mucosa genital, rectal u oral de la otra persona.
- 2) **Parenteral** (por sangre). Es una forma de contagio a través de jeringuillas contaminadas que se da por la utilización de drogas intravenosas o cuando los servicios sanitarios, como ha ocurrido a veces en países pobres, no usan las mejores medidas de higiene; también en personas, como hemofílicos, que han recibido una transfusión de sangre contaminada o productos contaminados derivados de la sangre; y en menor grado trabajadores de salud que estén expuestos a la infección en un accidente de trabajo como puede ocurrir si una herida entra en contacto con sangre contaminada; también durante la realización de *piercings*, tatuajes y escarificaciones.
- 3) **Vertical** (de madre a hijo). El contagio puede ocurrir durante las últimas semanas del embarazo, durante el parto, o al amamantar al bebé. De estas situaciones, el parto es la más problemática. Se puede tratar a la madre con antivirales en la proximidad del parto para reducir considerablemente la probabilidad de contagio del bebé (a menos del 1%).

1.3.1.5 Origen y evolución

Como en otras muchas enfermedades infecciosas emergentes, la infección por VIH que acarrea el SIDA, inició su existencia como zoonosis [23], es decir por contagio desde otras especies. La emergencia del SIDA y la identificación del VIH estimularon investigaciones que han permitido determinar que las variantes del VIH forman parte de un amplio grupo de lentivirus relacionados que se observan en una gran variedad de primates [24]. Se les ha llamado SIV, siglas en inglés de *Simian Immunodeficiency Virus*, por analogía con el VIH, no porque produzcan primariamente el síndrome que llamamos SIDA en sus huéspedes naturales [25] .

Los SIV demuestran un gran parentesco con las dos especies del VIH cuando se aplican las técnicas moleculares de análisis filogenético con el fin de interpretar la historia del cambio y diversificación evolutivos de los genes para reconstruir el parentesco de las especies.

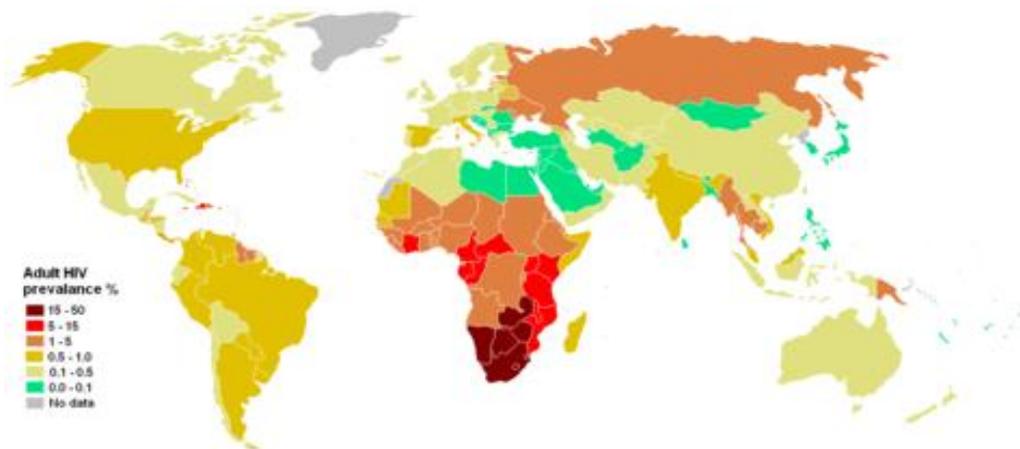


Figura 1.7 Porcentaje de adultos infectado con VIH (año 2000) [Fuente Organización Mundial de la Salud].

El VIH-1, responsable de la actual pandemia, ha resultado estar estrechamente relacionado con el SIVcpz, que infecta a poblaciones de la subespecie centroafricana (llamada *Pan troglodytes troglodytes*) del chimpancé común [24]. El salto de la barrera de especie desde *P. t. troglodytes* a *Homo sapiens* se ha producido al menos tres veces, con variantes del VIH-1 que demuestran parentesco con distintas cepas , geográficamente más o menos localizadas, del SIVcpz. Así pues, el VIH-1 es un virus polifilético [25]. El grupo M del VIH-1, responsable de la pandemia actual, debió pasar a los seres humanos en la primera mitad del siglo XX. Con los datos actuales, parece claro que *Pan troglodytes troglodytes* es el reservorio desde el que se han producido repetidamente las infecciones humanas por los virus de cuya evolución procede el VIH-1[25] .

La muestra humana más antigua que se sepa que contiene VIH fue tomada en 1959 a un marino británico, quien aparentemente la contrajo en lo que ahora es la República Democrática del Congo [26]. Otras muestras que contenían el virus fueron encontradas en un hombre estadounidense que murió en 1969 y en un marino noruego en 1976. Se cree que el virus se propagó mediante actividad sexual, posiblemente a través de prostitutas, en las áreas urbanas de África. A medida que los primeros infectados viajaron por el mundo, fueron llevando la enfermedad a varias ciudades de distintos continentes.

1.3.2.6 Prueba del VIH

La prueba del VIH muestra si el virus que causa el sida está o estuvo presente en la sangre. Una vez que el VIH es introducido al cuerpo, el sistema inmunológico comienza a producir anticuerpos. En el caso del VIH, estos anticuerpos no pueden

combatir la infección, pero su presencia es utilizada para detectar si una persona tiene o tuvo el VIH en su cuerpo [26]. En otras palabras, la mayoría de las pruebas para el VIH buscan los anticuerpos que combaten el VIH en lugar de buscar el VIH por sí solo.

La prueba del VIH más común utiliza la sangre para detectar la infección por VIH. Pruebas que utilizan saliva u orina están también disponibles. Obtener los resultados de algunas de las pruebas toma varios días, pero la prueba rápida del VIH (ELISA) puede suministrar los resultados en solo 20 minutos aunque el poder de resolución de la misma no es suficientemente confiable. Todas las pruebas del VIH que resultan positivas deben ser seguidas por otra prueba para confirmar el resultado positivo. Los resultados de esta prueba confirmatoria pueden tomar algunos días o semanas.

1.4 SIDA

El SIDA o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, resulta de la incapacidad del sistema inmunológico para hacer frente a las infecciones y otros procesos patológicos, y se desarrolla cuando el nivel de Linfocitos T CD4 desciende por debajo de 200 células por mililitro de sangre [27].

Normalmente, los glóbulos blancos y anticuerpos atacan y destruyen a cualquier organismo extraño que entra al cuerpo humano. Esta respuesta es coordinada por un tipo de células llamados linfocitos CD4+. Desafortunadamente, el VIH ataca específicamente a las células que expresan el receptor CD4, una de las más importantes son los linfocitos T CD4+ y entra en ellos. Una vez dentro, el virus transforma su material genético de cadena simple (RNA) a uno de cadena doble

(DNA) para incorporarlo al material genético propio del huésped (persona infectada) y lo utiliza para replicarse o hacer copias de sí mismo [14]. Cuando las nuevas copias del virus salen de las células a la sangre, buscan a otras células para atacar. Mientras tanto, las células de donde salieron mueren y este ciclo se repite una y otra vez.

Para defenderse de esta producción de virus, el sistema inmunitario de una persona produce muchas células CD4 diariamente. Paulatinamente el número de células CD4 disminuye, por lo que la persona sufre de inmunodeficiencia, lo cual significa que la persona no puede defenderse de otros virus, bacterias, hongos y parásitos que causan enfermedades, lo que torna a la persona susceptible de sufrir enfermedades que alguien sano sería capaz de enfrentar, como la neumonía atípica y la meningitis atípica [28]. Estas enfermedades son principalmente infecciones oportunistas. Dado que el organismo posee mecanismos de control de crecimiento celular dependiente de células CD4, la destrucción progresiva de éstas células ocasionará que estos mecanismos no sean adecuadamente regulados, lo que origina en consecuencia la presencia de algunas neoplasias (Cáncer) que no ocurrirían en personas "sanas" [29]. El VIH, además, es capaz de infectar células cerebrales, causando algunas afecciones neurológicas [20].

1.4.1 Patología de los pacientes con SIDA

No todos los pacientes infectados con el virus VIH tienen SIDA. El criterio para diagnosticar el SIDA puede variar de región en región, pero el diagnóstico típicamente requiere:

- Un conteo absoluto de las células T CD4 menor a 200 por milímetro cúbico.
- La presencia de alguna de las infecciones oportunistas típicas, causadas por agentes incapaces de producir enfermedad en personas sanas.

La persona infectada por el VIH es denominada *seropositiva para VIH* o *VIH positivo* (VIH+) y a los no infectados se les llama *seronegativos para VIH* o *VIH negativos* (VIH-). La mayoría de las personas seropositivas no saben que lo son.

La infección primaria por VIH es llamada *seroconversión* y puede ser acompañada por una serie de síntomas inespecíficos, parecidos a los de una gripe, por ejemplo, fiebre, dolores musculares y articulares, dolor de garganta y ganglios linfáticos inflamados. En esta etapa el infectado es más transmisor que en cualquier otra etapa de la enfermedad, ya que la cantidad de virus en su organismo es la más alta que alcanzará. Esto se debe a que todavía no se desarrolla por completo la respuesta inmunológica del huésped. No todos los recién infectados con VIH padecen de estos síntomas y eventualmente todos los individuos se vuelven asintomáticos [30].

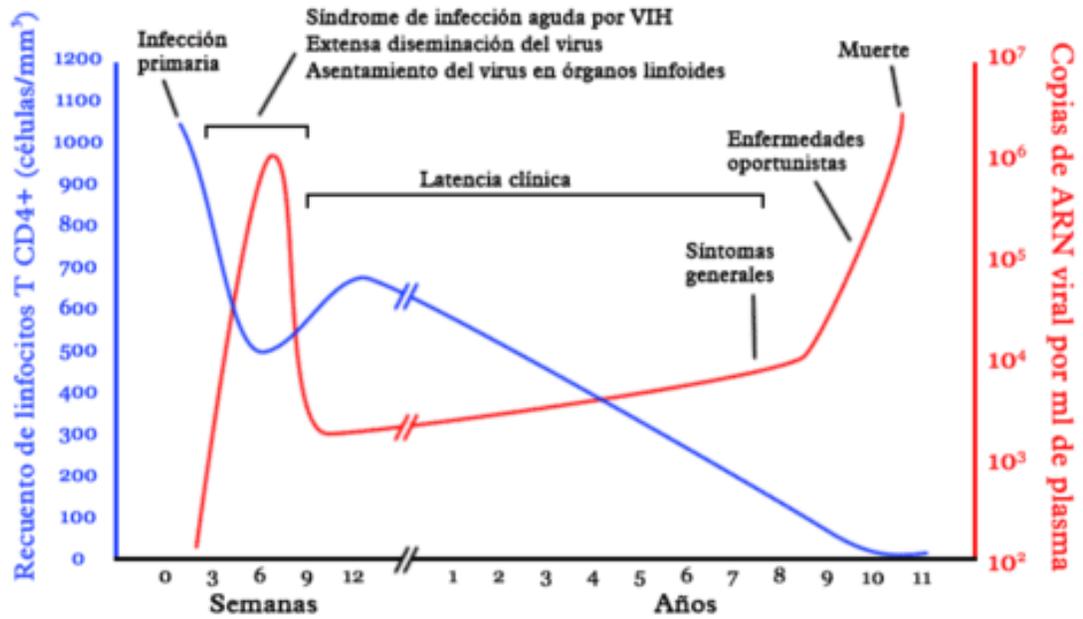


Figura 1.8. Curso típico de la infección por VIH. En azul, evolución del recuento de linfocitos T CD4+. En rojo, evolución de la carga viral.

Actualmente existen medicamentos, llamados antirretrovirales, que inhiben enzimas esenciales, la transcriptasa reversa o la proteasa, con lo que reducen la replicación del VIH [31]. De esta manera se frena el progreso de la enfermedad y la aparición de otras infecciones, así que aunque el SIDA no puede propiamente curarse, sí puede convertirse con el uso continuado de esos fármacos en una enfermedad crónica compatible con una vida larga y casi normal.

REFERENCIAS

- [1] Cecie, S, Ralph T. "*Biología: la unidad y diversidad de la vida*", 10ed. México: Thomson, 2004. pag 115-8.
- [2] Solari, A, J. "*Genética Humana: Fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3 ed. Buenos Aires. Medica Panamericana, 2004. pag. 562.
- [3] Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. 1944. "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types" *J. Exp. Med.* 79:137–58
- [4] Dickerson RE. 1983. "*The DNA helix and how it is read*" *Sci. Am.* 249: 94–98.
- [5] Watson JD, Crick FHC. 1953. "*A structure of deoxyribose nucleic acid. Nature*" 171:737–38
- [6] C. A. Thomas, Jr, and L A MacHattie. "*The Anatomy of Viral DNA Molecules*" Vol. 36: 485-518
- [7] Bergsma D, ed. 1973. "*Human Gene Mapping New Haven Conference*. New York/London". Intercont. Med. Book Corp.
- [8] Wollman EL, Jacob F, Hayes W. 1956. Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21:141
- [9] Marek LE, Henson JM. 1988. Cloning and expression of the *Escherichia coli* K-12 sad gene. *J. Bacteriol.* 170: 991– 94

- [10] Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 261: 1179– 81
- [11] Vélez A, Hernán “*Fundamentos de medicina: enfermedades infecciosas*”. Medellín: Corporación de investigaciones biológicas, 2003. 830p. Pág. 523.
- [12] Adams J. 1989. *AIDS: “The HIV Myth*”. New York: St. Martin's. 223 pp.
- [13] Fonseca, Galia C. “*Manual de Medicina de rehabilitacion : Calidad de vida mas allá de la enfermedad*”. Bogota : Manual Moderno, 2002. 544 p. ils.
- [14] Adams MJ, Accotto GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, et al. 2005. Family *Flexiviridae*. In *Virus Taxonomy. Eighth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses*, ed. CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball, pp. 1089–124. Amsterdam: Elsevier/Academic
- [15] Margini, Ricardo A. “*Inmunología e Inmunoquímica : Fundamentos./ Ricardo Anibal Margni*”. Buenos Aires. Médica Panamericana, 1996. 976 p. ils. imn. Pág. 210.
- [16] Andersson AC, Yun Z, Sperber GO, Larsson E, Blomberg J. 2005. “*ERV3 and related sequences in humans: structure and RNA expression*”. *J. Virol.* 79:9270–84.
- [17] Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 53: 557– 93
- [18] Braaten D, Luban J. 2001. “*Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells*”. *EMBO J.* 20: 1300–9

[19] Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, et al. 2002. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297: 1003–7

[20] Kalter DC, Nakamura M, Turpin JA, Baca LM, Hoover DL, Dieffenbach C, Ralph P, Gendelman HE, Meltzer MS. 1991. "Enhanced HIV replication in macrophage colony-stimulating factor-treated monocytes". *J. Immunol.* 146: 298– 306

[21] Joel N. Blankson, Deborah Persaud, and Robert F. Siliciano "The challenge of viral reservoirs in hiv-1 infection". Departments of Medicine and Pediatrics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205; Vol. 53: 557-593.

[22] Donegan, E., Stuart, M., Niland, J. C., Sacks, H. S., Azen, S. P., Dietrich, S. L., Faucett, C., Fletcher, M. A., Kleinman, S. H., Operskalski, E. A., et al. (1990). "Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations". *Ann. Intern. Med.* **113** (10): 733-739.

European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV (1992). "Comparison of female to male and male to female transmission of HIV in 563 stable couples". *BMJ.* **304** (6830): 809-813.

[23] Sharp, P. M., Shaw, G. M. & Hahn, B. H. (2005). "Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees". *J Virol* **79** (7): 3891-902.

[24] Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P. A., Hahn, B. H. & Sharp, P. M. (2003). "Hybrid origin of SIV in chimpanzees". *Science* **300** (5626): 1713.

- [25] Santiago, M. L., Range, F., Keele, B. F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noe, R., Peeters, M., Brookfield, J. F., Shaw, G. M., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (2005). "*Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (Cercopithecus atys atys) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2*". J Virol **79** (19): 12515-27.
- [26] Heeney, J. L., Dalgleish, A. G. & Weiss, R. A.. "*Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS*". Science **313**, (2006): 462-6.
- [27] Coovadia, H.. "*Antiretroviral agents—how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS*". N. Engl. J. Med. **351** (3): 289-292, (2004).
- [28] Smith, D. K., Grohskopf, L. A., Black, R. J., Auerbach, J. D., Veronese, F., Struble, K. A., Cheever, L., Johnson, M., Paxton, L. A., Onorato, I. A. and Greenberg, A. E.. "*Antiretroviral Postexposure Prophylaxis After Sexual, Injection-Drug Use, or Other Nonoccupational Exposure to HIV in the United States*". MMWR **54** (RR02): 1-20, (2005).
- [29] Kaplan, E. H. and Heimer, R, "*HIV incidence among New Haven needle exchange participants: updated estimates from syringe tracking and testing data*". J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. **10** (2): 175-176, (1995).
- [30] Leynaert, B., Downs, A. M. and de Vincenzi, I.. "*Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: variability of infectivity throughout the course of infection. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV*". Am. J. Epidemiol. **148** (1): 88-96, (1998).

2. PROPIEDADES DE TRANSPORTE ELÉCTRICO EN MATERIALES ORGÁNICOS

El campo de transferencia de carga en los materiales orgánicos ha sido objeto cada vez mayor de la investigación por más de 30 años. Inspirados en la naturaleza, la cual es la creadora de las mas perfectas maquinas y sistemas físicos conocidos, los investigadores tratan de revelar el funcionamiento de los organismos vivientes y las estructuras que los conforman. Esta clase de estructuras moleculares en su totalidad exhibe características físicas no convencionales, que incluyen una gran abundancia de transiciones de fase. Por ello presentan interés considerable no sólo para la investigación fundamental, sino también para los muchos potenciales de uso en aplicaciones.

Según diferentes experimentos realizados por diversos grupos de investigación alrededor del mundo, el ADN puede ser conductor, semiconductor, aislante e incluso superconductor [1], además de presentar transiciones entre estos posibles estados dependiendo de parámetros físicos como la temperatura [2]. Las variaciones en las secuencias de ADN utilizadas [3], la dimensión de las mismas y los métodos experimentales usados al medir las propiedades de transporte en ADN indicarían la diferencia en los resultados obtenidos.

Las teorías más recientes consideran la migración de electrones y huecos desde el aceptor al dador. En moléculas como el ADN en una aproximación inicial funciona bien la teoría de bandas, como la que se aplica al estudio teórico del estado sólido y explica la conductividad de metales, semiconductores y aislantes. Sin embargo, consideraciones mas específicas toman los modelos descritos por la

mecánica cuántica para explicar los procesos de transferencia electrónica en el ADN.

2.1 MODELO FÍSICO BÁSICO

La aproximación física básica sobre el transporte de carga está considerada por la ley de Ohm $J=\sigma E$ (o su versión macroscópica $V=RI$). La teoría de Drude describe los mecanismos de la conducción considerando que los electrones forman un gas electrónico libre. La conductividad está dada por:

$$\sigma = \frac{ne^2\tau}{m} = n\mu e \quad (2.1)$$

Donde n es la densidad de carga por unidad de volumen, τ el tiempo de relajación, m la masa (o la masa efectiva en el modelo del electrón casi libre) y μ es la movilidad dada por la proporción de la velocidad del electrón y el campo eléctrico aplicado. Esta es la solución de la ecuación de movimiento para electrones fuertemente acelerados por un campo eléctrico y perdiendo su velocidad por las colisiones inelásticas cada τ segundos en promedio.

La conductibilidad σ varía de un material a otro encima de un rango muy grande de magnitud: hay un factor brusco de 1025 entre la conductibilidad a la temperatura ambiente de los mejores conductores como cobre, y los aislantes, como el cuarzo. También depende, para la mayoría de los materiales, de la temperatura. Una gráfica de conductibilidad en función de temperatura muestra

una pendiente negativa para metales y una pendiente positiva para semiconductores o aisladores, como se muestra en la Fig. 2.1.

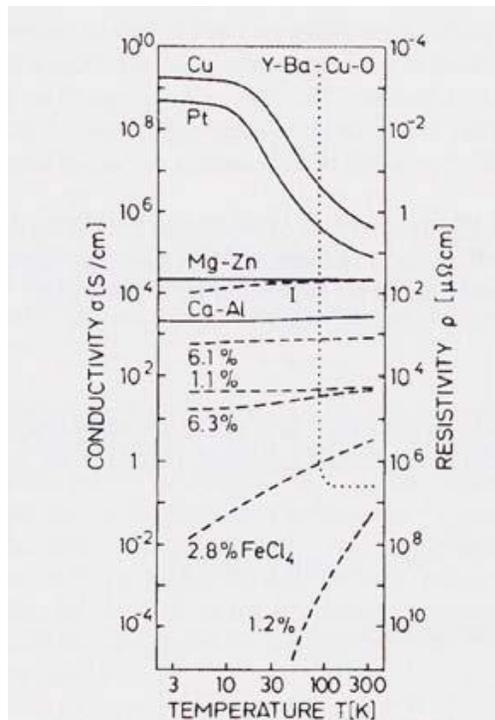


Figura 2.1. Comparación de los valores de conductividad entre metales y algunos polímeros dopados.

