

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA ÓPTICO PARA LA DETECCIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE ADN EN LA SANGRE**



**EDUARDO ANDRÉS CAÑOLA SOTELO
LUIS FERNANDO RANGEL DIAGO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2008**

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA ÓPTICO PARA LA DETECCIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE ADN EN LA SANGRE**

**EDUARDO ANDRÉS CAÑOLA SOTELO
LUIS FERNANDO RANGEL DIAGO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Físico**

**Director
Ing. Rubiel Vargas**

**Co-Directora
Dra. Sonia Gaona Jurado**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2008**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Co-Directora **Doctora** Sonia Gaona Jurado

Jurado **Magíster** Jorge Washington Coronel

Jurado **Magíster** Nelson Rojas Martínez

Fecha de Sustentación: Popayán, 9 de Abril de 2008

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a nuestros padres que en todo momento nos apoyaron creyeron en nosotros, esforzándose por sacarnos adelante, formándonos para dejar huella en el camino de nuestras vidas, por su paciencia, por su amor, su dedicación y su fortaleza.

A los profesores de la Universidad del Cauca, que directa o indirectamente nos legaron alguna enseñanza para afrontar los retos que se nos presentarán a lo largo de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo ni la colaboración de diferentes personas del alma mater, a la profesora Rosa Álvarez por sus clases de genética, a las biólogas Nadia Macca y Lorena Urbano, por la asesoría en el transcurso del trabajo, Patricia Acosta, Zulma Muñoz, y Hernán Sierra por permitirnos trabajar en el laboratorio de Genética Humana, Nelson Rojas por su colaboración y permitirnos el uso de los equipos a su cargo en el grupo CELMOLEC, Carlos Andrade del grupo FISBATEM por facilitarnos ADN comercial, Milton Conde por su asesoría en la parte instrumental, a Mario Patiño del grupo GOL por su asesoría en la parte Óptica, Juan Carlos Argoti en la asesoría de preparación del tinte, Juan Carlos Garzón por la construcción de los soportes de los elementos ópticos, en general al Departamento de Química por su colaboración con el prestamos de los laboratorios y el suministro de algunos reactivos, al Departamento de Física por la formación integral a lo largo de nuestro paso por la Universidad.

A nuestros amigos y compañeros de la Universidad, como Sonia Gaona y Rubiel Vargas, por estar constantemente apoyándonos y dirigiéndonos en el proyecto, y a todos aquellos amigos que nos preguntaron ¿Cuándo es el grado? Motivándonos a seguir adelante a pesar de los obstáculos presentados a lo largo del camino.

Gracias totales.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO 2: REVISIÓN TEÓRICA I: ALTERACIONES EN LA CONCENTRACION DE ADN	7
2.1 METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ADN	10
2.1.1 Citometría de Flujo	12
2.1.2 RT-PCR	12
2.1.3 Electroforesis	13
2.1.4 Espectrofotometría	14
CAPÍTULO 3: ESPECTROFOTOMETRÍA	15
3.1 ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO	15
3.2 ABSORCIÓN Y EMISIÓN POR PARTE DE LA MATERIA	17
3.3 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE	20
3.4 LEY DE BOUGUER LAMBERT BEER	21
3.5 DESCRIPCION DE UN SISITEMA ÓPTICO BÁSICO DE UN ESPECTROFOTÓMETRO	23
CAPÍTULO 4: DISEÑO DEL ESPECTROFOTOMETRO	26
4.1 DISEÑO FINAL	29
4.1.1 Etapa Óptica	30
4.1.2 Etapa Electrónica	34
4.1.2.1 Alimentación	34

4.1.2.2	Detección Amplificación	35
4.1.2.3	Filtrado	36
4.1.2.4	Digitalización	37
CAPÍTULO 5: CONSTRUCCIÓN Y CALIBRACIÓN		38
5.1	CONSTRUCCIÓN ETAPA ÓPTICA	38
5.2	CONSTRUCCIÓN ETAPA ELECTRÓNICA	44
5.3	SOFTWARE	47
5.4	PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES	52
5.5	CALIBRACIÓN DEL FCL-600	56
5.5.1	Calibración de la parte electrónica y óptica	57
5.5.2	Elaboración de curva de patrón para el FCL-600	57
CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y ANÁLISIS		60
6.1	Tratamiento de las muestras	60
6.1.1	Extracción de ADN en sangre	60
6.1.2	Tinción de la muestra	64
6.2	PROCESO DE ELABORACIÓN DE CURVA PATRON PARA EL FCL-600	65
6.2.1	Pruebas con el GeneQuant	65
6.2.2	Pruebas con el FCL-600	68
6.2.3	Construcción de la curva de calibración	69
6.3	CUANTIFICACIÓN DE ADN EN MUESTRAS CON CONCENTRACIÓN DESCONOCIDA CON EL FOTOCOLORIMETRO FCL-600	71
CONCLUSIONES		73
ANEXO A		75
ANEXO B		77
BIBLIOGRAFÍA		78

LISTA DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 2.1. Esquema de un nucleótido	7
Figura 3.1. Espectro de radiación electromagnética	16
Figura 3.2. Representación de los procesos de absorción y emisión en los niveles de energía.	18
Figura 3.3. Espectro de absorción ultravioleta de una preparación del virus del mosaico enanizante del maíz-raza V	20
Figura 3.4. Fenómenos de la interacción de la luz con una muestra de material: reflexión, absorción, transmisión, esparcimiento y luminiscencia.	21
Figura 4.1. Rayos de luz reflejados por un espejo cóncavo con una fuente de radiación situada en el foco.	30
Figura 4.2. Convenciones utilizadas para representar un lente convergente y una divergente.	31
Figura 4.3. Comportamiento de los rayos de luz en lentes, a) Rayos de luz al atravesar un lente convergente, b) Rayos de luz al atravesar un lente divergente.	31
Figura 4.4. Representación del funcionamiento de un filtro pasabandas.	32
Figura 4.5. Rango de transmisión espectral del filtro pasabandas FB600-10	32
Figura 4.6. Rayo de luz pasando por un divisor de haz.	33
Figura 4.7. Representación funcionamiento de la etapa óptica.	33
Figura 4.8. Esquema general del diseño de la etapa óptica.	34
Figura 4.9. Fotografía del fotodetector FDS-100.	35
Figura 4.10. Reflejos causados por la superficie liza de las bases.	36
Figura 4.11. Pulido de las superficies para disminución de reflejos causados por la superficie liza de las bases.	37