En los metales la conductibilidad no aumenta al infinito cuando la temperatura se va a cero.

La conducta asintótica de σ cuando T tiende a 0 es un criterio más pertinente, la conductividad sigue siendo finita para un metal mientras que σ tiende a 0 para un

semiconductor o un aislante. En un metal amorfo, como Mg-Zn o Ca-Al, como ningún orden cristalino es perturbado, la conductividad casi no depende de la temperatura. Las comparaciones con diferentes polímeros dopados muestran que sus conductividades tienen diferentes valores, pero todos disminuyen con una temperatura decreciente. Esta disminución es mucho más lenta que el de semiconductores cristalinos, como por ejemplo la silicona, donde la disminución de la conductividad es esencialmente debida a la congelación de electrones presentes en la banda de conducción. La razón para la disminución de conductividad en los polímeros es debida a la presencia de estados localizados dentro del gap.

2.1.2 Existencia de GAP de Energía

El estado no-metálico es una consecuencia directa de la existencia de un GAP de energía EG. en el nivel de Fermi en el espectro electrónico de la excitación [4]. En general, en un metal simple, la resistencia ρ aumenta casi linealmente con la temperatura T. En un no metal esta conductividad $\sigma = 1/\rho$ aumenta generalmente con T, según una ley de la activación de la forma:

$$\sigma = \sigma_0 e^{(-\Delta/T)} \quad (2.2)$$

En esta expresión la energía de activación Δ se mide en unidades de Kelvin. En una descripción de banda del electrón, el GAP de energía, que es $E_G = 2\Delta$, representa la energía requerida para crear un par de portadores, es decir, promover un electrón a la banda de conducción y simultáneamente, promover un

agujero en la banda de la valencia [5]. Este GAP puede tener un origen estructural puro. Sin embargo, en materiales orgánicos puede también resultar de una Distorsión electrónica de Peierls, o de interacciones electrón-electrón, como en una localización de Mott-Hubbard, o por lo menos en parte de las interacciones electrón ión [6].

2.2 PRIMERA MEDIDA DE CONDUCTIVIDAD REALIZADA EN ADN

La primera medida histórica realizada para hallar la conductividad en ADN fue realizada por D. Eley y D. Spivey [7]. Ellos informaron en 1962 dimensiones de conductibilidad en una oblea de ADN en una célula de presión donde contactaron las obleas con electrodos de platino a una presión de 70 Kg/cm² y en el vacío. Se encontraron conductibilidades que obedecen comportamiento semiconductor:

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{\Delta E}{2k_B T}\right) \quad (2.3)$$

Con una conductibilidad a 400 K en el orden de $10^{-12} (\Omega cm)^{-1}$ y GAP de energía E de 2.4 eV. Se atribuye el resultado de la conductividad al orden de los pares de bases y a la traslapación de los electrones π . También reportaron un comportamiento similar para el ARN. Usando un método similar Snart midió en 1973 un GAP de energía de 2.4 eV y una conductividad de $6.3 \times 10^2 (\Omega cm)^{-1}$ [8].

2.3 MODELOS MECANO-CUANTICOS EN LA TRANSFERENCIA DE CARGA EN ADN

El proceso de transferencia del electrón - el movimiento de carga de una molécula a otra, o de un extremo de una estructura molecular dada a otra - es fundamental en la química y ciencia de los materiales. Estas reacciones son cruciales en procesos que van de la corrosión a la fotosíntesis y lógicamente en las interesantes propiedades fisicoquímicas del ADN.

Las investigaciones modernas combinan ideas generales de cinética químicas con las visiones específicas en cómo los movimientos interiores de moléculas pueden facilitar el movimiento electrónico entre diferentes sitios. Estos cuadros mecánicos fueron generalizados para incluir los efectos mecano-cuánticos.

Como se menciona anteriormente, la sucesión de pares de bases en la estructura de ADN es la responsable de los diferentes comportamientos obtenidos mediante los estudios experimentales. Para entender por qué la sucesión de ADN representa una diferencia, es necesario comparar las energías relativas de los pares de bases G-C y A-T. Estas energías se han deducido ahora de modelos computacionales, los experimentos de fotoemisión y las medidas electroquímicas. El rasgo importante es que un hueco (es decir una carga positiva) es más estable en un par de base G-C que en un A-T [3] (figura 2).

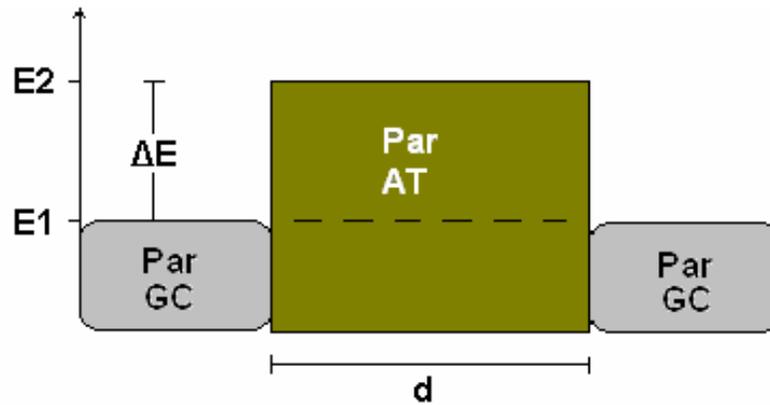


Figura 2.2 Diferencias de energía para pares de bases AT y GC.

También, la diferencia de energía entre estos dos pares es substancialmente más grande que la energía térmica del portador de carga. Bajo estas condiciones, un agujero se localizará particularmente en un par de base G-C. Como el par de bases A-T tienen una energía más alta, actúan como una barrera a la transferencia de carga [9]. Sin embargo, el hueco puede tunelearse coherentemente del primer sitio de G-C al segundo, y puede brincar atrás al primer par de G-C o puede seguir al próximo [9].

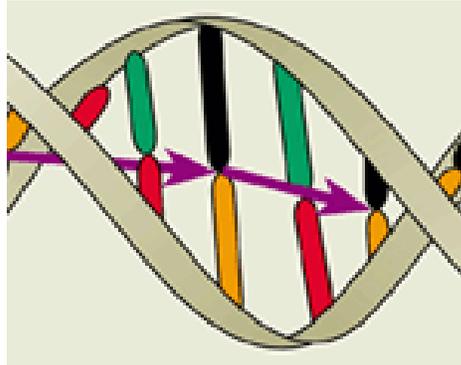


Figura 2.3. Movimiento de carga en la molécula de ADN. Los gráficos verde-rojo son los pares de bases G-C, los cuales son portadores de carga. Los negro-amarillo son los pares A-T son barreras de energía.

La proporción del traslado de carga coherente disminuye exponencialmente con la distancia viajada. Pero cuando la distancia entre los pares de bases G-C se ponen demasiado largos para que los portadores de carga coherentes salten eficazmente, sucede el salto térmico (thermal hopping) [10] el cual es el mecanismo de transferencia de carga dominante. La estructura de ADN es ideal para el traslado del electrón porque algunos de los orbitales que pertenecen a las bases nitrogenadas se superponen bastante bien entre sí a lo largo del eje del ADN. El extenso trabajo experimental y teórico durante los últimos 15 años ha llevado a la clarificación sustancial de mecanismos del traslado de carga en el ADN. Los mecanismos mecano-cuánticos dominantes parecen ser los dos mencionados anteriormente - el tunelamiento coherente (coherent tunnelling) y el salto térmico (thermal hopping).

2.3.1 Tunelamiento Coherente

El efecto túnel es un efecto mecano-cuántico que consiste en que una partícula pueda atravesar una barrera de potencial V_0 sin tener energía suficiente para rebasarla por encima, debido a que la probabilidad de que la partícula se encuentre al otro lado de la barrera no es nula. Esta partícula con una energía E y masa es descrita por la ecuación de Schödinger [11]:

$$\frac{1}{m} \frac{\partial^2 \psi(x)}{\partial x^2} + \frac{2}{\hbar^2} [E - V(x)] \psi(x) = 0 \quad (2.4)$$

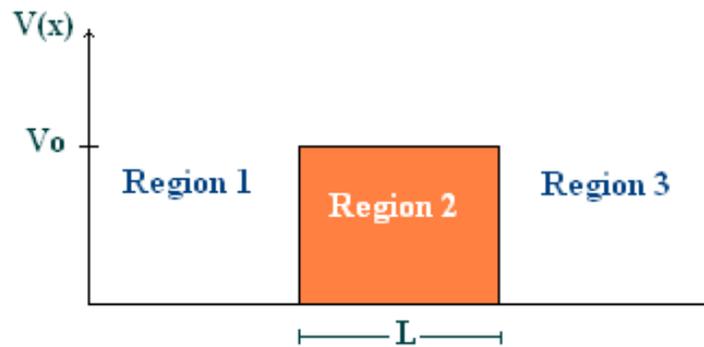


Figura 2.4. Barrera de Potencial.

Donde:

$$V(x) = \begin{cases} 0 & \text{if } x < 0 & \text{(region I)} \\ V_0 & \text{if } 0 \leq x \leq L & \text{(region II)} \\ 0 & \text{if } x > L & \text{(region III)} \end{cases} \quad (2.5)$$

L es la longitud de la barrera de potencial.

La solución a esta ecuación es de la siguiente forma:

$$\psi(x) = \begin{cases} A \exp(ik_1x) + B \exp(-ik_1x) & \text{if } x < 0 \\ C \exp(ik_2x) + D \exp(-ik_2x) & \text{if } 0 \leq x \leq L \\ F \exp(ik_1x) + G \exp(-ik_2x) & \text{if } x > L \end{cases} \quad (2.6)$$

Con $k_1 = \frac{\sqrt{2mE}}{\hbar}$ y $k_2 = \frac{i\sqrt{2m(V_0 - E)}}{\hbar}$

Este efecto es coherente en el sentido de que la partícula no intercambia energía con el medio. Este modelo funciona muy bien en moléculas cortas de ADN, debido a que la probabilidad de tunelamiento depende de la longitud de la barrera de potencial, siendo óptimo para distancias del orden de los 5 Å [9].

2.3.2 Conductibilidad hopping de rango variable

Hopping es una abreviación para Tunelamiento mecano-cuántico asistido por fonones. En un sólido desordenado, algunos de estos estados están localizados en el gap (Ver figura 5), distribuidos al azar en el espacio. Si se excitan los electrones a los estados deslocalizados de energía E_C , entonces la conductibilidad es [12]:

$$\sigma = \sigma_{E_C} \exp\left(-\frac{E_C - E_F}{kT}\right) \quad (2.7)$$

A temperatura ambiente, la energía disponible es demasiado pequeña para semejante excitación, así que los electrones tienen que brincar (túnel) de un estado debajo del nivel de Fermi a un estado localizado cercano del nivel de Fermi.

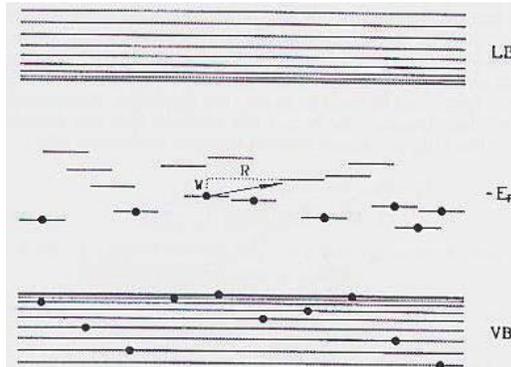


Figura 2.5. Esquema de niveles electrónicos para sólidos desordenados. CB es la banda de conducción y VB es la banda de valencia. Algunos estados se encuentran en el nivel de Fermi.

La probabilidad para este evento es proporcional al factor de Boltzmann $\exp(-W/kT)$, donde W es la diferencia entre estos dos estados de energía. La probabilidad también depende del espectro del fonón y el solape de las funciones de onda. Mott señaló que la distancia de salto R aumenta con el decrecimiento de la temperatura, de ahí el nombre de variable range hopping (salto de rango variable), y viene de la dependencia siguiente $\ln(\sigma) \propto T^{-1/4}$, es de hecho un caso particular de la forma generalizada para la conductibilidad dada por [13]:

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\left(\frac{T_0}{T}\right)^\gamma\right) \quad (2.8)$$

Donde el σ_0 es la conductibilidad en el límite cuando T tiende a infinito, T_0 es un parámetro que depende de la longitud de la localización y de la densidad

electrónica en el nivel de Fermi, y γ depende de la dimensionalidad d del proceso de salto y se da por:

$$\gamma = \frac{1}{1+d} \quad (2.9)$$

En la práctica, es a menudo difícil aclarar los valores para gamma y así distinguir entre uno, dos o tres procesos dimensionales. Esas consideraciones son válidas para un campo DC. Para un campo AC, las teorías y experimentos han mostrado que hay una dependencia de la conductibilidad en la frecuencia si la temperatura es baja y/o la frecuencia es alta [1].

En este proceso incoherente enmarcado en la estructura del ADN, el electrón se localiza en la molécula e intercambia energía con ella. La transferencia electrónica procede en forma de multipasos del donador al aceptador. Los procesos de salto pueden transferir carga por encima de las distancias más largas que los procesos de tunelamiento coherente, y el movimiento como tal se puede considerar como difuso.

2.4 APLICACIONES USANDO ADN

Las excelentes propiedades fisicoquímicas del ADN como el autoensamblado, hibridación selectiva, características eléctricas, ópticas, alta estabilidad y adaptabilidad entre otras sugieren que el ADN posee un gran potencial para el desarrollo de diversas aplicaciones en campos como la ingeniería biomédica, y la electrónica molecular. A menudo, la electrónica molecular sólo se ve como la

formación de dispositivos de lógica y memoria con simples moléculas conductoras. Pero también puede definirse más ampliamente como el área de ciencia y tecnología que estudian electrónica y sensores basados en la organización molecular [14]. Algunas de las presentes y futuras aplicaciones del ADN en los campos de la ingeniería biomédica y electrónica moderna se presentan a continuación.

2.4.1 Conductores Orgánicos

Una medida directa de la resistencia de moléculas sencillas de ADN puede hacerse enganchando la molécula entre dos electrodos de metal y midiendo el funcionamiento eléctrico a través de él. De hecho, medidas en alambres moleculares conductores pequeños [15], incluso aquéllos formados de moléculas pequeñas, como los nanotubos de carbono, han surgido en el campo de los nuevos materiales durante los últimos años. Estos experimentos toman la ventaja de las herramientas desarrolladas por la nanotecnología, incluyendo la litografía de cañón de electrones para la fabricación de nano electrodos y la microscopía de fuerza atómica para obtener imágenes a nivel molecular.

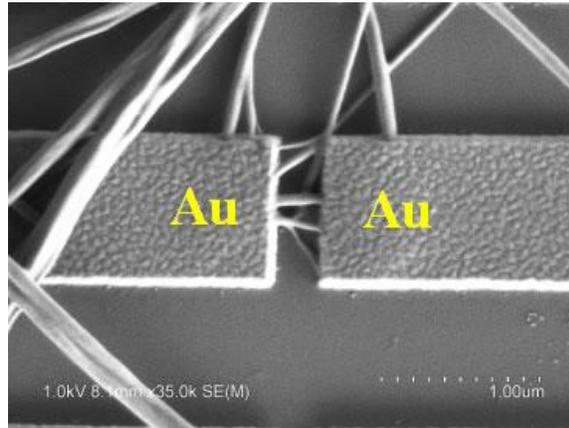


Figura 2.6. Fotografía tomada por SEM de algunas fibras de ADN usadas como conductores moleculares.

Las primeras medidas eléctricas directas en pequeños paquetes de ADN se hicieron en 1999 por Hans-Werner Fink y Christian Schönberger en la Universidad de Basilea en Suiza [16]. Ellos desarrollaron un microscopio electrónico especial de baja energía a alto vacío que pudo obtener la imagen de fibras delgadas independientes de ADN estiradas por un agujero en una membrana. También midieron el conductancia tocando las hebras de ADN con un metal adicional.

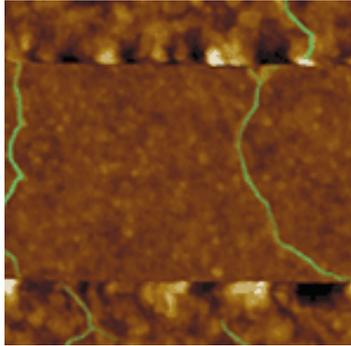


Figura 2.7 Imagen tomada por AFM de hilos de ADN conductor (Línea verde).

Inspirados por los modelos que dan énfasis a la importancia de los pares de bases G-C para el traslado de huecos a través de ADN, hicieron las medidas en moléculas de ADN muy cortas que comprenden una cuerda que contuvo sólo bases de G y una segunda cuerda que contuvo sólo bases de C. El resultado sorprendente de esta técnica era que paquetes de ADN de alrededor de 1 μm en la longitud parece comportarse como un conductor óhmico. Sorprendente también era el valor bajo de la resistencia ($\sim 1 \text{ M}\Omega$) que indica que el ADN es buen conductor. Esto era bastante inesperado porque en el cuadro más simple uno espera que el ADN sea un semiconductor con un GAP grande de energía [17] entre la banda de valencia y la conducción e incluso llegue a ser un aislante [18].

El desafío en este campo ha sido utilizar el potencial de la ingeniería molecular en sintetizar sistemas orgánicos cada vez más conductores. Esto ha conducido a que actualmente se añadan los metales orgánicos y los superconductores orgánicos en el estudio de la física de estado sólido. Uno de los grandes esfuerzos de investigadores esta en estabilizar el estado de superconductividad orgánico en temperatura críticas más altas, compitiendo con investigadores que trabajan en el campo de óxidos superconductores de alta temperatura crítica. Finalmente, el

campo de conductores orgánicos tiene implicaciones interesantes en ciencias biológicas y farmacológicas, proporcionando conceptos y modelos útiles a cualquier problema referido a electroquímica y a los complejos fenómenos de transporte y transferencia de carga.

2.4.2 Diseño de nuevos materiales utilizando el autoensamblaje de ADN

El ADN tiene el potencial de congregarse en redes con una variedad de geometrías [19]. Aunque los pedazos cortos de doble hebra de ADN (debajo de aproximadamente 50 nm) esencialmente forma una pila lineal, estructuras espaciales intrincadas han sido producidas aprovechándose de las propiedades de autoensamblaje de ADN con extremos adhesivos. En particular, Nadrian Seeman y colaboradores en la Universidad de Nueva York han hecho vueltas entrelazadas, nudos, arreglos uni y bidimensionales, cubos tridimensionales y nanoredes basados en estructuras de ADN sintéticas [19] (figura 6). La molécula simplemente se usa como un material del edificio básico para nanoestructuras.

Las ligaduras específicas entre las hebras de ADN pueden proporcionar un elemento importante en el desarrollo de otras moléculas elementales. La geometría y conectividad de circuitos electrónicos futuros podrían ser controladas quizás por el mismo ensamble de ADN, en lugar de por las técnicas de la litografía destructivas. De hecho, las únicas propiedades estructurales que controlan la doble hélice de ADN llevarán ciertamente a aplicaciones muy extensas, porque la variabilidad sintética y propiedades del reconocimiento de ADN son irrepetibles por cualquier otra estructura molecular. Es posible escoger moléculas de ADN para

reconocer otras moléculas de ADN llenando espacios intramoleculares en una forma particular y así mantener un andamiaje estructural de complejas nanoestructuras.

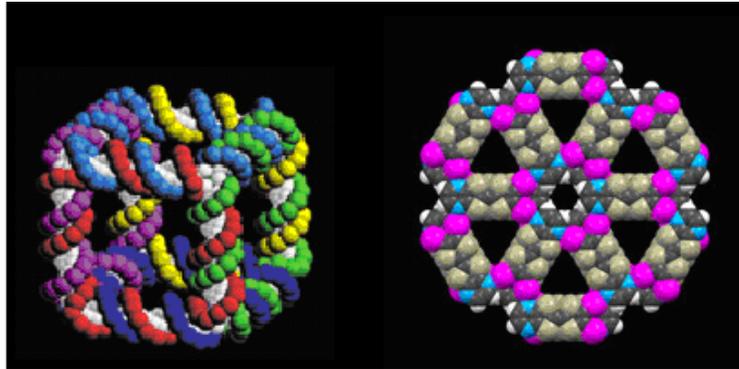


Figura 2.8 Estructuras moleculares diseñadas por medio del autoensamble de ADN.