Figura 4.12.	Esquema de bloques de la etapa electrónica.	37
Figura 5.1.	Determinación del eje óptico.	39
Figura 5.2.	Lentes alineados y filtro.	41
Figura 5.3.	A la izquierda fotografía del divisor de haz en funcionamiento, a la derecha el divisor de haz.	42
Figura 5.4.	Diagrama que muestra la configuración óptica.	43
Figura 5.5.	Fotografía de la implementación de la etapa óptica.	43
Figura 5.6.	Circuito sugerido por el fabricante para el fotodetector FDS 100.	44
Figura 5.7.	Esquema de conexión de la DAQ (etapa de digitalización).	46
Figura 5.8.	Fotografía de la tarjeta de adquisición de datos.	47
Figura 5.9.	Programa en Lab View 6i para la adquisición y procesamiento de datos.	49
Figura 5.10.	Fotografía FCL-600.	50
Figura 5.11.	Fotografía interfaz en Lab View 6i. En la izquierda se observa la señal proveniente del fotodetector (amplificada) proveniente de la muestra de referencia. A la derecha se observa la correspondiente respuesta de la muestra en estudio. La diferencia entre las dos medidas de voltaje corresponde a la concentración de ADN de la muestra en estudio.	50
Figura 5.12.	Fotografía del FCL-600, especificando sus componentes	51
Figura 5.13.	Fotografía del interior FCL-600.	51
Figura 5.14.	A la izquierda fotografía del espectrofotómetro GeneQuant <i>pro</i> RNA/DNA Calculator, a la derecha medición de concentración de ADN con espectrofotómetro.	59
Figura 6.1.	Fotografía de la adición de Histopaque a la muestra de sangre.	62
Figura 6.2.	Compuestos de la sangre ya separados.	63

Figura 6.3.	Botón de ADN.	63
Figura 6.4.	Muestras de ADN purificado.	64
Figura 6.5.	Reacción de difenilamina con el ADN.	65
Figura 6.6.	Medición de muestras teñidas con DFA, usando FCL-600.	71

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 5.1. Estabilidad de la lámpara halógena, se observa la estabilidad De la iluminancia es alcanzada después de los 1000s.	52
Grafica 5.2. Estabilidad de la fuente de voltaje EDI eco.	53
Grafica 5.3. Medición de la iluminancia después del divisor de haz.	54
Grafica 5.4. Voltajes medidos vs Resistencia variadas en el trimer.	55
Gráfica 5.5. Gráfica de temperatura vs. Tiempo en el interior del FCL-600.	56
Grafica 6.1. Medidas de variación de voltaje con FCL-600.	69
Grafica 6.2. Linealización de datos obtenidos con el FCL-600.	70
Grafica 6.3. Datos de concentración medida con el FCL-600 sobre curva de calibración.	72

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1. Transiciones energéticas en la materia.	19
Tabla 6.1. Datos de concentración y absorbancia obtenidos con el espectrofotómetro GeneQuant <i>pro</i> RNA/DNA Calculator para la muestra en estudio sin tinción.	66
Tabla 6.2. Resultados de medición de concentración de ADN con el espectrofotómetro GeneQuant <i>pro</i> RNA/DNA Calculator a 600 nm.	66
Tabla 6.3. Comparación de concentraciones.	67
Tabla 6.4. Medida de la diferencia de voltaje con el FCL-600 para cada muestra en estudio.	68
Tabla 6.5. Diferencia de voltaje medido por el FCL-600 y concentración medida con el GeneQuant.	68
Tabla 6.6. Muestras con concentración desconocida medidas con el FCL-600 y el GeneQuant.	72

GLOSARIO

DAQ: Tarjeta de adquisición de datos (**data acquisition**) Tarjeta para digitalizar señales electrónicas y transmitir las a un PC.

SPOT: Foco de luz potente, directa y con un haz luminoso de anchura controlable que se utiliza en fotografía, cine, teatro, etc., para iluminar una zona pequeña.

Botón de ADN: Cantidad de ADN precipitada en el proceso de extracción.

Enfermedad autoinmune: Es una enfermedad caracterizada por acción de los efectores inmunológicos hacia componentes de la propia biología corporal. Es decir que el sistema inmunitario se convierte en el agresor y ataca a partes del cuerpo en vez de protegerlo. Existe una respuesta inmune exagerada contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. Las causas son todavía desconocidas y son probablemente el resultado de múltiples circunstancias.

CHELEX: Es una resina cargada negativamente que se une a diferentes compuestos de la sangre como las proteínas.

Sub VI: Sub rutinas o programas que componen el programa principal en Lab View.

PCR: siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

Plataforma de desarrollo: En informática, es el entorno de software común en el cual se desenvuelve la programación de un grupo definido de aplicaciones.

Trimer: Potenciómetro de precisión.

RESUMEN

En este trabajo se presenta el diseño y construcción de un sistema óptico acoplado a computador mediante un puerto serial, que permite la detección y cuantificación de ADN en sangre, utilizando los principios básicos de la espectrofotometría UV-Visible.

El propósito del equipo construido es determinar los niveles de ADN en sangre humana usando una fuente de luz centrada en 600 nm (color naranja) y un colorante de difenilamina. La luz es acoplada mediante elementos ópticos de colimación para iluminar de manera uniforme un divisor de haz. El sistema de detección está dotado de dos fotodetectores a partir de los cuales, e involucrando una etapa de electrónica convencional, se realiza el registro en un PC.