El ADN puede combinarse con básicamente cualquier grupo químico lateral imaginable [1]. Por ejemplo, una hebra con extremos adhesivos puede atarse a los elementos moleculares eléctricamente activos, como los metales, fulerenos o ciertos interruptores moleculares. Estos grupos pueden localizarse en sitios específicos en las moléculas definidos por la sucesión de bases. Muchos grupos de investigación han usado esta idea para preparar estructuras nanocompositas consistentes de nanoesferas de oro que cubrieron una hebra de fragmentos de ADN. Estos grupos están desarrollando nuevos materiales coloidales hechos de esferas de oro unidas a ADN [20].

2.4.3 Chips de ADN

Una aplicación existente de las propiedades de ensamblaje de ADN está en los llamados chips de ADN [21]. Estos dispositivos se aprovechan del hecho que las hebras cortas independientes, ligarán a otros segmentos de ADN que tiene las sucesiones complementarias (ver Capítulo 1), y puede usarse para sondear así si ciertos códigos genéticos que están presentes en un espécimen dado de ADN.

Una clase importante de estos chips se basan en una tecnología denominada MOCSER (Molecular Controlled Semiconductor Resistor) [22], una simbiosis entre materiales orgánicos e inorgánicos. Esencialmente un dispositivo MOCSER funciona como un típico transistor FET, en el cual por medio de un Voltaje de Puerta o Gate se controla el canal de conducción entre la fuente (Source) y drenador (Drain) (Ver Figura).

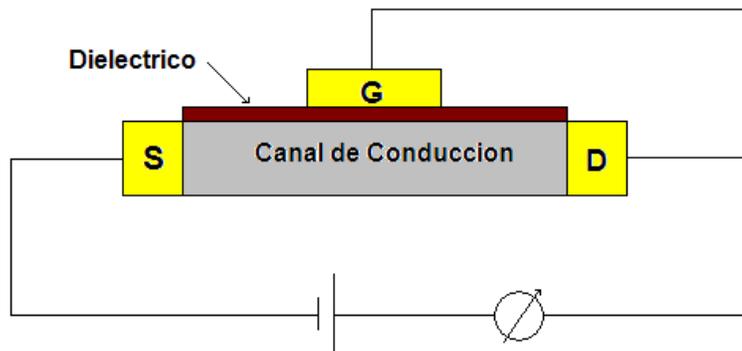


Figura 2.9 Esquema General de un Transistor FET.

La diferencia con el dispositivo MOCSEER radica en que no hay una puerta con la cual controlar el canal de conducción. La puerta y el material dieléctrico son reemplazados por una película de ADN de cadena simple (ssADN) como se muestra en la figura 2.

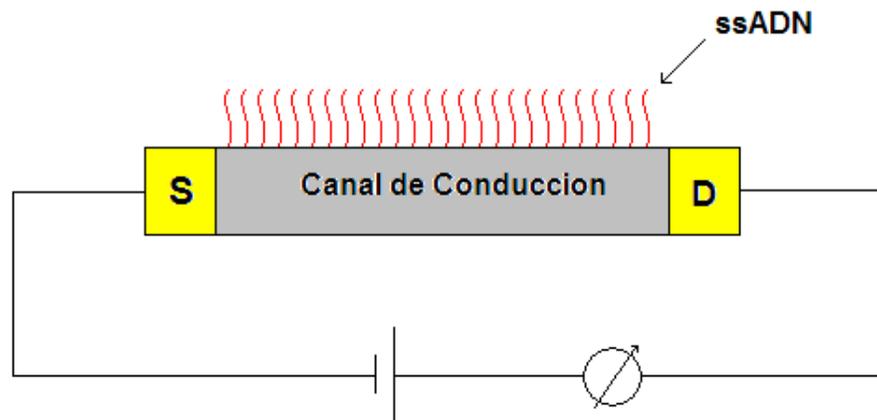


Figura 2.10 Esquema general de un sensor de ADN.

Al obtener una respuesta eléctrica inicial se puede observar un comportamiento típico el cual es provocado por la organización de un dipolo eléctrico a lo largo de las hebras de ADN [23] (Ver figura 3) el cual crea un campo electrostático confinado en la longitud del ADN. En el momento que las moléculas simples encuentran su base complementaria el dipolo es alterado, cambiando así la respuesta eléctrica. Este cambio es detectado, lo cual permite identificar la hibridación del ADN depositado inicialmente.

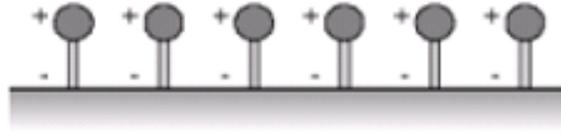


Figura 2.11 Dipolo eléctrico generado en una mono capa autoensamblada de ADN.

Chips micro fabricados con muchas sondas de ADN paralelas están desarrollándose en aplicaciones analíticas y médicas, con las cuales se pueden identificar diferentes secuencias de pares de bases. Estas pueden ser atribuidas a genes que provocan enfermedades o características genéticas específicas. Actualmente, los chips se leen fuera del nivel óptico, pero el proceso de miniaturización podría requerir nuevos esquemas de lectura externa, posiblemente involucrando las propiedades del traslado electrónico de ADN. Estas ideas y aplicaciones podrían aprovecharse de las respuestas electroquímicas diferentes en cadenas sencillas (ssADN) y dobles de ADN (dsADN) que están depositadas sobre distintos tipos de superficies (Metales, semiconductores, etc.). Cabe resaltar que estas cadenas de ADN pueden detectar otros tipos de moléculas utilizando el mismo principio, pero variando su selectividad al modificar la organización y tipo de pares de bases depositados sobre el transistor.

2.4.4 ADN computacional

La idea de realizar computación con ADN no es muy nueva. Moléculas capaces de empaquetar datos son, en varios sentidos, perfectas para la tarea. En 1994 se realizó una demostración pública que mostró que el ADN puede solucionar problemas de lógica computacional [24]. Y ahora Nadrian C. Seeman y sus colegas de la Universidad de New York han encontrado una manera nueva y simple de unir tiras de ADN para simular compuertas lógicas **OR** exclusivas [25].

Las compuertas lógicas binarias, que convierten los unos y ceros de la entrada en unos y ceros a su salida, componen las unidades centrales de proceso de las computadoras digitales. Cualquier cálculo complejo se puede dividir en una serie de pasos pequeños y solucionarse a través de compuertas lógicas. En el caso de una compuerta **XOR (OR exclusiva)**, la regla es simple: cuando entran los mismos dígitos a las dos entradas de la compuerta, aparece un cero a la salida; dos dígitos diferentes en la entrada producen un uno. En este trabajo reciente de computación por ADN, las entradas se reemplazan por moléculas en una sola hebra que determinan la operación porque se envuelven una sobre la otra y los pares de bases se conectan. En esencia, la que define el problema es la colección de moléculas de entrada que se utiliza; una vez que se unen las entradas, la molécula de salida se auto-construye en un solo paso y surge como respuesta. Dos conjuntos de moléculas, al unirse, podrían revelar una clave para descifrar mensajes secretos. El hecho de que las moléculas sólo se pueden juntar una vez aporta una seguridad adicional. Además, se podría programar el ADN para que ciertos materiales inteligentes puedan llegar a construirse a sí mismos.

En el 2001, los científicos del Instituto Weizmann de Ciencia de Israel anunciaron que habían construido una computadora tan pequeña que podrían caber un millón de millones de ellas en una gota de agua [26]. El software de estos artefactos estaba compuesto de ADN y enzimas y podía realizar, en conjunto, mil millones de operaciones por segundo.

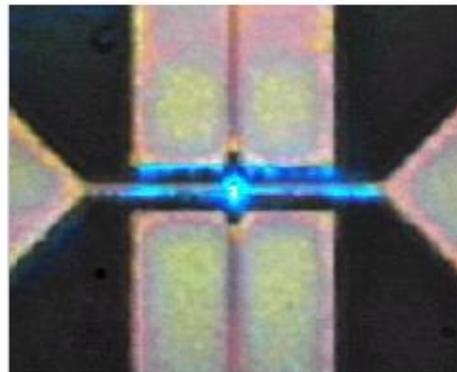


Figura 2.12 Molécula de ADN de entrada (en color verde-azulado), las moléculas del software (en púrpura-rojizo) (Fuente Weizmann Institute of Sciences).

Durante años se han propuesto varios diseños de computadoras minúsculas que apuntan a explotar la capacidad del ADN para guardar cantidades masivas de datos. Los primeros esquemas se basaban en una molécula conocida como ATP, que es una fuente de energía común para las reacciones celulares, a las que aporta combustible. Pero en las nuevas configuraciones, una molécula de ADN provee tanto los datos iniciales como energía suficiente para completar el cómputo.

2.4.5 Detección de enfermedades

Otra aplicación presente al estudiar las características físicas del ADN esta en la detección de enfermedades. Como se vio en el capítulo 1, algunos virus como el VIH pueden alterar directamente la cadena de ADN de las células huésped a las que ataca, como por ejemplo las células sanguíneas (Linfocitos T4). Esa alteración es del orden de los 10000 pares de bases, las cuales directamente afectaran las propiedades fisicoquímicas del ADN infectado. En esta investigación, estudiamos las variaciones en las respuestas eléctricas obtenidas por medio de curvas corriente-voltaje, considerando el ADN humano como un sistema muy complejo y en bloque, del cual solo queremos obtener un patrón de respuesta eléctrica comparado entre ADN humano de pacientes sanos y pacientes con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), en las etapas iniciales de la enfermedad y sin ningún tratamiento medico previo.

REFERENCIAS

- [1] Francois Dewarrat, "*Electric Characterization of DNA*", PhD Tesis, Basel University, 2002.
- [2] Jin-Fu Feng, Xiao-Shan Wu, Shi-Jie Xiong, Shu-Sheng Jiang, "*Temperature dependence of transport behavior of a short DNA molecule*", Solid State Communications 139 (452–455), July 2006.
- [3] R Zikic, S Predrag S. Krstić, X.-G. Zhang, Miguel Fuentes-Cabrera, Jack Wells, and Xiongce Zhao, "*Characterization of the tunneling conductance across DNA bases*", Physical review E 74, 011919, 2006.
- [4] Samir M. Iqbal, G. Balasundarama, Subhasis Ghosh, D. E. Bergstromb, R. Bashirc, Applied Physics Letters 86, 2005.
- [5] Kytel Charles, "*Introduction to Solid State Physics*", (Wiley: New York, 1996).
- [6] Farges Jean Pierre, "*Organics conductors, fundamentals and applications*", Pag 313, 1994.
- [7] D. D. Eley and D. I. Spivey, "*Semiconductivity of Organic Substances*", Trans. Faraday Soc. 58, 411, 1962.
- [8] R. S. Smart, "*The electrical properties and stability of DNA to UV radiation*"

and aromatic hydrocarbons", Biopolymers 12, 1493, 1973.

[9] R Bentata, S Bentata, "*Study of Tunneling Transport in disorder DNA structures*", Journal of Applied Sciences 7 (3), 2007.

[10] Songshan Ma, Hui Xu, Xiaoliang Liu, Mingjun Li, "*Hopping conductivity of DNA sequences with off-diagonal correlations*", Physica B, 391, 2007.

[11] W Greiner, *Quantum Mechanics an Introduction*, Fourth Edition, Springer, pag 117, 1989.

[12] S. Roth, *One-dimensional metals*, VCH Weinheim, 1995.

[13] N. F. Mott and E. A. Davis, "*Electronic processes in non-crystalline materials*", Clarendon press, Oxford, 1979.

[14] C. Joachim, J. K. Gimzewski, and A. Aviram, "*Electronics using hybridmolecular and mono-molecular devices*", Nature 408, 541, 2000.

[15] R. F. Service, "*Molecules get wired*", Science 294, 2442, 2001.

[16] H.-W. Fink and C. Schonenberger, "*Electrical conduction through DNA Molecules*", Nature 398, 407, 1999.

[17] K. H. Yoo et al., "*Electrical conduction through poly(dA)-poly(dT) and poly(dG)-poly(dC) DNA molecules*", Phys. Rev. Lett. 87, 198102, 2001.

- [18] A. J. Storm, J. van Noort, S. D. Vries, and C. Dekker, “*Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale*”, Appl. Phys. Lett. 79, 3881, 2001.
- [19] J. Chen and N. C. Seeman, “*Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube*”, Nature 350, 631, 1991.
- [20] Y. Maeda et al., “*Controlled conjugation of nanoparticles with single stranded DNA*”, J. Vac. Sci. Technol. B 17, 494, 1999.
- [21] R. Moeller and W. Fritzsche, “*Chip-based electrical detection of DNA*”, IEE Proc.-Nanobiotechnol., Vol. 152, No. 1, February 2005.
- [22] A Ulman, “*An Introduction to Ultrathin Organic Films from Lagmuir-Blodget to Self Assembly*”, Part Three, Academic Press, 1991.
- [23] V.S. Lvov, R. Naaman, Z. Vager, V. Tiberkevich, Chem. Phys. Lett. 381, 2003.
- [24] Y. Benenson et al, “*Programmable and autonomous computing machine made of biomolécules*”, Nature 414, 430, 2001.
- [25] D Silva Prasanna and S Uchiyama, “*Molecular logic and computing*”, Nature nanotechnology vol 2, July 2007.
- [26] E Shapiro, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Este capítulo tiene por objetivo hacer una descripción de las técnicas experimentales utilizadas para la caracterización eléctrica realizada en el ADN humano y bacteriano. Como primera medida se realizó el diseño y creación del montaje experimental para la ubicación de muestras de ADN, teniendo en cuenta la alta relevancia de parámetros como:

- Temperatura
- Humedad
- Presión
- Ruido Eléctrico

Para evitar el ruido eléctrico, se realizó blindaje eléctrico a todos los cables de conexión del sistema. Así mismo, se escogieron substratos aislantes que tuvieran alta afinidad para la evaporación de metales nobles (Cuarzo y Titanato de estroncio) y así reducir al máximo la influencia externa de corrientes parasitas.

Posteriormente se hizo una adecuación del sistema de adquisición usado en para la caracterización eléctrica, equipos que se encuentran en el Laboratorio de Física de Bajas temperaturas Edgar Holguín del departamento de Física de la Universidad del Cauca. Esto se realizó con el fin de obtener automáticamente las curvas corriente voltaje y resistencia temperatura con un alto grado de fidelidad y reduciendo al máximo la influencia de los parámetros externos anteriormente mencionados.

3.1 DISEÑO DEL MONTAJE EXPERIMENTAL

Se diseñó un montaje experimental en sustratos aislantes de 1 cm^2 de área de cuarzo (SiO_2) y Titanato de estroncio (SrTi).



Figura 3.1. Sustrato con un capa plana evaporada de plata.

El espacio escogido para la ubicación de ADN fue de 1 mm^2 , adecuado para la ubicación de $5\ \mu\text{l}$ de ADN, la cual fue la cantidad estándar para todas las mediciones. El montaje experimental cuenta con el sustrato aislante (Cuarzo o Titanato de Estroncio) y una capa de plata evaporada que reproduce el diseño de cuatro puntas creado en las mascararas, dejando el espacio entre las puntas como se muestra en la figura 3.2.

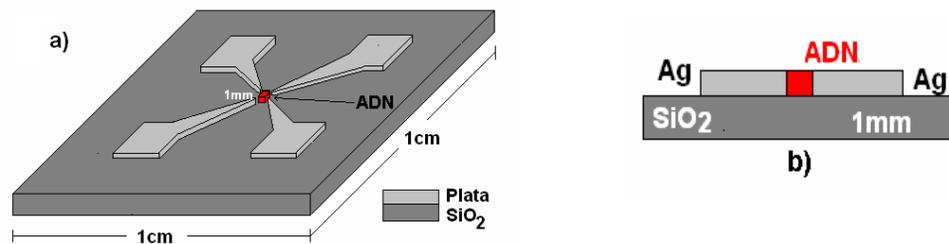


Figura 3.2. a) Montaje Experimental, b) Vista lateral.

3.1.1 Diseño de máscaras

Se diseñaron máscaras de aluminio de 1cm^2 de área con el objetivo de crear un esquema experimental que permitiera realizar la caracterización eléctrica sobre las muestras de ADN obedeciendo el método de las cuatro puntas. Las máscaras recrean un diseño en forma de cruz con cuatro electrodos, dejando un espacio entre ellas de 1mm^2 , espacio en el cual se depositan las muestras de ADN (Ver figura 3.3). Las mascararas fueron esterilizadas y colocadas cuidadosamente sobre la superficie del substrato previamente al proceso de evaporación de metales.



Figura 3.3. Mascara de Aluminio para la creación del diseño experimental.

3.1.2 Evaporación de metales

Los contactos eléctricos de plata evaporados sobre los diferentes substratos usados se fabricaron mediante la técnica de deposición mediante evaporación térmica la cual fue implementada en un sistema de pulverización catódica reactiva asistida con campo magnético y fuente de radiofrecuencia Magnetron Sputtering

R.F, el cual posee una serie de evaporadores que soportan una góndola de tungsteno conectado a una fuente de corriente regulada de alto amperaje (hasta 10 A).

3.1.2.1. Evaporación térmica en vacío

La técnica de deposición por evaporación térmica en vacío consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. El vapor del material termina condensándose en forma de lámina delgada sobre la superficie fría del sustrato y las paredes de la cámara de vacío. Normalmente la evaporación se hace a presiones reducidas, del orden de 10^{-6} o 10^{-5} Torr, con objeto de evitar la reacción del vapor con la atmósfera ambiente. A estas presiones bajas, el recorrido libre medio de los átomos de vapor es del orden de las dimensiones de la cámara de vacío por lo que estas partículas viajan en línea recta desde la fuente de evaporación (crisol) hasta el sustrato. Esto da lugar a fenómenos de “sombreado” en piezas de 3D sobre todo en aquellas regiones no directamente accesibles desde la fuente de evaporación [1]. Al mismo tiempo, en las técnicas de evaporación térmica la energía media de llegada de los átomos de vapor a la superficie del sustrato suele ser baja (del orden de kT , es decir décimas de eV) lo cual puede afectar seriamente la morfología de las capas, resultando frecuentemente un material poroso y poco adherente [1].

En las técnicas de evaporación térmica, el calentamiento del material puede llevarse a cabo por diferentes métodos. En los equipos disponibles en el laboratorio se utiliza bien sea el calentamiento mediante resistencia (efecto Joule) o bien sometiendo el material a un bombardeo intenso de electrones de alta

energía, generalmente varios KeV, procedentes de un cañón de electrones (calentamiento por haz de electrones)

3.1.2.1.1 Evaporación por calentamiento mediante resistencia

En la técnica de deposición mediante evaporación, el calentamiento del material hasta la fusión se lleva a cabo mediante el paso de corriente eléctrica a través de un filamento o placa metálica sobre el cual se deposita el material (efecto Joule). El material en forma de vapor se condensa entonces sobre el sustrato. También se usan otras formas de calentamiento como el de inducción mediante una bobina de RF rodeando un crisol de grafito o de BN, donde se funde el material que se quiere evaporar. El montaje de la técnica es simple, y resulta muy apropiada para depositar metales y algunos compuestos de bajo punto de fusión (Al, Ag, Au, SiO, etc.). Los metales típicos usados como resistencia de calentamiento son el tantalio (Ta), molibdeno (Mo), wolframio o tungsteno (W) los cuales presentan una presión de vapor prácticamente nula a la temperatura de evaporación ($T_{\text{evap}} = 1000\text{-}2000$ °C) [2].

3.1.3 Sistema de deposición mediante evaporación térmica.

Los electrodos fueron evaporados utilizando el método de deposición mediante evaporación térmica en el sistema Balzer BAE 250, el cual se muestra en la figura 3.4.



Figura 3.4 Sistema de evaporación.

El sistema utilizado para la fabricación de los electrodos de plata cuenta con las siguientes partes:

- ❖ Cámara de Vacío:
- ❖ Fuente de Corriente de 0 hasta 10 A.
- ❖ Cilindro de suministro de argón.
- ❖ Válvula micrométrica (para control de la entrada de argón en la cámara).
- ❖ Sistema de vacío (Bomba mecánica de paletas rotatorias y bomba turbomolecular).
- ❖ Shutter.
- ❖ Evaporadores
- ❖ Filamento de Tungsteno.
- ❖ Boat Heaters (Crisoles de Grafito)
- ❖ Sensores de presión.

En este trabajo se utilizaron substratos de SiO_2 y Al_2O_3 debido a sus propiedades dieléctricas (ver anexo) y sobre ellos se evaporaron contactos eléctricos de plata

3.1.4 Proceso de evaporación de contactos eléctricos de plata.

Para la realización del proceso de evaporación de los contactos eléctricos fue necesario realizar con anterioridad, una limpieza de los substratos usados. Mediante el uso de un ultrasonido marca Branson 1200 se limpiaron los substratos en acetona, etanol y agua desionizada. Posteriormente fueron sometidos a un flujo de nitrógeno para evitar moléculas de oxígeno adheridas a la superficie del substrato.