El instrumento está basado en los principios de: óptica geométrica, espectrofotometría, electrónica digital, comunicación serial e instrumentación virtual. Para fines prácticos se divide en una etapa óptica, una etapa electrónica y una etapa de procesamiento de datos.

Para la validación del funcionamiento del equipo se compararon sus resultados con los similares obtenidos por un instrumento de última generación adquirido por el laboratorio de genética humana de la Universidad del Cauca.

La importancia de detectar y cuantificar los niveles de ADN en sangre de personas sanas y enfermas va enfocada a realizar las comparaciones para entender las alteraciones que ocurren en la concentración de ADN en presencia de enfermedades u otros factores, con miras a obtener ayudas en diagnósticos y pronósticos terapéuticos en enfermedades tan complejas como el cáncer e infecciones crónicas, entre otras.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En el año 2005, el grupo de inmunología de la Universidad del Cauca planteó un proyecto de investigación alrededor de la relación entre la concentración de ADN con enfermedades auto-inmunes. El grupo GIOPAD tuvo conocimiento del proyecto. Debido a las posibilidades que brinda la física en el campo de la bio-óptica, se propuso el diseño y construcción de un sistema óptico para la medición de concentración de ADN.

El grupo de inmunología sometió el proyecto a convocatoria abierta por Colciencias buscando así, cubrir los rubros que involucraba el proyecto. No obstante el proyecto no fue aprobado. Sin embargo el interés en desarrollar el proyecto continuó debido a su gran impacto científico y social.

Alrededor del mundo se han realizado estudios en los cuales se evidencia una estrecha relación entre los niveles de ADN presentes en la sangre y el padecimiento de alguna enfermedad como el cáncer. En la actualidad en nuestro país, hay pocos estudios realizados para determinar la relación entre enfermedad y la concentración de ADN en la sangre.

En los tejidos la proliferación celular se incrementa con la activación del órgano. El caso más didáctico es el sistema inmune y la hemopóyesis que experimenta proliferación y regulación constante de sus poblaciones. Al activarse el sistema inmune por antígenos, infecciones y enfermedades auto-inmunes; se incrementa exponencialmente el número de células. Una vez desactivado el sistema inmune hay apoptosis masiva de inmunocitos para volver al estado inicial. Otras situaciones donde hay gran proliferación celular o

actividad mitótica son el embarazo, trauma y otras situaciones como el ejercicio¹.

Debido a todas las situaciones expuestas anteriormente donde se ha demostrado que la concentración de ADN aumenta cuando hay presencia de tumores, enfermedades y otras circunstancias, es viable utilizar la cuantificación de ADN en la sangre para el diagnóstico temprano de estas. Además, cabe la posibilidad de llevar un control, de cómo un paciente reacciona a un tratamiento verificando periódicamente el aumento o disminución de la concentración de ADN.

El diagnóstico de las entidades virales es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina actual, particularmente en países como Colombia donde el diagnóstico viral se hace de manera empírica. Durante las últimas décadas, el desarrollo progresivo de nuevas y mejores herramientas para evidenciar las causas de tipo viral, ha hecho posible que estas entidades se puedan descubrir y estudiar no sólo a nivel de laboratorios clínicos especializados, sino también en los básicos.

Un laboratorio clínico eficiente debe contar con equipos y recursos necesarios para la atención oportuna y eficiente de los pacientes. La detección de niveles de ADN puede utilizarse para la validación de métodos de extracción de ADN en laboratorios de biología molecular, inmunología y genética. Esta validación permite asegurar la efectividad y precisión de los procesos llevados a cabo en estos laboratorios, mostrando confiabilidad en sus resultados y puede ser indicativo de anormalidades como diferentes tipos de cáncer y enfermedades auto-inmunes, para lo cual, se utilizan normalmente kits comerciales de un costo elevado, lo que limita el uso de la técnica a laboratorios de altos recursos. En muchas regiones de nuestro país, se carece de equipos para diagnósticos y la mayoría de las pruebas de laboratorio se realizan en forma cualitativa, con

¹ CURTIS, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000.

base en los sentidos y en la experiencia. Por tanto, se hace evidente, la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y equipos para la detección de ADN.

Para impulsar la investigación de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento es necesario contar con equipos precisos y confiables especializados en la medición de fenómenos biológicos. Por esta razón se vio la necesidad de construir un sistema capaz de detectar y cuantificar niveles de ADN en la sangre, con el propósito de apoyar y fomentar investigaciones enfocadas en encontrar la relación entre concentración de ADN y enfermedades asociadas.

El desarrollo del trabajo involucra varios aspectos tecnológicos, entre ellos, la óptica refractiva, mecanismos de control, electrónica y software computacional, conjugando diferentes campos de la física, la medicina y la ingeniería, como una aplicación a nivel de laboratorio científico.

Este proyecto es una ayuda para analizar el ADN en sangre, se desarrollará la tecnología para medir la concentración de ADN, potencialmente útil, para investigaciones más minuciosas, como el análisis de fragmentos individuales presentes en el ADN, los inmunólogos podrán investigar la relación entre ADN y anticuerpos anti-DNA o buscar vacunas para prevenir el cáncer, enfermedades auto-inmunes, etc.

Los resultados de este proyecto pueden ayudar a el diagnóstico temprano de enfermedades de tipo viral y tumoral para un tratamiento anticipado de estas enfermedades pudiendo en algunos casos llegar a la curación del paciente, capacitará a sus ejecutores para afrontar otros problemas de tipo ingenieril, con el ánimo de ir abordando y apropiando un pensamiento científico en forma paralela a los avances tecnológicos actuales. Finalmente el proyecto brinda la posibilidad de realizar aportes y soluciones a tecnologías relativamente costosas, como son; la PCR en tiempo real y la electroforesis, con un soporte científico apropiado.