Estos substratos fueron ubicados junto con las máscaras en una cámara de vacío cilíndrica asistida por una bomba mecánica rotatoria que sirve de precursora y una bomba turbo molecular, las cuales evacúan la cámara hasta alcanzar una presión de vacío de 10^{-7} mbar, la cual puede ser controlada a un nivel de vacío requerido mediante la inserción de gas inerte, en este caso Argón.

Ya en un ambiente libre de contaminación y una presión de alto vacío, se calentó el filamento de tungsteno pasando una corriente a través de este filamento, de manera que alcanzara la temperatura de evaporación del metal, en este caso es plata (temperatura de evaporación de la plata 2212°C), fabricando así los contactos eléctricos sobre la superficie de los substratos.

3.2 TÉCNICAS DE ALINEACIÓN DE ADN

Una técnica usada para manipular las hebras de ADN en una solución es por medio de un campo eléctrico. A manera general los grupos fosfato en el esqueleto del ADN se encuentran desprotonizados y el ADN se carga negativamente. La electroforesis es un ejemplo de esta técnica y usa este efecto de carga para ordenar las cadenas de ADN e incluso algunas proteínas como una función de la longitud de las hebras y el campo eléctrico DC aplicado.

3.2.1 Electroforesis

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Fue empleado por primera vez en el año 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L. Durrum y Arne W.K. Tiselius, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas microscópicas, se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular [3].

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas

positivamente se desplazaran hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazaran hacia el ánodo (el polo positivo). El movimiento de las moléculas esta gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone; por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión. La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzaran a moverse formando un frente cuya anchura aumentara con el tiempo. Para reducir el ancho de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga mas resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será mas lenta, pero el ensanchamiento del frente se vera reducido también [4].

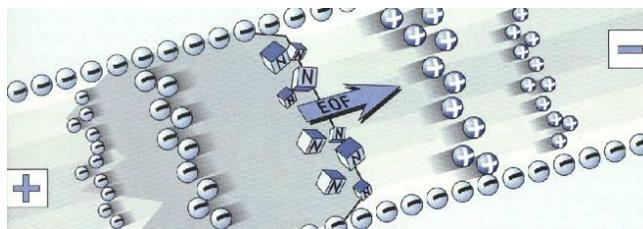


Figura 3.5. Esquema general del efecto de un campo eléctrico en presencia de moléculas orgánicas.

3.2.2 Alineación por campo eléctrico de corriente alterna AC

Hemos usado un método donde un campo eléctrico AC es aplicado entre electrodos de plata. La manipulación de ADN esta basada en la interacción de un momento dipolar inducido entre el ADN y el campo eléctrico aplicado.

3.2.2.1 Modelo Físico

Cuando la solución de ADN es expuesta a un campo no homogéneo, pueden ocurrir dos efectos en el ADN. El primero es un torque que alinea el ADN con el campo eléctrico. El segundo es una fuerza dielectroforética la cual lleva el ADN en la dirección donde el campo eléctrico es mas fuerte [5].

Este efecto es llamado dielectroforesis positiva y ocurre cuando la polarizabilidad de la molécula en la solución es mayor que la del medio. Cuando es al contrario, es decir la polarizabilidad de la molécula es menor que la del medio entonces es llamada dielectroforesis negativa. Ambos efectos dependen de la polarizabilidad α del ADN la cual es supuestamente afectada fuertemente por las nubes de carga alrededor de la solución. Para una neutral aproximación en un campo eléctrico no uniforme la fuerza electroforética se puede escribir como [6]:

$$\vec{F}_d = \vec{p} \cdot \vec{\nabla} \vec{E} = \alpha \vec{E} \cdot \vec{\nabla} \vec{E} = \frac{\alpha}{2} \vec{\nabla} (E^2) \quad (3.1)$$

Donde α es la polarizabilidad del objeto, p es el momento dipolar inducido ($\alpha \vec{E}$) y \vec{E} es el campo eléctrico aplicado.

La polarizabilidad puede ser escrita como $\alpha_V V$, donde α_V es la polarizabilidad por unidad de volumen y V es el volumen.

Para describir que pasa en una solución, la ecuación anterior debe incorporar la permitividad de la solución, así que la polarizabilidad por unidad de volumen es dada por [7]:

$$\alpha_V = \frac{\epsilon_0 \epsilon_1 (\epsilon_2 - \epsilon_1)}{\epsilon_1 + A(\epsilon_2 - \epsilon_1)} \quad (3.2)$$

Donde ϵ_1 es la permitividad del medio, ϵ_2 es la permitividad de la molécula y A es un factor geométrico el cual varía desde cero hasta 1 (Por ejemplo $A=1/3$ para una esfera y 1 para una varilla corta). Como ϵ_1 es mucho mayor que ϵ_2 en caso de ADN en agua [8], la ecuación 3.2 puede ser simplificada y la fuerza se puede escribir como:

$$\vec{F}_d \approx V \epsilon_0 \epsilon_1 \vec{\nabla}(E^2) \quad (3.3)$$

Una aproximación general en el valor del campo eléctrico necesario para vencer las fluctuaciones térmicas puede ser obtenido al integrar la ecuación 3 en el límite de la distancia de los electrodos y comparar el resultado con:

$$E_{th} \approx \sqrt{k_B T / (r^2 l \epsilon_0 \epsilon_1)} \lesssim 10^7 \text{ V/m.}$$

Lo cual muestra que el campo que se usará debe ser relativamente grande (Del orden de los 1V). La fuerza considerada en este caso es la ejercida por cada fibra de ADN y cada segmento no varia por las fluctuaciones. Los otros parámetros usados para el calculo son el radio= 1nm y la permitividad del agua= 80.

El Segundo efecto es la alineación de las moléculas con el campo. Como el ADN puede verse como una cadena de segmentos rígida, el efecto de alineación actuara en cada una de ellas, resultando moléculas completamente alineadas, excepto si se han formado nodos en ella. El torque en cada parte rígida es dado por:

$$\vec{M} = \vec{p} \times \vec{E} \quad (3.4)$$

La molécula experimenta una fuerza de estiramiento que puede ser estimada en una aproximación general por la suma de las fuerzas electrostáticas opuestas $F = \pm q \cdot E$, exceptuando en los extremos de la molécula. La carga es dada por p/l , donde l es la longitud de la molécula. Un valor de 10^5 fue obtenido para ADN de moléculas de $1.5 \mu\text{m}$ de longitud [9]. La fuerza es del orden de 0.2 pN para un campo eléctrico de 10^6V/m . Estos resultados fueron obtenidos por Washizu [9] y Dewarrat [6] quienes probaron satisfactoriamente la técnica para campos eléctricos ac.

3.2.3 Desarrollo Experimental de la Alineación de ADN.

El proceso de alineación de ADN presenta una alta relevancia en la reproducibilidad de los resultados obtenidos. El ADN es un material anisotrópico [10] y es de vital importancia asegurar que la corriente que atraviesa la muestra lo haga siempre en el mismo sentido. Para ello se diseñaron electrodos simétricos lineales de plata sobre substratos que son portables, con el fin de conectar un generador de funciones TW GFG80D y exponer el ADN a un campo eléctrico de corriente alterna. Los parámetros escogidos experimentalmente para tal fin fueron los siguientes:

Vpp	0.5 V
Frecuencia	60 Hz
Tiempo de Exposición	120 s

Tabla 3.1 Parámetros de la señal AC para la alineación de ADN.

Se escogieron estos valores de voltaje y frecuencia con el fin de ser lo suficientemente fuertes para alinear adecuadamente las fibras de ADN pero previendo la posible degradación provocada por el campo eléctrico en el ADN. El tiempo de exposición fue de 2 minutos debido a que es necesario dar un tiempo prudencial para que las hebras se alineen en la dirección del campo y se unan entre ellas. Sin embargo, exponer el ADN por mucho tiempo a la influencia de un campo eléctrico puede provocar el deterioro de la muestra. Así que el tiempo de

exposición fue implementado considerando estos dos factores Cabe resaltar que la técnica fue implementada con éxito y perfeccionada en la pasantía de investigación realizada en el Weizmann Institute of Sciences de Israel (Ver anexo 1).

3.3 CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA

3.3.1 Curvas Corriente –Voltaje

Una curva I-V es un argumento cartesiano de la tensión a través de un resistor representan gráficamente en función de la corriente que fluye a través de esa resistencia. Típicamente, la tensión es graficada en el eje "x" y la corriente en el eje "y". La curva I / V no es más que una grafica de la ecuación $V = IR$ [2] (Ley de Ohm), donde V = voltaje, I = corriente y R =resistencia. Aunque las curvas I / V curvas son aplicables a cualquier sistema eléctrico, encuentran un amplio uso en el estudio de la electricidad biológica, en particular en el ámbito de la subcontratación electrofisiología. En este caso, la tensión se refiere a la tensión a través de una membrana biológica, o el potencial de la membrana, y la corriente es el flujo de iones cargados a través de los canales en esta membrana. La resistencia se determina por la conductancia de estos canales.

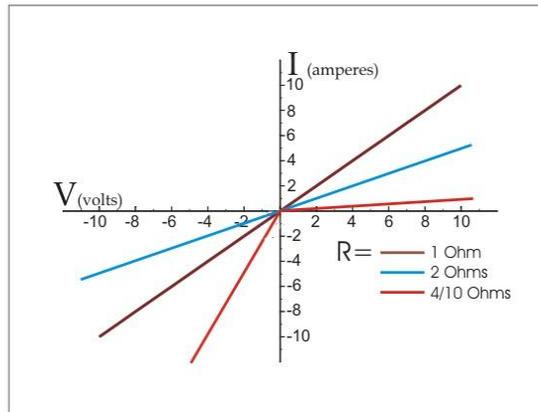


Figura 3.6. Curva I-V típica para dos resistencias óhmicas (Azul y Café). La línea roja es la respuesta I-V de un resistor rectificador.

La caracterización I-V realizada en moléculas como el ADN requiere un grado elevado de sofisticación. En este tipo de moléculas es importante considerar los efectos de la corriente en la degradación de las muestras. Por esta razón, es necesario colocar en el ADN corrientes muy pequeñas. En la presente investigación se introdujeron corrientes desde -1000nA (nanoamperios, donde 1 nanoamperio equivale a 10^{-9} A) hasta 1000 nA, con incrementos de 10 nA. Para ello se usó una fuente de corriente Keithley 2400, la cual posee un error de 0.05 nA. La medición del voltaje de respuesta fue realizada por medio de un nanovoltmetro digital de alta sensibilidad Keithley 182, el cual posee un error de 1 nV (1 nanovoltio equivale a 10^{-9} V).

El esquema general utilizado (Ver figura 3.7) obedece al método de cuatro puntas, en el cual a través de dos electrodos de plata se hace circular la corriente mientras que por los otros dos electrodos se procede a medir el voltaje.

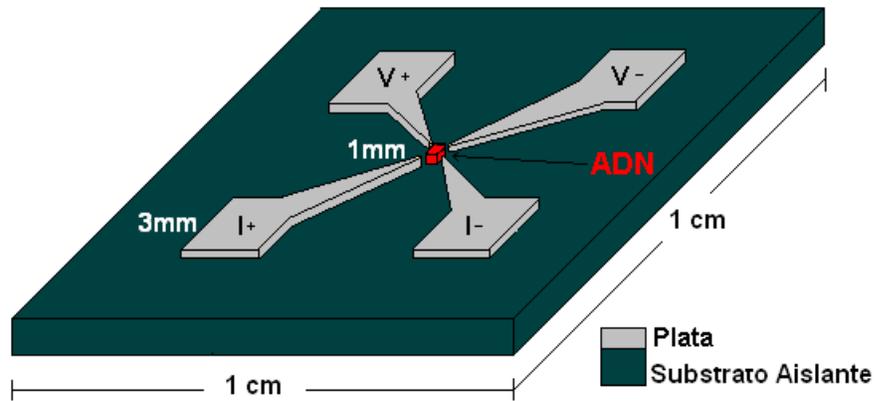


Figura 3.7. Esquema de las cuatro puntas usado para la caracterización Corriente-Voltaje de ADN.

Debido a que las corrientes usadas son bastante pequeñas, el sistema completo se sometió a un blindaje eléctrico de los cables que conectaban la fuente de corriente y el nanovoltímetro al montaje experimental y posteriormente al sistema de adquisición de datos. Así mismo, filtros digitales pasa bandas fueron implementados para reducir en mayor escala la influencia del ruido eléctrico en los resultados obtenidos.

3.3.2 Curvas Resistencia Temperatura

La caracterización resistencia temperatura consiste en obtener curvas de resistividad en función de la temperatura, el sistema que permite realizar esto es capaz de controlar la temperatura desde -253°C a 100°C , y a través del método de las cuatro puntas obtener las medidas de resistividad.

El método de las cuatro puntas en esta caracterización es usado para conectar la muestra de ADN a la fuente de corriente y el nano voltímetro de tal manera que permita registrar los valores de resistencia eléctrica



Figura 3.8. Horno calefactor del criostato (izq), criostato de circuito cerrado de Helio (der).

El sistema en el cual es depositada la muestra se muestra en la figura 2. Para aumentar la temperatura, se utiliza un horno calefactor el cual posee un enrollamiento de manganina de 25Ω y además, disponemos de un criostato en circuito cerrado de helio que permite bajar la temperatura de manera mas eficiente que por inercia térmica, alcanzando temperaturas de hasta 20°K , el sensor de temperatura es un diodo de silicio DT470, y tanto éste como el cable se encuentran conectados al controlador de temperatura Lakeshore 330.

La temperatura de todo el sistema es controlada con una precisión del orden de los milikelvin y esta ventaja de controlar la temperatura con ese grado de eficiencia fue usada para la obtención de curvas corriente voltaje para el ADN de bacteria e coli a diferentes temperaturas. La fuente de corriente y el nanovoltmetro están interfazados con el PC a través de una tarjeta de adquisición de datos GPIB y el protocolo ANSI/IEEE.

3.4 ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA DE DATOS

3.4.1 Descripción del bus GPIB

GPIB es un estándar de conexión que permite la comunicación de un ordenador con instrumentos electrónicos de medida, como pueden ser generadores de funciones, osciloscopios, etc. Las siglas corresponden a General Purpose Interface Bus, pero a pesar de este nombre, fue diseñado específicamente para la conexión de instrumentos de medida. Fue creado en 1965 por la compañía Hewlett-Packard, que lo denominó originalmente HP-IB, y se popularizó con rapidez, debido a sus altas tasas de transferencia de datos (8 Mbytes/s). Para evitar la dispersión de características, los principales fabricantes acordaron la estandarización del GPIB en 1975 (IEEE 488.1), centrándose en las características eléctricas y mecánicas del bus. Una segunda estandarización (IEEE 488.2 de 1987) delimitó de forma más concreta la programación del GPIB, definiendo comandos de aparatos, formato de mensajes y estado de los instrumentos. El siguiente paso de importancia fue la adopción del formato de comandos SCPI, que estructura las órdenes a los aparatos de forma coherente,

permitiendo (hasta cierto punto), la sustitución de instrumentos de distintos fabricantes con mínimos cambios [11].

3.4.2 Estructura de un sistema GPIB

Un sistema GPIB consiste en una serie de instrumentos de medida conectados a un bus, y controlados, normalmente, por un PC dotado de una tarjeta GPIB. Existe bastante libertad en la configuración topológica del bus, que, en general, es una combinación de disposiciones lineales y en estrella, como se muestra en la figura 3.9.

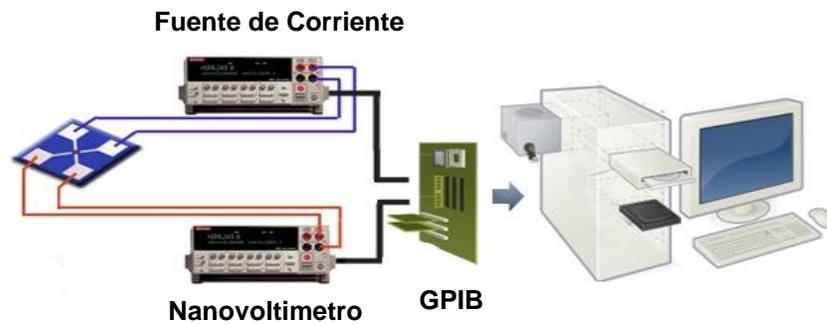


Figura 3.9. Ejemplo de configuración de un sistema GPIB.

El dispositivo controlador (normalmente un PC dotado de una tarjeta GPIB) gestiona el flujo de datos y comandos a los diferentes elementos del sistema [9].

En nuestra aplicación, se han interfazado al computador los siguientes dispositivos:

- Fuente de corriente Keithley 2400.
- Nanovoltímetro Keithley 182.
- Controlador de Temperatura Lakeshore 330.

En la figura 3.10 se puede observar los instrumentos de medición con los cuales se realiza la caracterización eléctrica corriente voltaje y resistencia temperatura presentes en el laboratorio de Física de Bajas Temperaturas de la Universidad del Cauca.



Figura 3.10. Sistema de caracterización y adquisición de datos del laboratorio de Física de Bajas Temperaturas Edgar Holguín.

3.4.3 Modificaciones realizadas en el sistema de Adquisición de datos

El sistema de adquisición automática de datos que se encuentra en el laboratorio de Física de Bajas Temperaturas Edgar Holguín esta compuesto por un sistema formado por un conjunto de equipos con interface GPIB, todos comunicados al computador mediante una tarjeta GPIB de la National Instruments. Los programas utilizados para introducir los datos automáticamente al computador fueron actualizados desarrollándolos en lenguaje Labview 8.0; puesto que el sistema anterior estaba desarrollado en lenguaje Labview 5.0 y su ejecución se efectuaba sobre la plataforma de Windows 98.

La primera parte de la adecuación consistió en la actualización del computador utilizado para la adquisición de datos a un modelo más reciente con sistema operativo Windows XP y el modelo de la tarjeta de adquisición de datos GPIB. Las ventajas que ofrece este cambio es que el sistema actual posee una mayor velocidad de procesamiento, menor tiempo de muestreo, más compatibilidad con equipos recientes y equipos que manejaban el anterior protocolo (IEE 488.1). Además la interfaz de usuario es más amigable y los programas fueron optimizados para un mejor rendimiento haciendo uso de menos rutinas y operaciones mucho más simples gracias un paquete nuevo de herramientas con las que no se contaban en la versión 5.0.

En las siguientes figuras se presenta una comparación de los programas desarrollados en Labview utilizados para la adquisición automática de las curvas corriente voltaje, anteriores (Figura 3.11) y actuales (Figura 3.12) desarrollados en el laboratorio de física de bajas temperaturas de la Universidad del Cauca.



Figura 3.11. Software anterior desarrollado en Labview 5.0.

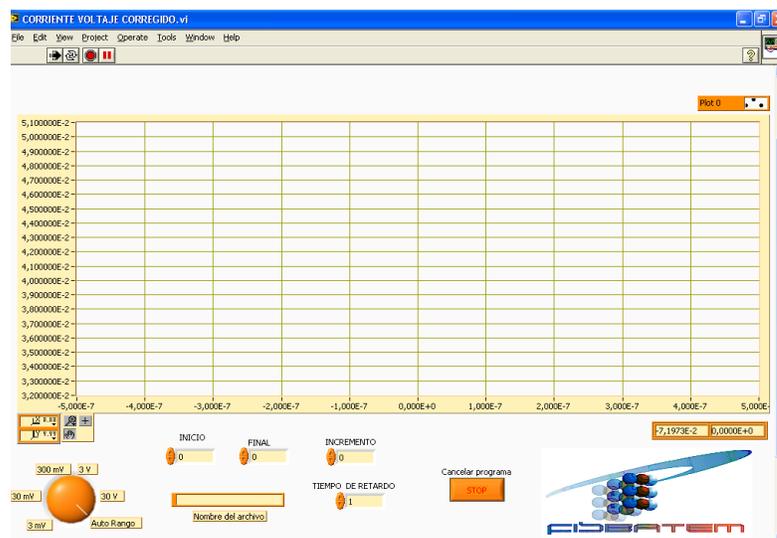


Figura 3.12. Software creado en Labview 8.0 para la adquisición automática de datos para medidas corriente voltaje.

Los diagramas en bloque de la programación realizada en Labview se mostrarán en los anexos de este documento (Ver anexo 3). El cambio en los programas se debe a que los rangos de corriente con las que hicieron las medidas de corriente voltaje y resistencia temperatura son mucho menores a los rangos que se usaban anteriormente en el laboratorio de física de bajas temperaturas. Así mismo el grado de sensibilidad requerido en las mediciones es mucho mayor debido a que para evitar daños considerables en las muestras de ADN estas fueron sometidas a corrientes del orden de los nanoamperios, corrientes que requieren un alto control del proceso y así realizar adecuadamente la caracterización eléctrica sobre estas moléculas.