El objetivo central del proyecto fue Diseñar y construir un sistema óptico para la detección y cuantificación de niveles de ADN en sangre humana. Para ello se hizo necesario cumplir una serie de objetivos específicos, tales como:

- Diseñar un sistema óptico como solución primaria a la detección de niveles de ADN
- Construir los sistemas de acondicionamiento y las interfaces necesarias para el registro de concentración de ADN en un ordenador.
- Diseñar un software para el tratamiento de los datos registrados con la concentración de ADN en el ordenador.
- Calibrar el sistema de medida mediante la comparación con patrones conocidos de resultados obtenidos a partir de instrumentación biomédica.

La estructura del documento se desarrolla de forma coherente con los términos y procesos que se presentaron durante el desarrollo de la investigación. Para tal fin el **capítulo 2** “*Alteraciones en la concentración de ADN*” es dedicado a una revisión teórica sobre los conceptos de la estructura molecular del ADN, su interacción con la radiación electromagnética y métodos de cuantificación de la concentración de ADN.

En el **capítulo 3** “*Espectrofotometría*” describe las bases teóricas de esta técnica de medición siguiendo la ley de **Lambert-Bourguer-Beer** y su instrumentación.

El **capítulo 4** “*Diseño del espectrofotómetro*” se dedica a describir el proceso de diseño de un espectrofotómetro especializado en la medición de concentración de ADN en sangre, como resultado de este diseño se llega al diseño de un **fotocolorímetro** centrado en 600 nm.

En el **capítulo 5** “*Construcción y calibración*” se describe la implementación del diseño obtenido en el capítulo 4 y su correspondiente calibración para obtener una medida de concentración de ADN confiable desplegada en un PC.

En el **capítulo 6** “*Resultados y análisis*” brinda un análisis y discusión de los resultados obtenidos por el fotolorímetro implementado, comparándolos con un instrumento especializado en la medición de parámetros biomédicos como concentración de ADN, concentración de proteínas entre otros.

Finalmente, se reportan las conclusiones.

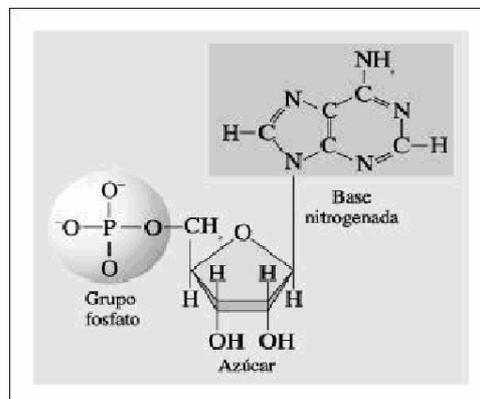
El manual del uso del equipo se encuentra en el **Anexo A**

En el **Anexo B** se presentan recomendaciones para trabajos futuros en la implementación de este tipo de equipos.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN TEÓRICA I: ALTERACIONES EN LA CONCENTRACIÓN DE ADN

La información genética que determina la enorme variedad de moléculas de proteínas que se encuentran en los organismos está codificada en los *ácidos nucleicos*. La información contenida en los ácidos nucleicos se transcribe y luego se traduce a las proteínas. Son las proteínas las moléculas que finalmente ejecutarán las “instrucciones” codificadas en los ácidos nucleicos².

Figura 2.1. Esquema de un nucleótido



Tomado de CURTIS, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana S.A. 2000.

² CURTIS, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000

Así como las proteínas están formadas por cadenas largas de aminoácidos, los ácidos nucleicos están formados por cadenas largas de nucleótidos. Un nucleótido, sin embargo, es una molécula más compleja que un aminoácido. Está formado por tres subunidades: un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos y una base nitrogenada. En sus anillos hay enlaces dobles conjugados con sencillos (figura 2.1.), lo que hace que absorban la luz ultravioleta, UV (ver capítulo 3).

El grupo fosfato le confiere al **Ácido Desoxirribonucleico** (ADN) polaridad. Dos nucleótidos se unen entre sí a través de puentes de hidrógeno, dos entre adenina y timina y tres entre citosina y guanina, para el caso del ADN.

No se conoce el origen o el significado del incremento o decremento de la concentración de ADN en la sangre, una hipótesis se basa en afirmar que es el resultado de los procesos de generación y destrucción celular.

El número celular de un tejido es casi siempre el mismo, no obstante sufre dos tipos de alteraciones: transitoria (por situaciones fisiológicas) y constante (por enfermedades). El número de células y el contenido de ADN tisular (de tejidos) dependen del equilibrio crítico entre proliferación y destrucción celular (hematopoyesis y necrosis-apoptosis). Durante la proliferación celular una célula genera células hijas, duplicando su ADN, lo que incrementa la cantidad de ADN en los tejidos. El proceso de proliferación celular es dinámico y su velocidad depende de la clase de tejido y de las situaciones fisiológicas normales y anormales. Los procesos de proliferación celular son contrarrestados por la desaparición de células por necrosis o apoptosis, llevando a un equilibrio constante en el número de células de un tejido. Si la proliferación es acelerada o desordenada origina tumores benignos y/o malignos, si la muerte celular es incrementada, ocurre la fibrosis y atrofia de órganos (degeneración)³.

³ CURTIS, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000

Además de la degeneración celular ha sido ampliamente estudiado el efecto de la radiación ultravioleta, RUV sobre la piel. El grado en que pueden darse los efectos de esta radiación sobre la piel depende tanto de la sensibilidad a ella como de la naturaleza, intensidad y duración de exposición a la radiación. Cuanto más expuestos estén la piel y los ojos a la RUV, más se incrementa el riesgo de enfermedades tales como inflamación de la córnea y/o conjuntivitis, daños en la retina, cataratas, envejecimiento prematuro de la piel y tumores cutáneos.

La piel contiene moléculas específicas conocidas como *cromóforos* que al absorber la RUV y la radiación visible, protegen la piel de los efectos biológicos nocivos. Estas moléculas tienen un espectro de absorción característico que depende de su estructura molecular. Los cromóforos son "energizados" por absorción de radiación llevando a una reorganización molecular y/o a una acción con las moléculas vecinas (reacciones fotoquímicas). Por tanto, ninguna reacción fotoquímica tiene lugar en la piel si la longitud de onda a la que es expuesta la persona no es específicamente absorbida por los cromóforos de la piel. La piel posee cromóforos endógenos normales o fisiológicos como son el ADN, las proteínas que contienen gran cantidad de aminoácidos aromáticos, los esteroides, los liposomas que dan lugar a reacciones cutáneas obligatorias, las porfirinas y el ácido urocánico en el estrato córneo. La melanina es un absorbente de la radiación lumínica y es el recurso fundamental de protección al daño. Al absorber el fotón, la melanina es llevada a un estado excitado, que al decaer perderá energía en forma de calor. No obstante, algunas de las moléculas involucradas en la actividad de excitación desempeñan un papel en el daño celular, por lo que en las quemaduras solares las células tienen alto contenido de melanina, produciendo daño celular. Además existen también los cromóforos anormales o fotosensibilizadores que pueden llevar a consecuencias no esperadas, como mutaciones. La RUV tiene acción casi directa sobre carcinogénesis, incrementando la sensibilidad al cáncer de la persona expuesta, por otro lado, la luz visible y la infrarroja (RIR) se encargan de propagar el efecto sobre todas las células. Por lo anterior, se afirma que la

RUV tiene papel inductor mientras que la luz visible y la RIR tiene un efecto promotor en lo que se refiere a la carcinogénesis⁴.

Debido a todas las situaciones expuestas anteriormente y conociendo que la concentración de ADN aumenta cuando hay presencia de tumores, enfermedades y otras circunstancias, es viable utilizar la cuantificación de ADN en la sangre para el diagnóstico temprano de enfermedades. La cuantificación además posibilitaría llevar un control de cómo un paciente reacciona a un tratamiento, verificando periódicamente el aumento o disminución de la concentración de ADN.

2.1 METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ADN

Los principales métodos de cuantificación de ADN son; Citometría de flujo, PCR en tiempo real, Espectrofotometría y Electroforesis, los cuales han sido utilizados en diferentes estudios, dependiendo de la necesidad o la accesibilidad de los equipos, por ejemplo:

- En los estudios publicados en 1993 por A. Brugarolas y F.J. Pardo Mindán, utilizaron la citometría de flujo para medir como aumenta el índice de ADN en el crecimiento de tumores⁵.
- Los autores Diniz Freitas, et al⁶. también utilizaron la técnica de Citometría de flujo para obtener el aumento del área del núcleo celular.

Las técnicas mencionadas, además de cuantificar el ADN también permiten observar la forma de la célula como factor determinante en cada estudio, por ejemplo:

⁴ VALDIVIA BONET Luis. Fotobiología Cutánea: Generalidades. En: Revista Peruana de Dermatología, Vol. 12, No 2 (2002).

⁵ A. BRUGAROLAS. Aplicación de la citofluorometría a los tumores sólidos para medida del ADN y fase S. En: Medicina Clínica, Vol. 101, No. 19. (1993) p 750-756.

⁶ DINIZ-FREITAS M, GARCÍA-GARCÍA A, CRESPO-ABELLEIRA A, MARTINS-CARNEIRO JL, GÁNDARA-REY JM. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. En: Medicina Oral, Vol.9. (2004) p.355-61.

- M. J. Garrido, et al.⁷ han utilizado la técnica de espectrofotometría de UV - visible para cualificar la calidad del ADN en el proceso de purificación del mismo.

El indicativo de calidad del proceso es la razón entre la cantidad de ADN y de proteínas, por lo cual se requiere de la cuantificación de ambos, así:

- Gilead Sciences publicó en el 2002 un artículo del estudio realizado en Atenas por el doctor Stephanos Hadziyannis, donde cuantificó el ADN de la hepatitis B con el fin de observar cómo disminuía la concentración del mismo con el uso de un fármaco llamado Adefovir Dipivoxil 8.
- Luz Aurora Martínez Contreras en su tesis de maestría “Tipos de Papilomavirus de alto riesgo circulantes en mujeres de San Luís de Potosí y Guanajuato”, presentada en el año 2005, utilizó la técnica de RT-PCR para la cuantificación de ADN⁹.
- En la revista Fitotecnia Mexicana apareció en el año 2005 el artículo “Diversidad genética en poblaciones de Manzano de Queretano, México, revelada por marcadores RAPD” en el cual la cuantificación de ADN se realizó mediante Electroforesis en gel agarosa 0.8%. Los resultados se compararon con un gel patrón con concentraciones conocidas de ADN¹⁰.

A seguir se hará una breve descripción de cada una de las técnicas utilizadas en los ejemplos citados.

⁷ GARRIDO M. J. Purificación y serología del virus del mosaico enanizante del maíz - raza venezolana. En: Agronomía Trop. Vol. 43, No 3, (1993). p 87-106.

⁸STEPHANOS Hadziyannis. The New England Journal of Medicine. Web: <http://www.accesomedia.com/display_release.html?id=10296>

⁹ MARTÍNEZ CONTRERAS Luz Aurora Tipos de Papilomavirus de alto riesgo circulantes en mujeres de San Luís de Potosí y Guanajuato. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnología, A.C. México. (2005)

¹⁰ GONZALES HORTA Azucena. En: Fitotecnia Mexicana, Vol. 28, No. 002, (2005).

2.1.1 Citometría de flujo

Es un método analítico por el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz por células o partículas microscópicas, alineadas mediante una corriente líquida laminar, cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad (hasta miles de células/segundo) frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada.