REFERENCIAS

- [1] H. Ohyama, T. Aramoto, H. Higuchi, S. Shibutani, T. Nishio, M. Tsuji, T. Hibino, K. Okamura and M. Murozono, Proc. 26th IEEE PVSC, Anaheim, CA 343, 1997.
- [2] C Rebollero, P Jimenez, "*Ciencia de los materiales, Teoría ensayos y tratamiento*", Ediciones Pirámide, 2006
- [3] E.D.P. de Robertis, E.M.F. de Robertis. *Biología Molecular y Celular I y II*, 1995.
- [4] T Berkelman, T Stenstedt, "*Electrophoresis and Comparison with That by Bacteriophage Typing*". J.Clin. Microbiol 1997.
- T Berkelman, T Stenstedt, *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & methods*. Amersham Pharmacia Biotech Inc.1998.
- [5] H. A. Pohl, *Dielectrophoresis*, Cambridge university press, 1978.
- [6] Francois Dewarrat, "*Electric Characterization of DNA*", PhD Tesis, Basel University, 2002.
- [7] R. Pethig, "*Dielectric and electronic properties of biological materials*", John Wiley and Sons, 1978.
- [8] S. Takashima, "*Electrical Properties of Biopolymers and Membranes*", Adam Hilger,1989.

[9] M. Washizu and O. Kurosawa, "*Electrostatic manipulation of DNA in microfabricated structures*", IEEE Transactions on industry applications 26, 1165, (1990).

[10] Okahata Y, T Kobayachi, K Tanaka and Shimomura, "*Anisotropic electric conductivity in an aligned DNA cast film*", J. Am. Chem. Soc. 120. 6165-6166.

[11] C Quinayás, "*Fabricación y caracterización magnética de películas delgadas de dióxido de vanadio VO₂*", Tesis Ingeniería Física, 2005.

[12] IEEE, "*IEEE - 488 - 1987 standar digital interface for programmable instrumentation*". New York, 1987.

W.J Tomokins y J. G Webster J.G. (Ed.): "*Interfacing sensor to the IBM PC*", Prentice Hall,1988.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANALISIS

En el presente capítulo se presentan los resultados de la caracterización eléctrica obtenida por medio de curvas corriente-voltaje y resistencia-temperatura para muestras de dsADN (ADN de doble hélice) de ultra alta pureza procedente de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y dsADN Humano extraído de células sanguíneas, biológicamente inactivado, procedente de pacientes con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida y ADN Humano de personas sanas.

Todas las muestras se extrajeron con el mismo protocolo de extracción (ver anexos 4 Y 5). Sin embargo, la muestra de ADN bacteriano y el ADN Humano de pacientes sanos usada como control, fue extraída por la compañía Corpogen [1]. Las muestras de ADN Humano de pacientes con SIDA fueron suministradas por el grupo de Inmunología de la Universidad del Cauca. A los pacientes se les realizó previamente la prueba de ELISA [2], con la cual se comprobó la presencia del VIH en las células sanguíneas. Todos los pacientes se encontraban en una etapa inicial de la enfermedad, sin tratamiento previo alguno y en un rango de edad de entre los 20 y 40 años. Además, se creó un formato de consentimiento informado (ver anexo 6) que fue firmado por cada uno de los pacientes de quienes no se conoce su identidad y en este se aclaran los objetivos científicos de la investigación.

En cada una de las muestras se procedió a realizar una cuantificación de ADN con el fin de conocer la concentración y el grado de pureza. Para ello se usaron técnicas ópticas utilizando espectrofotometría ultravioleta. Todos los resultados de la cuantificación se presentan previamente a las curvas de caracterización eléctrica. Así mismo, se muestran los resultados dependiendo de un proceso previo de alineación de las fibras de ADN, el cual es el parámetro principal para la

reproducibilidad de los resultados obtenidos. Las curvas se presentan en orden temporal. Las primeras fueron tomadas en el proceso inicial de la investigación sin ningún tipo de técnica de alineación de ADN. Posteriormente se realizó una técnica de alineación con campo DC similar a la electroforesis [3] y finalmente se usó la técnica de alineación con campo AC, con la cual se obtuvieron los mejores resultados.

4.1 CURVAS CORRIENTE-VOLTAJE EN ADN

4.1.1 Curvas Corriente-Voltaje sin alineación de ADN

En esta parte del capítulo presentamos las curvas de corriente-voltaje obtenidas en ADN bacteriano y Humano sin ninguna técnica de alineación de ADN previa a la caracterización.

4.1.1.1 ADN de *Escherichia coli* (*E. coli*)

El ADN de bacteria *E. coli* purificado con ARNasa para la eliminación de material genético diferente a ADN, fue cuantificado por lectura de absorción en el ultravioleta a 260, 280 y 320 nm. De estas lecturas se calculó su concentración en $\mu\text{g/ml}$ y la relación de densidades ópticas 260/280, el cual es el indicador de la pureza (Rango 1.8 – 2.0) (Ver Tabla 1).

Concentración	266 µg/ml
Relación 260/280	1.78 (1.8-2.0)
Integridad electroforética	Aceptable

Tabla No 4.1 Resultados de las pruebas de concentración y pureza en ADN de *E. coli*

La concentración de este ADN es alta debido a que la aplicación que se quiere realizar en mediano plazo en el Grupo de Física de bajas Temperaturas (FISBATEM) de la Universidad del Cauca es el desarrollo de biotransistores, los cuales requieren una alta concentración en la deposición de material orgánico que se usa como canal de conducción, reemplazando los típicos materiales dieléctricos.

El ADN se encuentra inmerso en un buffer de reconstitución denominado TE (Tris-EDTA, a un pH de 8.0). Por medio de la misma caracterización corriente-voltaje se comprobó la no influencia del buffer en los datos obtenidos.

Se ubicaron 5 µl de ADN por medio de una micropipeta en el montaje experimental (Ver capítulo 3) e inmediatamente en un ambiente de vacío (Vacío medio 10^{-2} milibar) se realizó la obtención de curvas corriente-voltaje sin alineación previa. Los rangos de corriente usados variaron desde -1000 nA hasta 1000 nA, con incrementos de 10 nA. El error en las mediciones es proporcionado por los instrumentos, para la fuente de corriente es de 0.1 nA y para el nanovoltmetro de 1 nV.

En la grafica 1 se muestra un curva de corriente-voltaje obtenida para dos muestras de dsADN de *E. coli*. La muestra se encuentra en vacío para evitar los efectos de la humedad y a una temperatura constante de 20°C. Se puede observar que las dos muestras presentan comportamientos completamente diferentes. No hay ninguna reproducibilidad en los resultados considerando que las condiciones físicas en las cuales se realizó la caracterización fueron similares. En ninguno de los dos casos se encontró simetría de voltaje para valores de corrientes de negativas a positivas como se reportan en algunas investigaciones realizadas a nivel mundial para dsDNA [4]. Los rangos de voltaje en estas mediciones siempre fueron positivos aunque fluctuaron de manera arbitraria conforme variaban los valores de corriente.

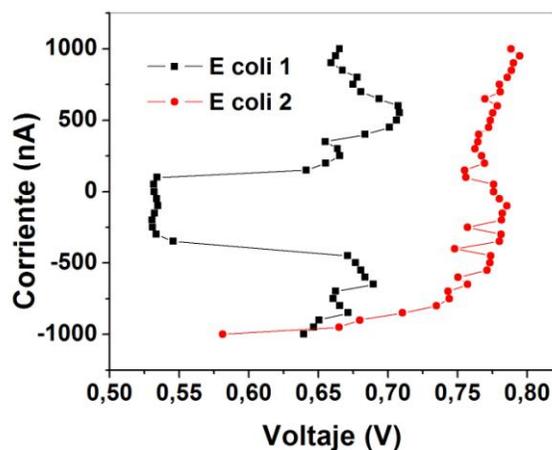


Figura 4.1 Curva Corriente Voltaje en ADN de dos muestras de *E. coli* sin alineación previa.

Una vez se observó la no reproducibilidad de las curvas obtenidas en las muestras anteriores se procedió a realizar dos caracterizaciones en la misma muestra de

ADN (Muestra 3), independientemente de que la extracción realizada en todas las muestras de ADN hayan proveniendo del mismo cultivo bacteriano.

En la Figura 2 se presenta la caracterización eléctrica obtenida por medio de curvas corriente(-) voltaje en una misma muestra de ADN de *E. coli* en los mismos rangos de corriente anteriormente mencionados y sin alineación previa de las hebras de ADN. Las condiciones físicas del experimento: humedad, presión (10^{-2} mbar) y temperatura (20 °C) fueron iguales entre estas dos medidas. Se pudo observar nuevamente una falta de reproducibilidad en las curvas, en donde los voltajes medidos nuevamente no presentaron simetría e incluso fluctuaron desordenadamente para los diferentes valores de corriente. En los resultados obtenidos sin alineación previa de ADN bacteriano no se puede concluir ningún tipo de comportamiento eléctrico característico de este material.

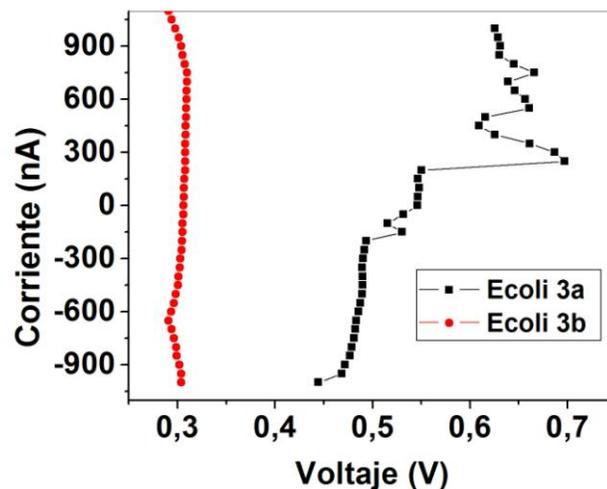


Figura 4.2 Curvas Corriente Voltaje para una misma muestra de ADN de *E. coli* sin alineación previa.

4.1.1.2 ADN Humano

El ADN humano que se usó como control, purificado con ARNasa para la eliminación de material genético diferente a ADN, fue cuantificado por espectrofotometría ultravioleta a 260, 280 y 320 nm. A partir de estas lecturas se calculó su concentración en $\mu\text{g/ml}$ y la relación de densidades ópticas 260/280, la cual es un indicador de la pureza (Rango 1.8 – 2.0) (Ver Tabla 2).

Concentración	16 $\mu\text{g/ml}$
Relación 260/280	1.8 (1.8-2.0)
Integridad electroforética	Aceptable

Tabla 2. Resultados de las pruebas de concentración y pureza en ADN humano.

Al igual que en el caso del ADN bacteriano, el ADN se encuentra inmerso en un buffer de reconstitución denominado TE. Se ubicaron 5 μl de ADN en el montaje experimental e inmediatamente se realizó la obtención automática de curvas corriente-voltaje sin alineación previa. Los rangos de corriente usados variaron desde -1000 nA hasta 1000 nA, con incrementos de 10 nA. El error en las mediciones es proporcionado por los instrumentos, para la fuente de corriente es de 0.1 nA y para el nanovoltmetro de 1 nV.

El objetivo en esta parte de la investigación es la identificación de diferencias en las curvas corriente-voltaje obtenidas para ADN de pacientes con Síndrome de

Inmuno Deficiencia Adquirida y personas sanas. La concentración de ADN de estas muestras es pequeña comparada con la concentración de ADN bacteriano debido a que la observación del cambio en las propiedades físicas del ADN provocadas por el VIH no requieren una alta concentración. Así, a partir de una muestra promedio de 5ml de sangre, de la cual se separaron las células sanguíneas del plasma, la concentración típica obtenida fue de 16 $\mu\text{g/ml}$.

En las figuras 4.3, 4.4 y 4.5, se presenta la caracterización eléctrica obtenida por medio de curvas corriente-voltaje en muestras de ADN Humano en el mismo rango de corriente anteriormente mencionado y sin realizar un proceso de alineación previa de las fibras de ADN. Las condiciones físicas externas fueron controladas y repetidas en cada experimento. La temperatura se mantuvo constante a 20°C y las mediciones se realizaron en vacío. En todas las mediciones se pudo observar comportamientos completamente diferentes entre si, para las cuales no se encontró ningún tipo de reproducibilidad en los resultados obtenidos.

Los valores de voltaje varían arbitrariamente en cada experimento con la variación de la corriente, aunque los valores de resistencia antes de realizar la medición son del orden de los 0.8M Ω . Al igual que en el caso de ADN bacteriano no se observa un comportamiento simétrico en los valores de voltaje. Además, no se puede concluir un comportamiento eléctrico a partir de las curvas obtenidas sin alineación del ADN.

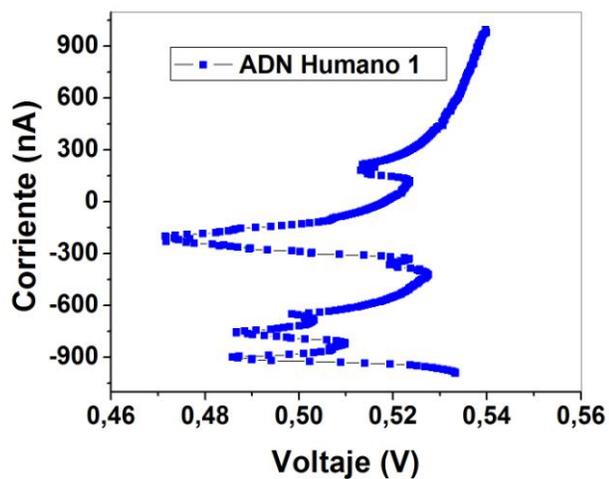


Figura 4.3 Curva Corriente Voltaje para una muestra de ADN Humano sin alineación previa.

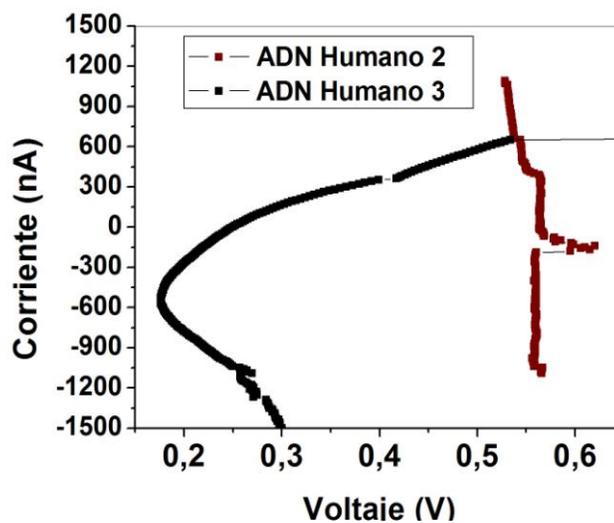


Figura 4.4 Curvas Corriente Voltaje para dos muestras de ADN Humano sin alineación previa.

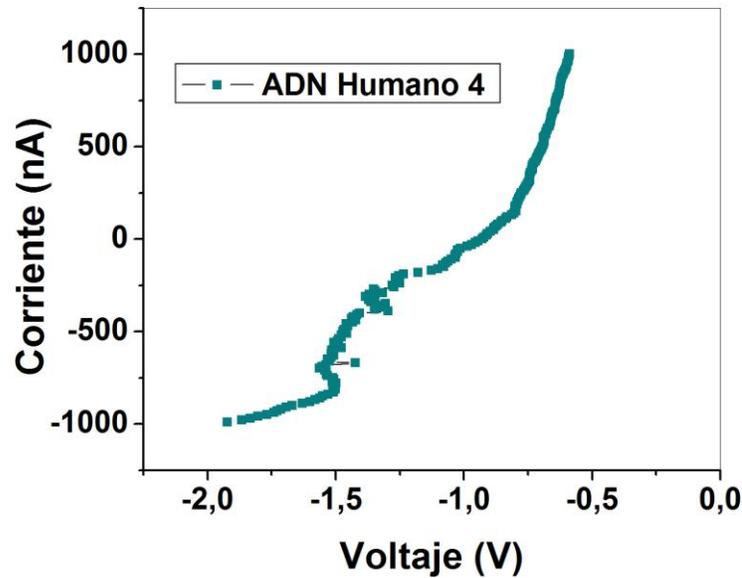


Figura 4.5 Curva Corriente Voltaje para una muestra de ADN Humano sin alineación previa.

4.1.2 Curvas corriente voltaje con Alineación de ADN con campo D.C

A partir de los resultados mostrados, obtenidos anteriormente por caracterización eléctrica por medio de curvas corriente-voltaje, se puede observar la alta relevancia del proceso de alineación de las fibras de ADN previamente a la realización de las medidas, si se considera que parámetros físicos externos como temperatura, presión y cantidad de ADN permanecieron constantes. Los resultados obtenidos tanto para ADN de *E. coli* como para ADN Humano no arrojan ninguna información de las propiedades eléctricas de este material. Por

esta razón fue necesario diseñar un proceso de alineación de ADN que se realizó previamente a la obtención de curvas corriente voltaje.

La primera técnica implementada hace uso de un campo eléctrico de corriente directa DC similar a la electroforesis [3], en la cual las líneas de campo se ubican paralelas a la dirección de la corriente eléctrica a la que es sometido el ADN. Se colocó un campo eléctrico DC de 0.7 V haciendo uso de electrodos lineales de plata y se dejó actuar el campo eléctrico en la muestra de ADN bacteriano durante dos minutos.

4.1.2.1 Curvas corriente-voltaje en ADN de *E. coli*.

Las curvas de caracterización eléctrica fueron tomadas para ADN de *E. coli* con las características de concentración y pureza mencionadas en la sección 4.1.1.1. Se utilizaron dos muestras independientes de ADN bacteriano.

En la figura 4.6 se presenta una curva corriente-voltaje obtenida con muestras de ADN bacteriano previamente alineado con un campo eléctrico DC de 0.7 V. Las condiciones físicas de medición fueron las mismas que en las caracterizaciones preliminares: temperatura de 293K y vacío medio. Se pudo observar un comportamiento limpio y ascendente con algunos cambios de concavidad en -800 nA y 500 nA. Aunque se pudo observar valores de voltaje negativos para corrientes del orden de -1000nA, no hubo simetría en el voltaje. El valor de la resistencia eléctrica fue de 0.6 M Ω .

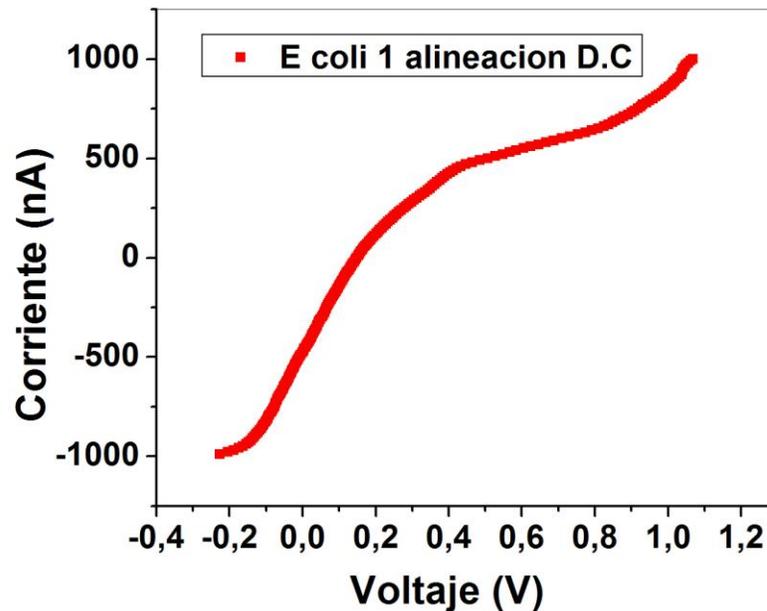


Figura 4.6 Curva Corriente-Voltaje para una muestra de ADN de *E. coli* con alineación previa con campo DC.

En la figura 4.7 se presenta una curva corriente-voltaje tomada en una muestra de ADN de *E. coli*. Se pudo observar un comportamiento ascendente con cambios de concavidad en corrientes similares a las de la gráfica anterior. Entre las dos medidas se pudo observar una mayor similitud, mejorando así la reproducibilidad del experimento. Esto se denota en el sentido que las dos curvas son ascendentes y con cambios específicos de concavidad. Sin embargo los valores de voltaje medidos fueron diferentes entre estas dos muestras y no hubo simetría de voltaje en las mismas.

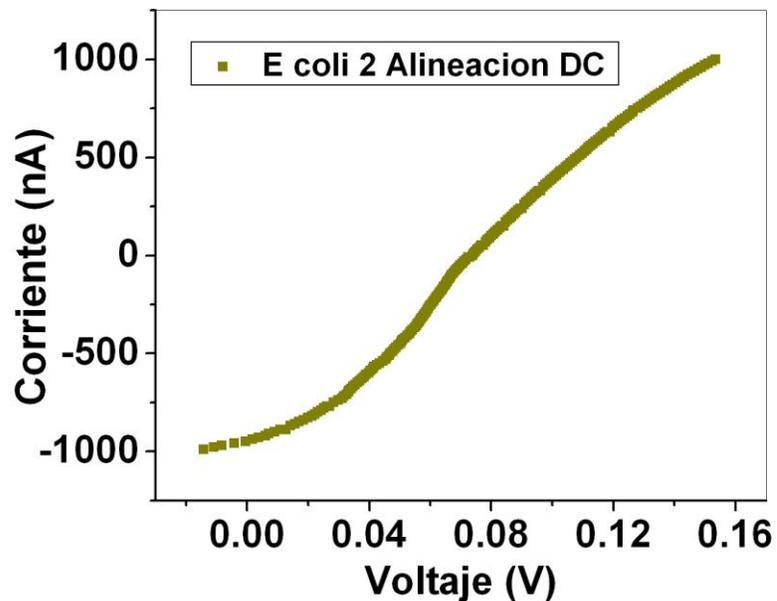


Figura 4.7 Curva Corriente Voltaje para una muestra de ADN de E. coli con alineación previa con campo DC.

La caracterización eléctrica efectuada posteriormente a la alineación con campo DC, la cual fue realizada específicamente en muestras de ADN bacteriano, arrojó mejores resultados que las curvas obtenidas previamente sin ningún proceso de alineación de las hebras de ADN. Sin embargo los resultados no fueron completamente concluyentes en las propiedades eléctricas de este material. Por esta razón fue necesario utilizar una técnica de alineación diferente que ha sido probada en caracterizaciones físicas realizadas para materiales orgánicos en investigaciones desarrolladas en otros institutos [5], la cual se denomina alineación de ADN con campo AC.

4.1.3 Curvas corriente-voltaje con alineación de ADN con campo A.C

La alineación de ADN con campo eléctrico AC se realizó con el fin de obtener una mayor organización de las fibras de ADN, esto permite asegurar que la corriente eléctrica recorra el ADN en la misma dirección, a través de las moléculas. Por esta razón se procedió a colocar un campo eléctrico de corriente alterna (señal sinodal) por medio de un generador de funciones, cuyos parámetros fueron:

- $V_{pp}=0.5V$
- Frecuencia= 60 Hz.

El campo AC se ubicó paralelo a la dirección de la corriente por medio de unos electrodos de plata lineales que iban sobre la muestra de ADN. El tiempo de exposición fue de 120 segundos. Todos los parámetros físicos necesarios para realizar exitosamente la alineación de ADN se encontraron en el Laboratorio de Física de bajas Temperaturas y se comprobaron experimentalmente en la pasantía internacional de investigación realizada en el Weizmann Institute of Sciences de Israel (ver anexo), realizada como parte integrante de la presente investigación.

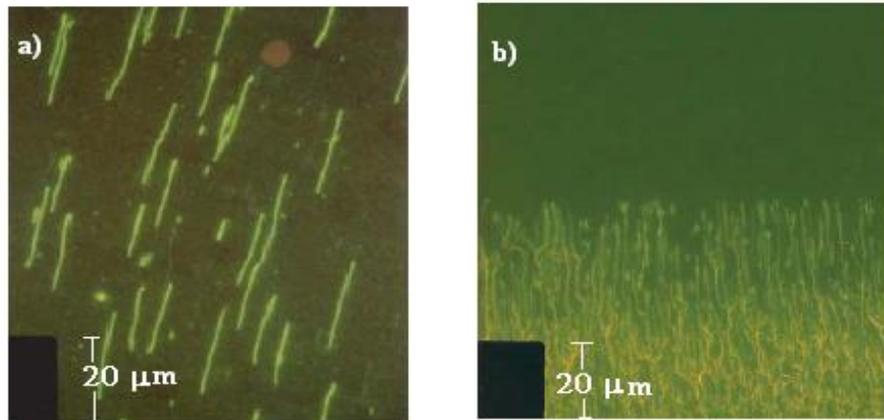


Figura 4.8 Fotografía de microscopía de fluorescencia de muestras de ADN después de alineación por campo AC. a) 10 µg/ml, b) 150 µg/ml [5].

4.1.3.1 Curvas corriente voltaje en ADN bacteriano

Una vez se logró la alineación de ADN, se procedió a realizar la caracterización eléctrica por medio de curvas corriente-voltaje en muestras de ADN de *E. coli*, variando la temperatura. El controlador usado permitió mantener la temperatura constante con una precisión del orden de los milikelvin (Ver capítulo 3). La presión se mantuvo igual que en los experimentos previos.

En la figura 4.9 se presenta la caracterización corriente-voltaje de una muestra de 5 µL de ADN de *E. coli*, realizada a 4 diferentes temperaturas, 23°C, 0°C, -10°C y -20°C. Lo primero que se puede observar es una concordancia entre los resultados obtenidos: curvas claramente ascendentes para ciertos rangos de corriente y una dependencia directa de la respuesta eléctrica con la temperatura. Así mismo, los

resultados presentaron un comportamiento similar a las curvas de corriente-voltaje de un diodo con voltajes de ruptura que varían desde la rama negativa a la positiva, dependiendo del valor de la corriente. Para temperaturas de -20°C , -10°C y 0°C , se obtuvieron voltajes de ruptura de -0.76V , -0.69V y -0.67V respectivamente para corrientes negativas. Para las corrientes positivas los voltajes fueron 0.78V , 0.84V y 0.82V . Por otro lado, a temperatura ambiente se obtuvo un comportamiento óhmico con altos valores de resistencia, del orden de $0.6\text{M}\Omega$, los cuales son valores similares a la resistencia medida en las caracterizaciones preliminares. En trabajos reportados experimentalmente se comprobó la existencia de un GAP del orden de 2V para ADN de doble hélice (dsDNA) en temperaturas por debajo de los 0°C [6-7], lo cual es consistente con los resultados obtenidos bajo condiciones similares.

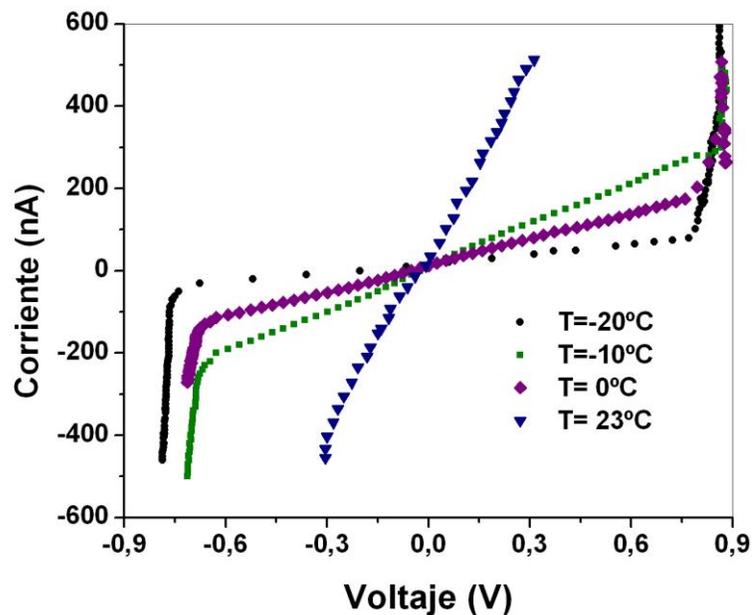


Figura 4.9 Caracterización corriente-voltaje realizada en muestras de ADN de *E. coli* a 4 diferentes temperaturas.

4.1.3.2 Curvas corriente voltaje en ADN Humano

Posteriormente a la caracterización de ADN bacteriano y con la seguridad de tener un ADN alineado, se procedió a realizar la caracterización eléctrica de ADN Humano, de una muestra control de ultra alta pureza y de 4 muestras extraídas de diferentes pacientes a quienes se les diagnosticó SIDA sin que se les haya administrado ningún tratamiento medico previo. Las condiciones físicas de la caracterización fueron temperatura = 20°C y presión = 10^{-2} mbar. Los rangos de corriente se mantuvieron constantes. El barrido de corriente se realizó desde -1000nA hasta 1000nA con incrementos de 10nA.

En la Fig 4.10 se observan las curvas Corriente-Voltaje obtenidas en 2 muestras de ADN humano extraído de células sanguíneas de pacientes diagnosticados con SIDA e infectados con VIH y la respuesta eléctrica de ADN humano sin presencia de VIH. Se presentó un comportamiento tipo semiconductor en todas las muestras pero también se observaron diferencias en los puntos de cambio de concavidad, voltajes de ruptura y saltos de corriente entre las respuestas obtenidas en las muestras con VIH y sin VIH. La curva obtenida para ADN humano sin VIH presentó un comportamiento más limpio y simetría en los niveles de corriente, -1000 nA y 1000nA, puntos donde el voltaje es cercano a cero voltios (ver Fig 4.11), contrario al comportamiento menos simétrico y con cambios más pronunciados de concavidad. Sin embargo, las curvas obtenidas en las dos muestras independientes de ADN humano con VIH fueron bastante similares entre si.

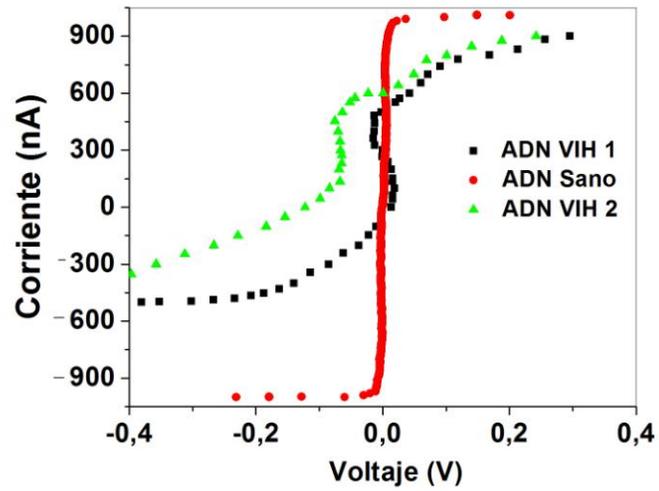


Figura 4.10 Curva corriente voltaje obtenido en ADN humano sin VIH y dos muestras independientes de ADN humano con VIH.

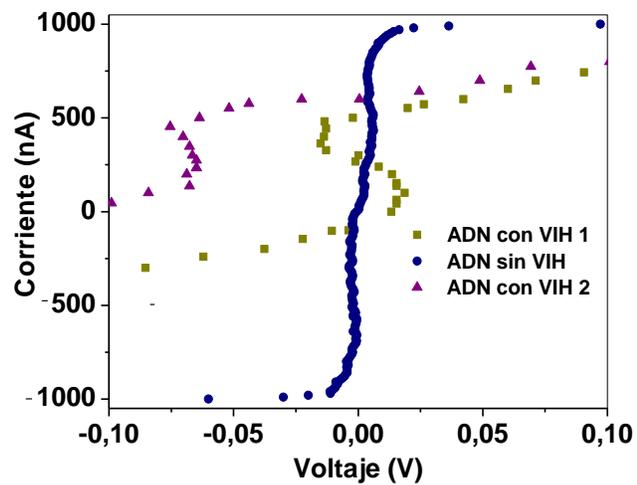


Figura 4.11 Zoom cercano a 0 V de las Medidas de Corriente-Voltaje en ADN Humano.

En la figura 4.12 se muestra la caracterización eléctrica realizada en ADN Humano sin presencia de VIH y dos muestras independientes de pacientes con VIH (Diferentes a las muestras 1 y 2). En las muestras de ADN con VIH se observan unos cambios bruscos en la concavidad que aunque difieren entre si en los valores de corriente y voltaje presentan cierta reproducibilidad en el esquema general de la curva. El ADN de personas sanas presenta una simetría en los voltajes de ruptura en valores cercanos a los -950 nA y 950 nA. Así mismo se puede observar nuevamente una alteración directa en las curvas pasando de ser más organizada y predecible para el caso de ADN humano de personas sanas a con cambios bruscos de concavidad para ADN humano infectado con VIH.

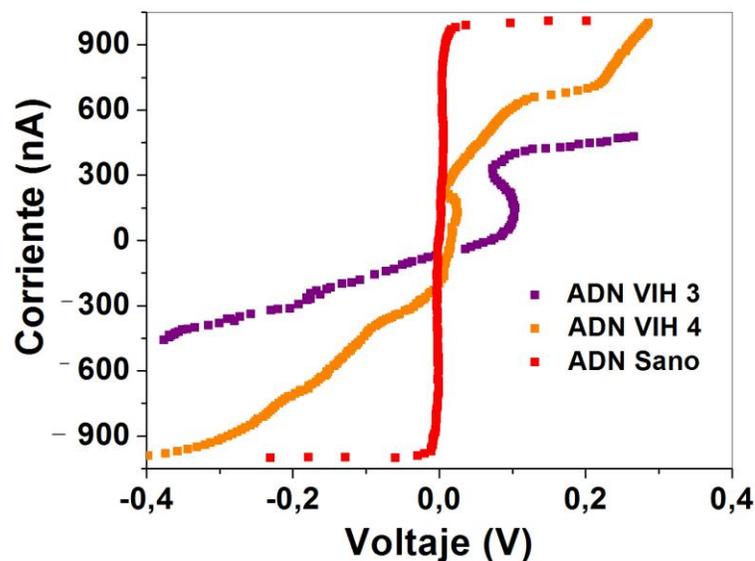


Figura 4.12 Curva corriente voltaje obtenido en ADN humano sin VIH y dos muestras independientes de ADN humano con VIH.

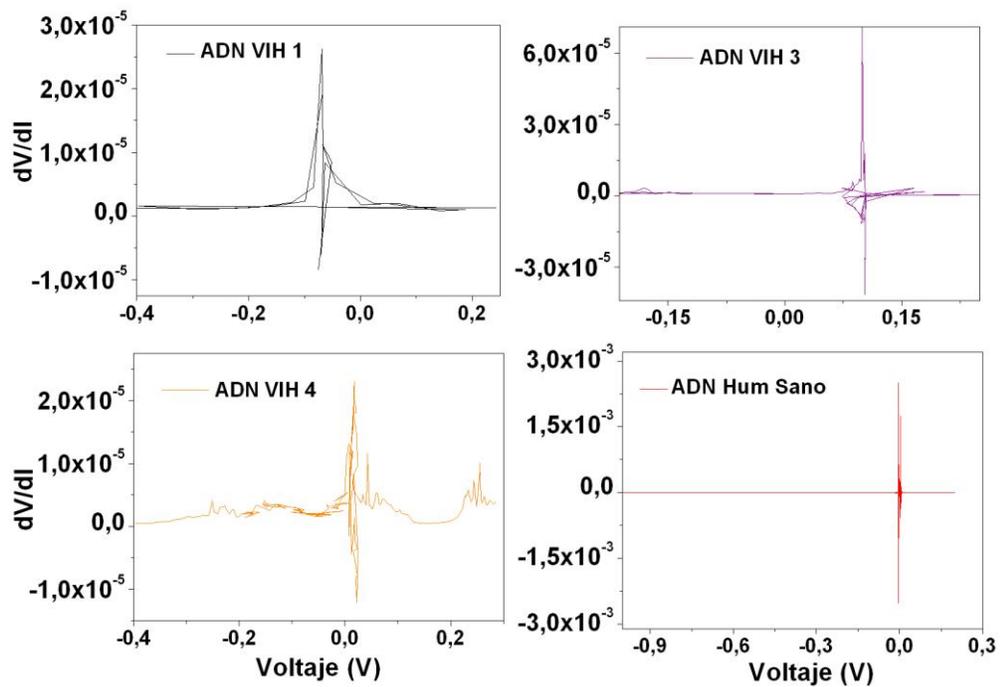


Figura 4.13 Graficas de dV/dI vs Voltaje de las muestras de ADN Humano con VIH y de pacientes sanos.

La figura 4.13 muestra las graficas de la derivada del voltaje con respecto a la corriente (dV/dI) en función del voltaje para muestras de ADN Humano de pacientes con SIDA y de personas sanas. En ellas se puede apreciar unas gráficas con picos característicos para todas las muestras pero que varían en los valores de voltaje (eje x) donde se presentan. Así mismo se observa que para ADN humano sano la curva es completamente limpia y simétrica en los valores negativos y positivos del sobreimpulso dada en $-2,5 \times 10^{-3}$ y $2,5 \times 10^{-3}$.

Para ADN con VIH las curvas son desorganizadas y asimétricas con picos menores en diferentes valores de voltaje que son dados por los pequeños cambios de concavidad presentes en la curva corriente-voltaje. Además, es posible apreciar que el nivel del pico en ADN sano es mucho mayor que en las curvas de ADN con VIH ya que el valor del primero esta en orden de 10^{-3} mientras que en las ultimas es del orden de 10^{-5} .

4.2 CURVAS RESISTENCIA-TEMPERATURA EN ADN BACTERIANO

Las curvas de resistencia en función de la temperatura fueron realizadas específicamente en muestras de ADN de bacteria *Escherichia coli*. En los resultados de la caracterización corriente-voltaje se observa una clara dependencia de la temperatura en los resultados obtenidos. Se hace interesante entonces observar el comportamiento de este dsADN en bajas temperaturas.

La caracterización se realizó a una presión de 10^{-2} mbar (vacío medio) y se hizo un barrido de temperaturas desde los 280K hasta los 185K. Estos rangos de temperatura fueron escogidos como limites para evitar la desnaturalización y cristalización de la muestra de ADN [8]. El montaje experimental usado para esta caracterización fue el mismo que el utilizado para la obtención de las curvas corriente-voltaje (ver capítulo 3).

En la figura 4.14 se presenta la curva de caracterización resistencia-temperatura tomada para 5 μ l de ADN de *E. coli*. Se pudo observar desde los 280K un comportamiento tipo semiconductor cuya resistencia aumente con la disminución de la temperatura. Sin embargo, en los 260K aproximadamente hay una transición

en la cual la resistencia disminuye rápidamente con la temperatura hasta alrededor de los 260K, punto desde el cual la resistencia se mantiene casi constante en un valor de 600K Ω , la cual es la resistencia medida en el material a temperatura ambiente (295K). Los resultados obtenidos por medio de esta caracterización son coherentes con las curvas corriente voltaje obtenidas para ADN bacteriano.

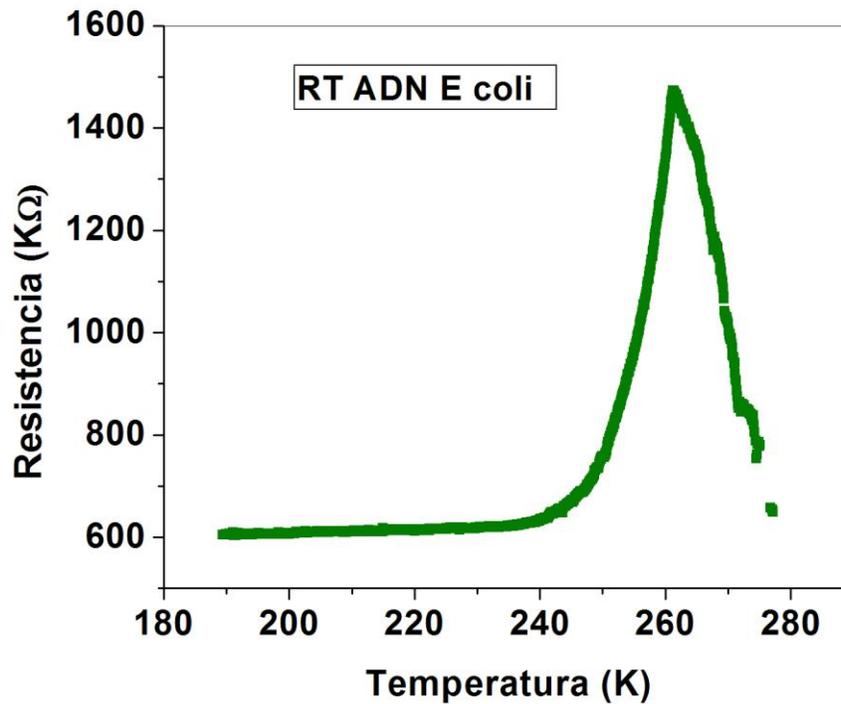


Figura 4.14 Curva de resistencia en función de la temperatura para ADN de *E. coli*

4.3 ANALISIS DE RESULTADOS

4.3.1 Efecto de la Alineación del ADN

Una primera apreciación que se puede anotar a partir de todos los resultados obtenidos fue la gran importancia del proceso de alineación de ADN previamente a la ejecución de la caracterización eléctrica. Se observó que cuando el ADN fue ubicado sin alineación previa los resultados diferían entre ellos independientemente que las condiciones experimentales como temperatura y presión se mantuvieran constantes.