Para cuantificar la concentración de ADN con la técnica de citometría de flujo se utilizan colorantes para ADN con el fin de incrementar su fluorescencia tras su unión al ácido nucleico. La cantidad de colorante unido es proporcional a la cantidad de ADN, y por tanto la luz recogida en el citómetro es proporcional a la cantidad de ADN de cada célula¹¹.

2.1.2 RT-PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR por sus siglas en inglés ("Polymerase Chain Reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio, que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y que exista una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se quiere copiar, para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La RT-PCR ó PCR cuantitativa es una variante de la PCR utilizada por Mullis, dando la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de un genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi

¹¹ CONNOR Enrique. Web: <<http://www.uv.es/oconnor/medicina/Citometria%20AB.ppt>>

todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se requiere amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando¹².

2.1.3 Electroforesis

Es una técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular y carga eléctrica. Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que las proteínas se cargan con sustancias como el SDS (amortiguador) que incorpora cargas negativas de una manera dependiente del peso molecular. Para la separación se usa un gel de agarosa o poliacrilamida (fibras cruzadas, como una malla). Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla, por la que las pequeñas se moverán mejor y más rápidamente. Así las más pequeñas y livianas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

En este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, lo cual se realiza visualmente o con el auxilio de algún programa computacional que contraste intensidades de color¹³.

¹²CULTEK,S.L. Web<http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?P=Aplicacion_QPCR&opc=introduccion>

¹³ Web :< <http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis>.>

2.1.4 Espectrofotometría

La medida de absorbancia de una muestra expuesta a radiación UV puede relacionarse con la concentración de la muestra en estudio por medio de la ley óptica *Lambert-Beer*. Como se dijo anteriormente, dado que el ADN es una sustancia polar y en sus anillos hay enlaces dobles conjugados con sencillos, absorbe la luz ultravioleta, por lo tanto, es posible tener una medida de la concentración de ADN en una muestra por medio de la medida de absorbancia de UV¹⁴.

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Las ventajas de esta técnica con respecto a las anteriores son; realiza las medidas de forma directa, no implica altos costos, es una técnica muy precisa y sencilla de utilizar. Por estas razones, la técnica de espectrofotometría fue la elegida para el desarrollo del instrumento óptico utilizado en este trabajo. Las bases teóricas de la técnica serán ampliadas en el capítulo 3.

¹⁴ CURTIS, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000

CAPITULO 3: REVISIÓN TEÓRICA II: ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y según sea la radiación utilizada se dividen en:

- Espectrofotometría de absorción visible (colorimetría),
- Ultravioleta
- Infrarroja.

A continuación se clasificarán los principales tipos de espectrofotometría según la interacción luz-molécula (emisión o absorción) y según la zona del espectro en la que se trabaja¹⁵.

3.1 ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

La luz se puede definir como un conjunto de radiaciones electromagnéticas que se propagan en el espacio. Estas radiaciones se pueden describir como partículas o como ondas. Al hacer la descripción de la luz como una onda esta se basa en campos eléctricos y magnéticos que oscilan perpendicularmente a la dirección de traslación por el espacio dando lugar a ondas transversales.

La radiación electromagnética se define mediante dos parámetros:

¹⁵ BREGMAN, Allyn. Laboratory investigations in cell and molecular biology. 3 ed. Nueva York: John Wiley. 1996.

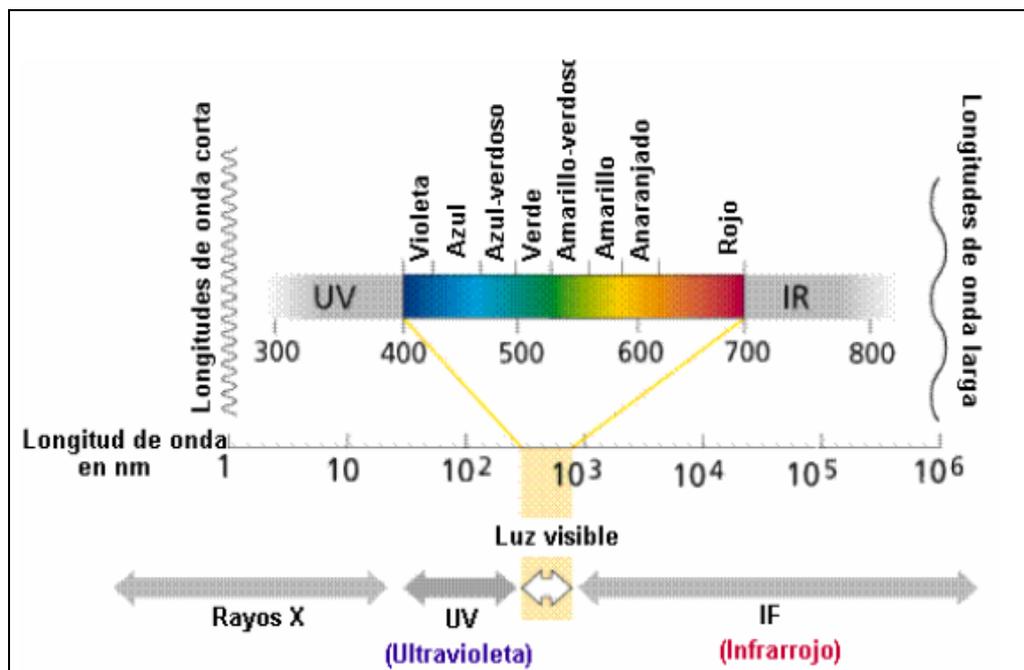
a) la *longitud de onda* (λ) que es la distancia recorrida por un ciclo de onda completo, de cresta a cresta.

b) la *frecuencia* (ν) que es el numero de oscilaciones completas que realiza la onda en unidad de tiempo.

Cuando las ondas electromagnéticas se organizan de acuerdo con su frecuencia o su longitud de onda, la disposición ordenada se llama *espectro electromagnético*. No existen divisiones o limites estrictos para separar una región de la otra en el espectro electromagnético. Los límites son arbitrarios y se han escogido de acuerdo con la instrumentación utilizada para su medición¹⁶.

En la figura siguiente, se muestran las zonas del espectro.

Figura 3.1. Espectro de radiación electromagnética.



Tomado de Web:

<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/ecofisiologia/imagenes/espectro_electromagn%25E9tico.jpg>

¹⁶ OLSEN D, Eugene. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté. 1986.

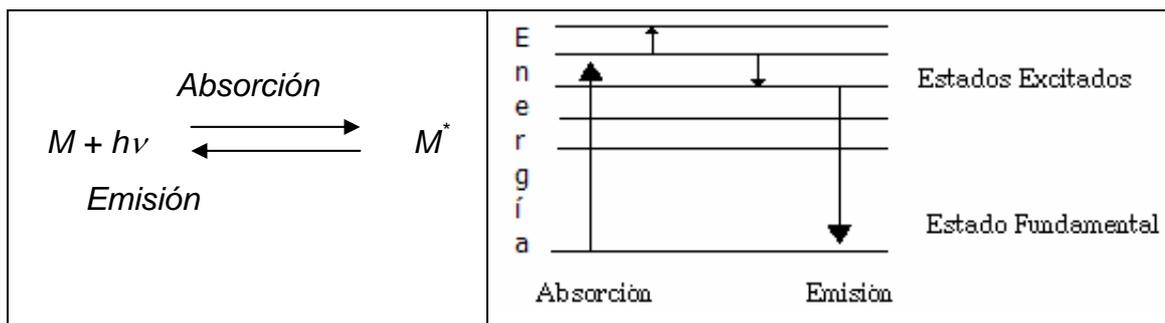
- La región de los *rayos gamma* considera las radiaciones con longitudes de onda menores que 0.01nm.
- La región de los *rayos X* cubre aproximadamente desde 0.01nm hasta 10nm.
- La región del *ultravioleta lejano* cubre desde 10nm hasta 200nm y el *ultravioleta cercano* desde 200nm hasta 380 nm.
- La región del *visible* es la porción del espectro a la que el ojo humano es sensible, ocupa una banda delgada que se extiende generalmente desde 380nm hasta 780nm. Las longitudes de ondas más cortas del espectro visible corresponden a la luz violeta y la más larga a la luz roja y entre estos extremos se encuentran todos los colores.
- La región del *infrarrojo* cubre desde 750nm hasta 10^6 nm.
- La región de los *microondas* se extiende desde 10^6 nm hasta 3×10^7 nm.
- Las ondas de *radio* cubren radiaciones de longitudes de onda desde 3×10^7 nm o mayores.

3.2 ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE RADIACIÓN POR PARTE DE LA MATERIA

Cuando una molécula absorbe un fotón, su energía interna aumenta y el átomo o molécula pasa a un estado inestable, por lo que rápidamente vuelve a liberar esa energía “sobrante” y vuelve a su estado inicial en el cual tiene mayor estabilidad. El estado de más baja energía interna posible se denomina estado fundamental y el estado mas energético se llama estado excitado. La absorción de radiación produce un paso del estado fundamental al excitado (excitación) y en el proceso contrario (relajación) hay una liberación de energía. Este último proceso de desprendimiento de radiación se llama emisión. Estos procesos se

pueden representar como una reacción química y en un diagrama de energía (ver figura 3.2).

Figura 3.2. Representación de los procesos de absorción y emisión en los niveles de energía.



Tomado de OLSEN D, Eugene. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté. 1986.

Donde,

M Materia en estado fundamental.

$h\nu$ Energía de radiación.

M^* Materia en estado excitado.

Cuando una molécula absorbe una radiación electromagnética, el aumento en el nivel energético interno de la molécula produce unos cambios en los enlaces intramoleculares y/o en el movimiento de los electrones en la estructura de la nube electrónica. Estos cambios se llaman transiciones y se clasifican en tres tipos según la energía requerida, de mayor a menor:

Tabla 3.1. Transiciones energéticas en la materia.

TIPO DE TRANSICION	INTERACCION ENTRE
Electrónicas.	Átomos
Vibraciones	Moléculas o iones
Rotacionales	Moléculas o Iones

Tomado de OLSEN D, Eugene. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté. 1986.

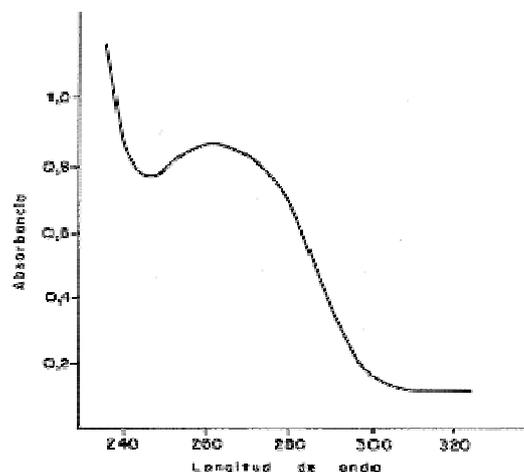
Las radiaciones mas energéticas ocurren en las regiones de menor longitud (ultravioleta - luz visible), estas radiaciones comunican suficiente energía como para alterar el movimiento orbital de los electrones, tanto alrededor de un átomo solo como de los orbitales de enlace entre dos átomos. Las radiaciones menos energéticas (infrarrojo) producen cambios en los movimientos de vibración y rotación de la molécula.

Para realizar la identificación de una sustancia, generalmente se hace incidir radiaciones electromagnéticas de diferente energía. Normalmente se estudia un rango de radiaciones y se va aumentando (o disminuyendo) la longitud de onda de las radiaciones incidentes desde un extremo del rango hasta el extremo opuesto. Así se obtiene un **espectro de absorción** de la sustancia, que se puede representar gráficamente¹⁷ (ver figura 3.3).