Al utilizar la técnica de alineación con campo DC se observó una mejoría en la reproducibilidad de las curvas de corriente-voltaje que fueron tomadas específicamente para ADN de *E. coli*, el cual tiene una mayor concentración que el ADN Humano utilizado en esta investigación. Sin embargo, los valores de voltaje medidos en los barridos de corriente difirieron considerablemente entre las dos curvas obtenidas. Esto se debe a que la alineación de ADN con campo DC alinea las fibras de ADN debido al torque provocado por la polarización del ADN [9]. Sin embargo las fibras de ADN de cadenas relativamente grandes como el caso de ADN bacteriano (50Kpb) tienden a enredarse entre si [10]. El campo eléctrico DC no desenreda las fibras de ADN ni permite una adherencia entre las hebras, haciendo así que la corriente transite a través de una estructura mas ordenada que en el caso de no alinear el ADN pero con bifurcaciones y nodos indeseables. Siendo el ADN un material anisotrópico [11] se espera que los resultados varíen uno del otro.

Con la técnica de alineación con campo AC se obtuvieron los mejores resultados en todas las caracterizaciones realizadas. Esto es porque además de que el campo AC genera un torque sobre las fibras de ADN, se crea una fuerza dielectroforética provocada por la variación del campo que permite desenredar las fibras de ADN [5] asegurando que la corriente atravesase siempre en la misma dirección a través de la muestra. Además este efecto también provoca una mayor adherencia entre cada una de las hebras de ADN y los electrodos de plata por los cuales se introdujo la corriente eléctrica y se midió el voltaje de respuesta.

4.3.2 Resultados obtenidos con ADN de *E. coli*.

En las curvas de corriente voltaje-observadas para ADN bacteriano después de haber perfeccionado el proceso de alineación de las hebras de ADN se pudo observar una dependencia de la temperatura [12] en la respuesta eléctrica medida. Para las temperaturas menores que cero el comportamiento fue similar al de un diodo semiconductor aunque con voltajes de ruptura asimétricos y para temperatura ambiente se observó un comportamiento óhmico con alta resistencia. Estos resultados son coherentes con las medidas obtenidas con la caracterización resistencia-temperatura, en la cual el ADN a temperaturas menores a 0°C presentó un comportamiento tipo semiconductor.

Se observó en la curva resistencia-temperatura una transición en los 260K aproximadamente donde la resistencia disminuye rápidamente con la temperatura hasta alrededor de los 260K, punto desde el cual esta se mantiene casi constante en un valor de 600K Ω , que corresponde a la resistencia medida en el material a temperatura ambiente (295K). Estas transiciones observadas son muy

interesantes debido a que podemos afirmar que este tipo de dsADN puede cambiar sus propiedades eléctricas dependiendo de la temperatura.

Así mismo, la afinidad presentada entre las fibras de ADN, los electrodos de plata y los substratos aislantes escogidos usados en el montaje experimental (Cuarzo y Titanato de Estroncio) fue muy buena, permitiendo un óptimo desarrollo experimental, el cual no fue conseguido con substratos de vidrio. Eso se debe a que el substrato debe tener un orden molecular que no esta presente en un material amorfo como es el vidrio.

Las transiciones observadas, el comportamiento tipo semiconductor y la dependencia en función de la temperatura sugieren que este tipo de ADN se puede utilizar como material para la creación de sensores orgánicos y biotransistores.

4.3.3 Resultados obtenidos con ADN Humano.

Los resultados totales de las curvas corriente-voltaje para las cuatro muestras independientes de ADN de pacientes con SIDA e infectados con VIH y las muestras control de ADN Humano sin presencia del virus, indican una similitud considerable en las respuestas de pacientes con VIH (Figura 4.15).

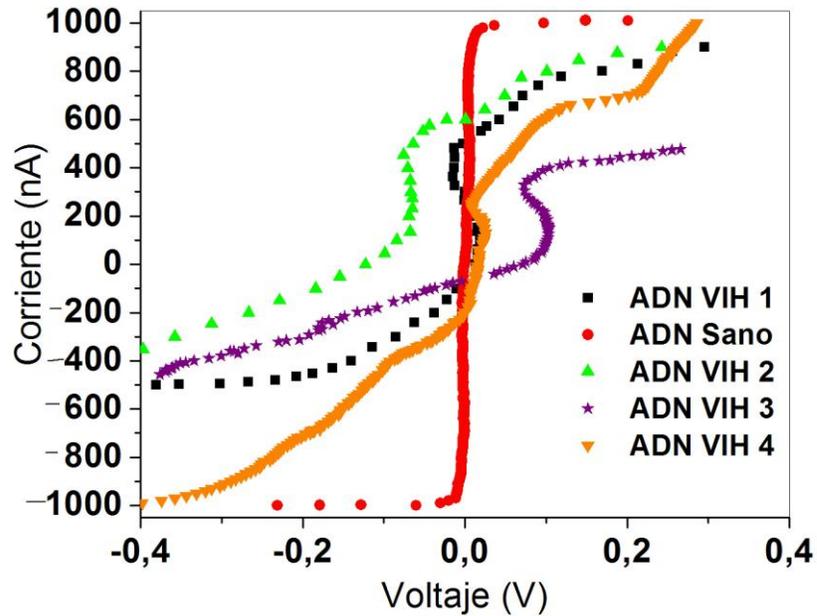


Figura 4.15 Resultados totales de la caracterización corriente-voltaje obtenida en ADN humano de pacientes infectados con VIH y no infectados.

A pesar de que todas las curvas presentan un comportamiento tipo semiconductor, las curvas de ADN de pacientes con VIH presentan una desorganización en los niveles de voltaje de ruptura (no hay simetría) y dos cambios de concavidad característicos, que pasan de ser cóncavos hacia adentro a cóncavos hacia fuera en corrientes y voltajes diferentes pero siguiendo un esquema general específico. Caso contrario es el observado en la curva observada para la muestra de ADN Humano de pacientes sin VIH en la que se sigue presentando una simetría de los voltajes de ruptura y un comportamiento mucho más ordenado.

Las alteraciones observadas en el ADN humano de pacientes con VIH también se pueden apreciar en la grafica de la derivada del voltaje con respecto a la corriente (dV/dI) en función del voltaje, en las cuales los cambios de concavidad asimétricos son representados por picos asimétricos en valores diferentes de voltaje. Las graficas también presentan picos pequeños en puntos donde se presentan cambios pequeños de concavidad y de sentido (creciente a decreciente o viceversa) en las graficas de corriente-voltaje (Figura 4.16).

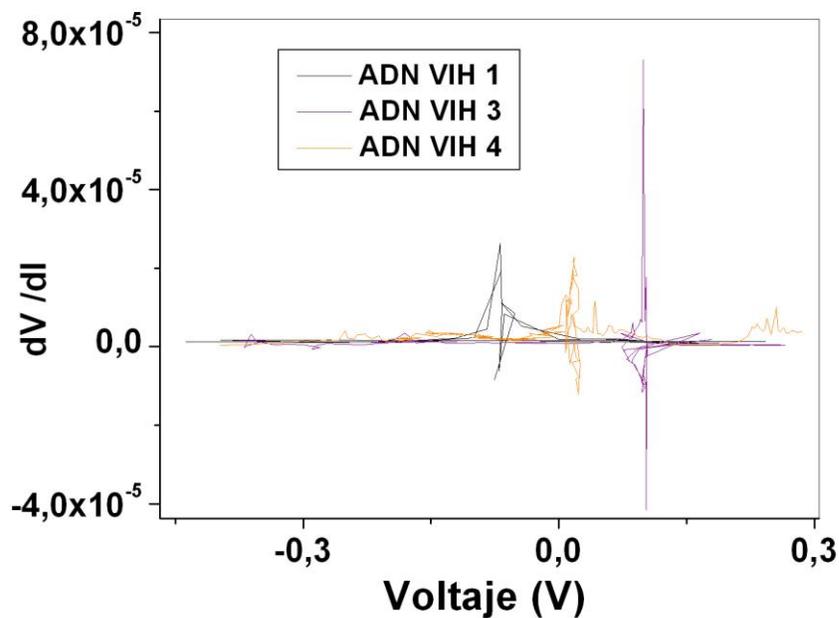


Figura 4.16 Graficas de dV/dI vs Voltaje de las muestras de ADN Humano con VIH.

Los resultados obtenidos experimentalmente por medio de la caracterización corriente-voltaje indicarían que la influencia del retrovirus VIH en la cadena de ADN humano altera las características eléctricas de este material. Este hecho constituye un hallazgo interesante que permitiría revolucionar los métodos de diagnóstico tradicionales, basados en la presencia de anticuerpos (proteínas) producidos por la respuesta inmunológica ante la presencia del VIH en el organismo humano; así las caracterizaciones eléctricas del ADN humano eventualmente podrían llegar a convertirse en una alternativa que detecte la presencia efectiva del provirus integrado en el genoma humano, constituyéndose así en una posible prueba de tipo confirmatorio mas que simplemente de carácter de diagnóstico. En consecuencia, los resultados de esta investigación son promisorios en el campo del diagnóstico de un sinnúmero de enfermedades que cursan con alteraciones del ADN. Este campo, que utiliza principalmente herramientas químicas y biológicas y muy escasamente físicas, se vería así enriquecido con una nueva herramienta física, como aporte de este trabajo de investigación a esta importante área del saber y de servicio al hombre.

REFERENCIAS

[1] <http://www.corpogen.org>

[2] Donegan, E., Stuart, M., Niland, J. C., Sacks, H. S., Azen, S. P., Dietrich, S. L., Faucett, C., Fletcher, M. A., Kleinman, S. H., Operskalski, E. A., et al. (1990). *"Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations"*. Ann. Intern. Med. 113 (10): 733-739.

[3] Berkelman T., Stenstedt T, *2-D "Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & methods"*,. Amersham Pharmacia Biotech Inc.1998.

[4] Claude Nogues, Sidney R. Cohen, Shirley S. Daube and Ron Naaman, *"Electrical properties of short DNA oligomers characterized by conducting atomic force microscopy"*, Chem. Phys Journal, 2004, pág. 4459 – 4466.

[5] Francois Dewarrat, *"Electric Characterization of DNA"*, PhD Tesis, Basel University, 2002.

[6] D. Porta, et al., Nature (London), Pag 635, (2000)

[7] A.V. Malyshev, Physical Review Letters, 096801, Pag 1, (2007).

[8] degeneracion de adn

[9] Berkelman T., Stenstedt T, *"Electrophoresis and Comparison with That by Bacteriophage Typing"*. J.Clin. Microbiol 1997.

[10] R. Pethig, "*Dielectric and electronic properties of biological materials*", John Wiley and Sons, 1978.

[11] Okahata Y, T Kobayachi, K Tanaka and Shimomura, "*Anisotropic electric conductivity in an aligned DNA cast film*", J. Am. Chem. Soc. 120. 6165-6166.

[12] Jin-Fu Feng, Xiao-Shan Wu, Shi-Jie Xiong, Shu-Sheng Jiang, "*Temperature dependence of transport behavior of a short DNA molecule*", Solid State Communications 139 (452–455), July 2006.

CONCLUSIONES

Se realizó satisfactoriamente caracterización eléctrica mediante curvas corriente-voltaje para muestras de ADN de la bacteria *Escherichia coli* y ADN humano de personas sanas y personas contagiadas con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana). Así mismo, se obtuvieron curvas de resistencia en función de la temperatura en muestras de ADN bacteriano. De todas las respuestas obtenidas y el desarrollo experimental usado para obtenerlas se puede concluir:

- 1) La afinidad presentada entre las fibras de ADN, los electrodos de plata y los substratos aislantes escogidos usados en el montaje experimental (Cuarzo y Titanato de Estroncio) fue excelente, permitiendo un óptimo desarrollo experimental que no fue conseguido con otros materiales como substratos de vidrio y electrodos de cobre.
- 2) La técnica de alineación con campo AC fue fundamental para la obtención de resultados óptimos en todas las caracterizaciones realizadas. Esto es debido a dos efectos: el primero es un torque creado sobre las fibras de ADN y el segundo efecto es una fuerza dielectroforética provocada por la variación del campo que permite desenredar las fibras de ADN, asegurando que la corriente atravesase siempre en la misma dirección a través de la muestra. Además la influencia del campo eléctrico de corriente alterna también provoca una mayor adherencia entre cada una de las hebras de ADN y los electrodos de plata por los cuales se introdujo la corriente eléctrica y midió el voltaje de respuesta.

- 3) En las curvas de corriente-voltaje observadas para ADN de *E. coli* se pudo observar una dependencia de la temperatura en la respuesta eléctrica obtenida. Para temperaturas menores a cero grados centígrados el comportamiento fue similar al de un diodo semiconductor aunque con voltajes de ruptura asimétricos y para temperatura ambiente se observó un comportamiento óhmico con alta resistencia. Estos resultados a su vez son coherentes con las curvas resistencia-temperatura halladas para la misma muestra de ADN.

- 4) Todas las curvas obtenidas para las muestras de ADN humano presentan un estado semiconductor. Para las curvas medidas sobre ADN de personas sanas se observa un comportamiento predecible y simétrico en los voltajes de ruptura, caso contrario observado para las curvas corriente-voltaje en todas las muestras de ADN Humano de pacientes infectados con VIH, en las cuales se observa una desorganización en los niveles de voltaje de ruptura (no hay simetría) y dos cambios de concavidad característicos que pasan de ser cóncavos hacia adentro a cóncavos hacia fuera en corrientes y voltajes diferentes pero siguiendo un esquema general específico.

Finalmente y en respuesta a los objetivos fundamentales de esta investigación podemos concluir:

- 5) El comportamiento tipo semiconductor observado en el ADN de la bacteria *Escherichia coli* y la dependencia en función de la temperatura sugieren que este tipo de dsADN puede ser utilizado como material para la creación de sensores orgánicos y biotransistores.

- 6) Los resultados obtenidos experimentalmente en muestras de ADN Humano indican que la influencia ejercida por el provirus VIH en la cadena de ADN de los pacientes infectados altera las características eléctricas de este material sugiriendo la posibilidad de usar la caracterización eléctrica como una herramienta física de diagnóstico de VIH.

RECOMENDACIONES

A la luz de los excelentes resultados obtenidos en el presente trabajo de grado, es necesario considerar la posibilidad de expandir investigaciones sobre las propiedades físicas de biomateriales como lo es el ADN. La investigación se dividió en dos grandes núcleos, cada uno orientado hacia campos de aplicación diferentes, pero basados en el mismo principio físico.

El primer núcleo tiene una orientación específica hacia el desarrollo de nuevos materiales usados en aplicaciones como biosensores o biotransistores. Para esta parte de la investigación utilizamos ADN de bacteria *Escherichia coli*. En este aspecto, El comportamiento tipo semiconductor observado en ADN bacteriano y la dependencia en función de la temperatura sugieren que este tipo de dsADN puede ser utilizado como material para la creación de sensores orgánicos y biotransistores. En este sentido, investigaciones futuras pueden considerar recomendaciones como:

- 1) Utilizar nuevos tipos de ADN de cadenas relativamente cortas (del orden de los kilo o mega pares de bases) para explorar sus propiedades eléctricas.
- 2) Hacer caracterización eléctrica variando la concentración de la muestra de ADN bacteriano. Aunque las investigaciones apuntan a utilizar altas concentraciones de ADN para desarrollar biosensores y biotransistores, sería importante encontrar una concentración óptima en las propiedades eléctricas y de absorción de ADN a su substrato o material usado para crear el dispositivo.

- 3) Averiguar la influencia de pequeños campos magnéticos en las propiedades eléctricas del ADN. Esto sería muy interesante debido a que como se vio en el capítulo 2, dentro del ADN se genera un dipolo a lo largo de la molécula y un campo magnético externo podría provocar alteraciones en las propiedades físicas del ADN.
- 4) Estudios de propiedades magnéticas en ADN haciendo uso de caracterizaciones como magnetorresistencia o susceptibilidad magnética.
- 5) Realizar dopaje sobre fibras de ADN utilizando nanopartículas conductoras como oro o materiales magnéticos que generen nuevas posibilidades de aplicaciones en biomateriales.

El segundo núcleo se enfocó hacia la medicina humana, en el cual se exploró la influencia del retrovirus VIH en la alteración de las propiedades eléctricas de ADN Humano. Esto es con el fin de investigar la posibilidad de diseñar un nuevo método de diagnóstico haciendo uso de herramientas físicas de caracterización y no solamente las actuales herramientas químicas o biológicas. Los resultados obtenidos experimentalmente en muestras de ADN Humano indican que la influencia del retrovirus VIH en la cadena de ADN de los pacientes infectados altera las características eléctricas de este material, abriendo la posibilidad de usar este tipo de caracterización física como un nuevo sistema de diagnóstico de VIH. En este aspecto, investigaciones futuras podrían considerar las siguientes recomendaciones:

- 1) Realizar caracterización eléctrica de ADN humano con y sin VIH en más muestras de ADN, con el fin de estandarizar una respuesta eléctrica de los dos tipos de ADN. Haciendo un muestreo adecuado se podrá perfeccionar

la implementación del sistema de diagnóstico de VIH usando caracterización corriente-voltaje.

- 2) Hacer caracterización eléctrica en muestras de ADN con VIH de pacientes en diferentes etapas de la enfermedad y también en diferentes etapas del tratamiento médico usado contra el VIH.
- 3) Observar el efecto de campos magnéticos externos en la variación de las propiedades eléctricas de ADN Humano.
- 4) Diseñar un experimento similar en otros tipos de virus que provocan distintas enfermedades y que afectan brusca y directamente la cadena principal de ADN humano como por ejemplo el HTLV-1 o algunos tipos de cáncer provocados por provirus (Cáncer de cuello uterino).

PARTICIPACION EN EVENTOS NACIONALES

Presentado en el XXII Congreso Nacional de Física
Ibagué, 22 al 26 de Octubre de 2007.

CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE ADN HUMANO CON VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

C. A. Andrade¹, C. A. Méndez¹, L. Salazar¹, G Bolaños¹, J Cabrera².

¹ *Universidad del Cauca, Departamento de Física, Grupo de Física de Bajas
Temperaturas, Calle 5 No 4-70, Popayán, Cauca.*

² *Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias de la Salud, Calle 18 Carrera 50,
Pasto Nariño.*

RESUMEN.

Se realizó caracterización eléctrica mediante medidas de Corriente-Voltaje a temperatura ambiente en muestras de ADN humano extraídas de células sanguíneas en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y se compararon con respuestas de ADN de personas sanas.

En todas las muestras se observó un comportamiento tipo semiconductor. Sin embargo, diferencias en los puntos de cambio de concavidad, voltajes de ruptura y saltos de corriente entre las respuestas obtenidas en las muestras con VIH y sin VIH fueron observadas.

Palabras claves: ADN, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), caracterización eléctrica.

CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE DE ADN DE ALTA PUREZA DE BACTERIA E-COLI.

C. A. Méndez¹, C. A. Andrade¹, L. Salazar¹, G Bolaños¹, J Cabrera².

¹ *Universidad del Cauca, Departamento de Física, Grupo de Física de Bajas Temperaturas, Calle 5 No 4-70, Popayán, Cauca.*

² *Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias de la Salud, Calle 18 Carrera 50, Pasto Nariño.*

RESUMEN

Se realizó caracterización eléctrica sobre muestras de ADN de bacteria e-coli de alta pureza mediante medidas de corriente voltaje a diferentes temperaturas, variando la corriente desde -600 hasta 600 nA en incrementos de 10nA, obteniendo respuesta en el voltaje entre -0.9V hasta 0.9V.

Las curvas obtenidas muestran un comportamiento similar a la de un diodo en temperaturas menores que cero grados centígrados; para temperaturas superiores se observa un comportamiento óhmico con alta resistencia. Así mismo, se presentan diferentes voltajes de ruptura dependiendo de la temperatura.

Palabras Claves: transporte eléctrico, ADN, semiconductor, bacteria e-coli, caracterización eléctrica.

ANEXO 1

PASANTIA INTERNACIONAL REALIZADA EN EL WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCES (ISRAEL)

Carlos Augusto Andrade Eraso

University of Cauca
Popayan, Colombia

Department of Chemical Physics
Weizmann Institute of Sciences
Rehovot, Israel

Supervisor: Prof. Ron Naaman
Mentor: Eyal Capua

Research: Develop of hybrid sensors (Organic-Inorganic) for the detection of explosives

Many interesting biological, physical and chemical phenomena happen at the nanometric regime. Therefore, it is most interesting to study these interactions with the purpose of turning them into perceivable signals in our macroscopic world.

We suggest a novel way to detect molecular changes using an electronic device, by incorporating molecules in an organic/inorganic structure. The electronic device is called the MOC SER (MOlecular Controlled SEMiconductor Resistor) and operates in quite the same manner as a normal FET (Field Effect Transistor), only that the MOC SER is essentially a gateless device. Here, the conductivity of the channel is controlled by the electrostatic potential of the adsorbed molecular layer. This results in the sensing of molecular changes on its surface.

In the present research we aim to detect explosives using the MOCSEER. Silicon (Si) based and Gallium Arsenide (GaAs) based MOCSEERs were modified to carry different organic monolayers. In the case of silicon devices, the monolayers were formed through a stepwise procedure in which mercaptosilane was first adsorbed followed by deposition of thiolated β -cyclodextrin. Eventually, adamantane, 1-adamantanol, and 1-adamantane carboxylic acid were deposited. The different devices were exposed to a constant gas flow of acetone, ethanol and triacetone triperoxide (TATP). Among the different explosives, TATP was selected due to its high vapor pressure.

Various electrical responses were obtained for the different vapors. Acetone and ethanol were best detected using the different Si based devices, while scarce responses were seen for TATP. On the other hand, TATP was detected adequately with a cyclodextrin\adamantane GaAs based device.

The present results demonstrate that the MOCSEER technology can be suitably used for future creation of an electrical artificial nose.

ANEXO 2

CONEXIÓN DE INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN CON EL BUS GPIB

GPIB es un bus y un protocolo estándar para el control y comunicación con instrumentos de medición, como fuentes programables de corriente, multímetros digitales, osciloscopios, etc., que permite configurar sistemas automáticos en el laboratorio y en la industria con gran flexibilidad y potencia.

Características eléctricas del GPIB

El bus de transmisión de datos de GPIB es de 8 bits en paralelo, y lógica negativa con niveles TTL estándar (cierto si el voltaje es ≤ 0.8 V y falso si el voltaje es ≥ 2.0 V). Los cables y conectores tienen el aspecto típico mostrado en la figura 2.

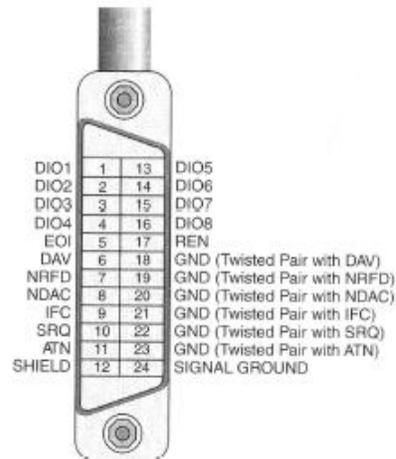


Figura 2: cable de conexión GPIB: aspecto físico y distribución de señales.

El bus consta de 24 pines, repartidos de la siguiente forma:

- ❖ 8 líneas de transmisión de datos (DIO1-DIO8)

- ❖ 3 líneas para el control asíncrono de la comunicación (NRFD, NDAC y NRDAV).
Mediante estas líneas se verifica la correcta transmisión de los datos, que es una de las fortalezas del GPIB.
- ❖ 5 líneas que gestionan la transmisión de comandos (ATN, IFC, REN, SRQ y EOI).
- ❖ El resto componen las tierras de las diferentes líneas.

Para que el bus GPIB alcance la velocidad de transmisión para el que fue diseñado (hasta 8 Mbyte/s), deben cumplirse los siguientes requisitos:

- ❖ Puede haber un máximo de 15 dispositivos conectados al bus, y al menos dos tercios de ellos deben estar encendidos.
- ❖ La separación máxima entre dos dispositivos es 4 m, y la separación promedio en toda la red debe ser menor de 2 m.
- ❖ La longitud total de la red no debe exceder los 20 m.

ANEXO 3

MODIFICACION EN EL PROGRAMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS PARA MEDIDAS DE CORRIENTE VOLTAJE

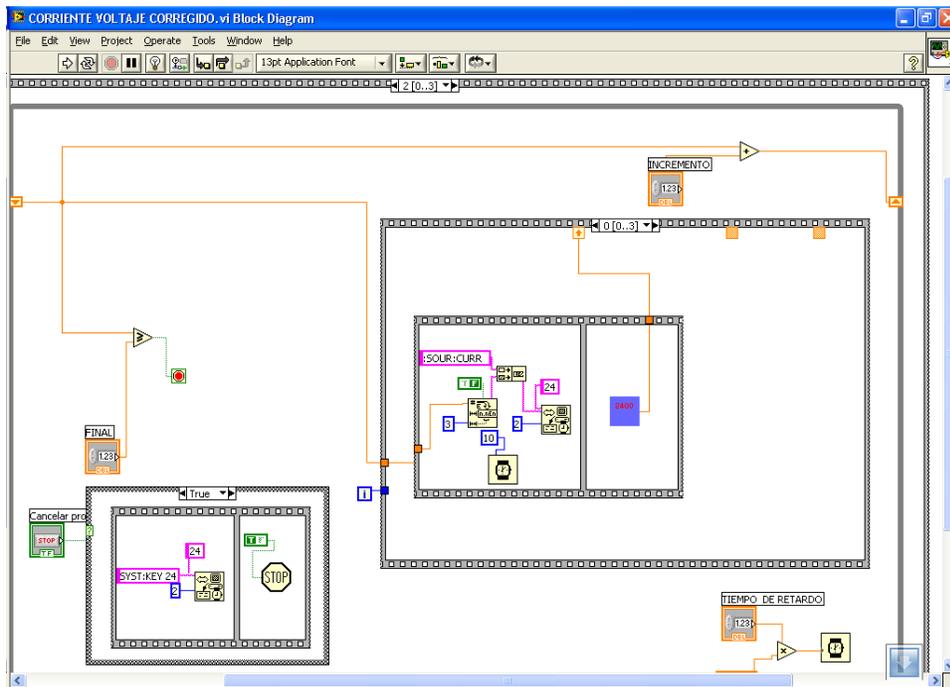
El sistema de adquisición automática de datos que se encuentra en el laboratorio de Física de Bajas Temperaturas Edgar Holguín esta compuesto por un sistema formado por un conjunto de equipos con interface GPIB, todos comunicados al computador mediante una tarjeta GPIB de la National Instruments.

Para la adquisición de datos para la realización de medidas de corriente voltaje se dispone de un nanovoltímetro marca Keithley y una fuente de corriente programable.

Los programas utilizados para introducir los datos automáticamente al computador fueron desarrollados en lenguaje de entorno G denominado Labview 5.0, sin embargo se realizó una modificación y/o mejora a los programas actualizándolos a una versión reciente del lenguaje de programación (Labview 8.0), permitiendo el uso de nuevas herramientas para un mejor desempeño en la adquisición de los datos reduciendo el tiempo de muestreo; se usaron menos rutinas operacionales mucho más simples que permiten ejecutar menos ciclos de máquina, también se desarrolló una interfaz mucho más amigable al usuario otorgando un fácil manejo de software y comprensión del mismo.

Entre las mejoras que se realizaron al software se automatizó el rango de voltaje aceptado por el nanovoltímetro, se optimizó la lectura de datos y al mismo tiempo la lectura de comandos por parte de la fuente de corriente, menos instrucciones y rutinas más eficientes.

En el siguiente diagrama de bloques se muestra el algoritmo desarrollado para la adquisición de datos de medidas corriente voltaje para el sistema de caracterización eléctrica del laboratorio de Física de Bajas Temperaturas FISBATEM.



En la primera parte de la adecuación se actualizó el computador utilizado para la adquisición de datos a un modelo más reciente con sistema operativo Windows XP y el modelo de la tarjeta de adquisición de datos GPIB. Las ventajas que ofrece este cambio es que el sistema actual posee una mayor velocidad de procesamiento, menor tiempo de muestreo, más compatibilidad con equipos recientes y equipos que manejaban el anterior protocolo (IEE 488.1).

ANEXO 4

PROTOCOLO EXTRACCION DE ADN

1. Se toma 2 mL de sangre en tubos con EDTA y se centrifuga a 3.200 r.p.m por 10' a T° ambiente
2. Con una punta antiaerosol se toma 350 uL (capa blanca) y se pasa a un tubo ependor 1.5.
3. Se le agrega 1000 uL de solución 1, se mezcla muy bien y se centrifuga a 14.000 r.p.m por 1', descartando sobrenadante /(repetir 4 veces)
 - Después de descartar se resuspende el botón muy bien y se prosigue con los lavados.
4. Se le agrega 500 uL de Tampón de Lisis (solución 2), mezclar por inversión por 1'.
5. Agregar 500 uL de solución salina (sln 3), resuspender por 1', e incubar en el congelador por 5'.
6. Centrifugar por 10' a 14.000 r.p.m., con la pipeta de 200 uL separar el sobrenadante (DNA).
7. Utilizando punta antiaerosol resistentes, tomar 1 mL de sobrenadante y transferirlo a un tubo ependor de 1.5.
8. Adicionar 600 uL de isopropanol y agitar suavemente por inversión (ver malla DNA).
9. Centrifugar por 15' a 14.000 r.p.m, descartar el sobrenadante.

10. Lavar el precipitado con 250 uL de etanol al 70%, centrifugar a 14.000 r.p.m por 1', descartar sobrenadante secando en toalla absorbente, (repetir 2 veces).
11. Dejar secar mínimo 20' a T° ambiente, o toda la noche.
12. Reconstituir el DNA con solución de reconstitución (sln 4) 100uL, dejar 1 hora a 65 °C o toda la noche a T° ambiente. Agitar frecuentemente como le sea posible.
13. Se adiciona 0. uL de ARNasa (10 mg/mL) en 200 de solución 4, quedando a una concentración final 25ug/ml, se deja por 1 hora a 37 °C.
14. **Precipitado Proteico.** Adicionar 50 uL de Perclorato de Sodio al 5 M
 - Agitar las muestras por 10'.
15. Agregar 200 uL de cloroformo Isoamilico, colocar los tubos en el agitador, en forma vertical por 30' y centrifugar 15'
 - El alcohol debe permanecer tapado entre toma y toma.
16. Preparar los tubos de extracción previamente marcados.
17. Separar el sobrenadante (DNA); verter en los tubos ya preparados y etiquetados, y desechar el anillo proteico.

Con la pipeta de 200 uL, tomar 170 uL para separar el sobrenadante (DNA), utilizando puntas antiaerosol resistentes, evitando de no tocar el anillo proteico. En caso de que el sobrenadante quede opaco o suceda algún accidente, se volvería a centrifugar.
18. Tomar alcohol al 99% y adicionar +/- 800 uL hasta llenar el tubo.

19. Agregar 40 μ L acetato de sodio 3M, precipitar mínimo por 2 horas en el congelador, centrifugar a 14.000 r.p.m. por 15' y desechar el sobrenadante.
20. Secar en papel absorbente el exceso de alcohol.
21. Adicionar 500 μ L de alcohol al 75% y centrifugar por 5', descartar sobrenadante y secar en toallas absorbentes el exceso de alcohol.
22. Dejar secar a T^o ambiente, adicionar TE y agitar las muestras.

ANEXO 5

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN DE LA EMPRESA CORPOGEN.

Aislamiento y purificación de ADN bacteriano

- Fuente: Cultivo líquido de Escherichia coli.

Procesamiento de aislamiento y purificación:

1. Recolección de las bacterias por centrifugación.
2. Lavado de las bacterias con un tampón isotónico.
3. Lisis de la pared celular por digestión con lisozima.
4. Lisis de las bacterias en un tampón que contiene el detergente iónico dodecilsulfato de sodio y la proteasa Proteinasa K.
5. Desproteización de la preparación por salado con cloruro de sodio.
6. Precipitación alcohólica del DNA con isopropanol.
7. Lavados del DNA con etanol al 70% para remover sales.
8. Reconstitución del DNA en tampón TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA)
9. Digestión con RNAsa A para remover RNA.
10. Desproteización con una mezcla de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico.
11. Repetición de los pasos 6, 7 y 8.

Cuantificación del ADN.

El DNA purificado fue cuantificado por lectura ultravioleta a 260, 280 y 320 nm. De estas lecturas se calculó su concentración en $\mu\text{g/ml}$ y la relación de densidades ópticas 260/280, indicador de la pureza (Rango 1.8 – 2.0).

Análisis electroforético:

EL ADN fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE para comprobar su integridad.

RESULTADOS

DNA humano

Volumen	:	1 ml
Concentración	:	175 µg/ml
Relación 260/280	:	1.72 (1.8-2.0)
Integridad electroforética	:	Aceptable

DNA bacteriano

Volumen	:	1 ml
Concentración	:	266 µg/ml
Relación 260/280	:	1.78 (1.8-2.0)
Integridad electroforética	:	Aceptable

ELECTROFORESIS



1 2

1. DNA humano
175 ng

Muestra DNA de alto peso molecular. No hay evidencias de degradación

2. DNA bacteriano
266 ng

Muestra DNA de alto peso molecular.
Débiles bandas de DNA plasmídico

ANEXO 6

**INFORMACION Y FORMATO DE CONSENTIMIENTO
CASO INDICE.**

Introducción

Investigadores del Grupo de Física de Bajas Temperaturas de la Facultad de Educación y del Grupo de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca están realizando un estudio para investigar las Propiedades de Transporte Eléctrico dentro del material genético de pacientes que presenten el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Propósito

El propósito de este estudio es conocer las diferencias en las Propiedades de Transporte Eléctrico de ADN Extraído de células sanguíneas entre pacientes entre 15 y 50 años que presenten en Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida y pacientes de ese mismo rango de edad que no estén infectados con el virus.

Participación

Usted es libre de participar o no del estudio. Si usted decide participar le pediremos hacer lo siguiente:

1. Responder algunas preguntas relacionadas con su historia médica.
2. Autorizar que le tomen una muestra de sangre de 2 ml.
3. En caso de ser seleccionado, aceptar que se realice extracción de material genético (ADN) de sus células sanguíneas.

Costos

No se le cobrará ningún dinero por participar en este estudio.

Riesgos

La toma de las muestras de sangre puede doler un poco. Puede salir un morado, sangrar o raras veces infectarse en donde se hizo el procedimiento. Limpiaremos la piel donde se colocará la aguja para tomar la sangre. Esto disminuye el riesgo de infección.

El riesgo para la salud que conlleva la obtención de esta cantidad de sangre, no es distinto al riesgo de obtener una muestra de sangre para cualquier otro tipo de examen.

Derechos

Usted es libre de rehusar a participar en el estudio ahora sin afectar los servicios médicos que están usualmente disponibles para usted si en futuro llegase a necesitarlos. Esta investigación no pretende hacer discriminaciones raciales, sociales, económicas, religiosas, laborales, sexuales ni de ninguna índole.

Confidencialidad

Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo a usted hasta donde nos permita la ley. Ni sus registros ni sus muestras serán marcados con su nombre, solo se utilizará un código de estudio. Los investigadores que participen en este estudio podrán ver ese código pero no su nombre. Su nombre tampoco aparecerá en ningún informe de este estudio.

Compensación

Usted no recibirá ninguna compensación económica (dinero) por participar en este estudio.

Personas a contactar

Si tiene preguntas adicionales o quejas con respecto al estudio puede comunicarse con la Dra. MARIA LILIA DIAZ en el Grupo de Investigación de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca al teléfono (0928)209875 o con el estudiante CARLOS ANDRES MENDEZ en el Grupo de Física de Bajas Temperaturas de la Universidad del Cauca al teléfono (0928)209800 Ext. 2399.

Aceptación

Por favor pregunte si tiene cualquier duda acerca del estudio o de este formato. Su firma abajo indica que decidió por su cuenta participar o que la persona a su cargo participara en el estudio.

Firme (o coloque su huella digital) si usted libremente decidió hacer parte de este estudio

Participante (Padre o acudiente de un menor)	Nombre (Letra Clara)	Lugar y Fecha (Día, Mes, Año)	Firma o Huella Digital
--	----------------------	-------------------------------	------------------------

Testigo

Observé el proceso de consentimiento. El potencial participante leyó este formato (o le ha sido leído), estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para ingresar al estudio.

Testigo	Nombre(Letra Clara)	Lugar y Fecha (Día, Mes, Año)	Firma o Huella Digital
Testigo			

ANEXO 7

FICHA TECNICA DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS

SUBSTRATO	ORIENTACIÓN	TAMAÑO	SUPERFICIE
AL ₂ O ₃	<0001> c plane	10x10x1.0 mm.	Polichada ambas caras
SiO ₂	<0001> c plane	10x10x1.0 mm.	Polichada ambas caras
	<0001> c plane	10x10x1.0 mm.	Polichada una cara

AL₂O₃ single crystal.

Sapphire (single crystal of Al₂O₃) is being used extensively as a substrate for III-V nitrides and for many other epitaxial films.

Physical Properties of Sapphire	
Crystal Structure	Hexagonal. a=4.758 Å c= 12.992 Å
Crystallographic D spacing	(1120) - a plane: 2.379 Å (1102) - r plane: 1.740 Å (1010) - m plane: 1.375 Å (1123) - n_plane: 1.147 Å ⁻ (0001) - c plane: 2.165 Å (1011) - s_plane: 1.961 Å
Crystal Purity	> 99.99%
Melt Point	2040 °C
Density	3.98 g/cm ³
Hardness	9 (mohs)
Thermal Expansion	7.5 (x10 ⁻⁶ / °C)
Specific Heat	0.10 (cal / °C)
Thermal Conductivity,	46.06 @ 0 °C 25.12 @ 100 °C, 12.56 @ 400 °C (W/(m.K))
Dielectric Constant	~ 9.4 @300K at A axis ~ 11.58@ 300K at C axis
Loss Tangent at 10 GHz	< 2x10 ⁻⁵ at A axis , <5 x10 ⁻⁵ at C axis
Standard Products	
As - grown boules <0001> ori.± 0.5°	3" dia x 50 ~ 70 mm length 2" dia x 50 ~ 70 mm length 30 mm dia x 150 mm length
As-cut blanks <0001> ori.± 0.5°	2" dia x 0.7 mm thickness 1" dia x 0.7 mm thickness
Epi -polished substrates C, R, A plane: ori.± 0.5° 1 or 2 sides polished Ra< 10 Å	3" dia. x 0.5 mm 2" dia. x 0.33 mm, 2"dia x 0.5 mm 1" dia x 0.5 mm 0.5" x 0.5" x 0.5 mm 10x10x0.5 mm

SiO₂ Single Crystal Quartz Wafer.

Single crystal quartz wafer is an excellent substrate for microwave filters for wireless communication industries.

Typical Physical Properties	
Purity Wt %	SAW grade: > 99.9 Optical grade: 99.99
Crystal Structure	Hex. a= 4.914 Å c = 5.405 Å
Growth Method	Hydrothermal
Hardness	7.0 Moh's
Density	2.684 g/cm ³
Melt Point	1610 °C (phase transition point: 573.1°C)
Specific heat	0.18 cal/gm
Thermoelectric Constant	1200 μV /°C @ 300 °C
Thermal conductivity	0.0033 cal/cm/°C
Thermal expansion (x10 ⁻⁶ /°C)	α ₁₁ : 13.71 α ₃₃ : 7.48
Index of Refraction	1.544
Q value	1.8 x 10 ⁶ min.
Acoustic velocity, SAW	3160 (m/sec)
Frequency constant, BAW	1661 (kHz/mm)
Piezoelectric coupling ,	K ² (%) BAW: 0.65 SAW: 0.14
Inclusion	IEC Grade II
Standard Quartz Wafer Specifications	
Orientation	Y, X or Z cut: Rotated to any value in the range 30° ~ 42.75° ± 5 min. Primary flat: orientation specified by customer ± 30 min Secondary Flat: orientation specified by customer. Seed: located in the center: width < 5mm, height > 66mm
Polished surface	EPI polished on one side or two sides to Ra < 10 Å Working Area: Wafer diameter minus 3 mm BOW: < 20 μm for 3" wafer and 30 μm for 4" wafer No chips out on working area. In the edge, chip width < 0.5 mm Pit and scratches: < 3 per wafer or < 20 per 100 wafers
Standard Thickness	0.5 mm ± 0.05mm TTV < 5 μm
Standard Diameter	ϕ 2" (50.8mm) ϕ 3" (76.2mm) ϕ 4" (100mm) ±0.2 mm Primary Flat : 22 ± 1.5 mm (ϕ 3") 32 ± 3.0 mm (ϕ 4") Secondary Flat: 10 mm ± 1.5 mm
Production Capability	20,000 wafer per month

SrTiO₃ Strontium Titanate Single Crystal.

SrTiO₃ single crystal provides a good lattice match to most materials with Perovskite structure. It is an excellent substrate for epitaxial growth of HTS and many oxide thin films. SrTiO₃ single crystal has also been used widely for special optical windows and as high quality sputtering target.

	Typical Physical Properties
Crystal Structure	Cubic, a=3.905 Å
Growth Method	Vernuil
Density	5.175 g/cm ³
Melt Point	2080 °C
Hardness	6 (Mohr)
Thermal expansion	10.4 (x10 ⁻⁶ / °C)
Dielectric Constant	~ 300
Loss Tangent at 10 GHz	~5x10 ⁻⁴ @ 300K , ~3 x10 ⁻⁴ @77K
Color and Appearance	Transparent (sometimes slightly brown based on annealing condition). No twins.
Chemical Stability	Insoluble in water
Standard Products	
As - grown boule <100>	30 mm dia. x 30- 50 mm length 22 mm dia. X 30 - 50 mm length
As cut blank <100>	1" dia x 0.7 mm thickness 10 x 10 x 0.7 mm thickness.
Epi -polished substrates <100>, <110> or <111> ori. 1 or 2 sides polished, Ra< 7 Å	1" dia x 0.5 mm 20 x20 x 0.5mm 10x10x0.5 mm