Los picos que se obtienen en un espectro corresponden aproximadamente a las transiciones energéticas de un enlace molecular, por lo tanto el espectro es único de cada molécula. Si se tiene el espectro de absorción de una molécula se puede identificar esta con bastante precisión.

¹⁷ OLSEN D, Eugene. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté. 1986.

Figura 3.3. Espectro de absorción ultravioleta de una preparación del virus del mosaico enanizante del maíz-raza V [4].



Tomado de M. J. Garrido, Purificación y serología del virus del mosaico enanizante del maíz - raza venezolana Web: [http:// www_redpav-fpolar_info_ve-agrotrop-v43_3-4-v433f104_gif.htm](http://www_redpav-fpolar_info_ve-agrotrop-v43_3-4-v433f104_gif.htm), (1993).

3.3 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA – VISIBLE (UV- VISIBLE)

La espectrofotometría de UV - Visible es un método espectroscópico que trabaja en el rango correspondiente a las regiones Ultravioleta (lejano: 10-200nm, cercano: 200-400nm) y Visible. La espectrofotometría de absorción en el Ultravioleta –Visible (UV-Visible), se considera como una técnica analítica que mide la cantidad de radiación electromagnética absorbida por un compuesto a una longitud de onda determinada dentro de este rango, siendo necesario aplicar la teoría de absorción, específicamente la ley de Bourguer-Lambert-Beer¹⁸.

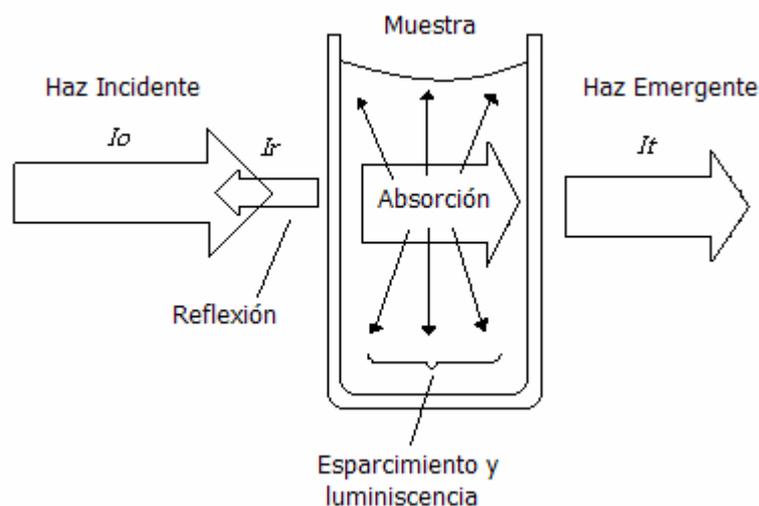
¹⁸ SKOOG DOUGLAS. Principios de Análisis Instrumental. 5 ed. Madrid: Mc Graw Hill. 2001.

3.4 LEY DE BOURGUER- LAMBERT- BEER

Bourguer, Lambert y Beer, a través de sus observaciones establecieron relaciones de la variación de la intensidad de la luz transmitida por una muestra con el espesor de ella o con la concentración de la sustancia, para materiales translucidos. Estas relaciones se conocen como la ley de **Bourguer- Lambert- Beer** o **ley general de la espectrofotetría** que permite hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de la luz absorbida por la muestra.

Cuando una radiación atraviesa una sustancia semitransparente, se transmite parcialmente, es decir que parte se absorbe o se refleja dependiendo de la sustancia y de la longitud de onda de la radiación (ver figura 3.4)

Figura 3.4. Fenómenos de la interacción de la luz con una muestra de material: reflexión, absorción, transmisión, esparcimiento y luminiscencia.



Esta ley se puede expresar en términos de potencia de luz o de intensidad de luz, asumiendo luz monocromática, como:

$$\frac{I_t}{I_o} = 10^{-\epsilon bc} \quad (3.1)$$

Donde I_t es la intensidad de la luz transmitida por la muestra, I_o la intensidad de luz que incide sobre la muestra y que proviene de la fuente, ϵ el coeficiente de absortividad molar en unidades de $M^{-1}cm^{-1}$, b es la longitud de la trayectoria del haz de luz a través de la muestra o el espesor de la celda en centímetros o lo que se conoce como camino óptico y c es la concentración de la muestra.

La relación I_t/I_o se conoce como transmitancia, T , y es la medida primaria que se realiza en los instrumentos para medir la absorción de luz por parte de una muestra. Considerando que el haz es de radiación paralela y que incide perpendicularmente sobre las superficies planas y paralelas de la muestra.

Si la relación se expresa en forma porcentual, entonces se llama porcentaje de transmitancia:

$$\%T = 100 \frac{I_t}{I_o} \quad (3.2)$$

La luz absorbida o absorbancia es $I_o - I_t$ es decir la diferencia entre la intensidad de la luz incidente y la transmitida después de pasar a través de la muestra. A veces se expresa la absorbancia en forma porcentual en función de la transmitancia medida como,

$$\text{Porcentaje de absorción} = (T_{\text{blanco}} - T_{\text{muestra}}) * 100$$

Cuando se toma el logaritmo decimal negativo de la relación I_t/I_o entonces:

$$-\log \frac{I_t}{I_o} = -\log T \quad (3.3)$$

o,

$$\log T = \log I_o - \log I_t = A \quad (3.4)$$

relación que representa la cantidad de luz absorbida por la muestra. La ecuación (3.4) recibe el nombre de *Absorbancia* y se designa por **A**.

La ley de Bourguer- Lambert- Beer se puede entonces escribir de las siguientes formas:

$$\begin{aligned} \frac{I_t}{I_o} &= 10^{-\epsilon bc} \\ -\log T &= \epsilon bc \\ -\log T &= A = \epsilon bc \end{aligned} \quad (3.5)$$

El coeficiente de absortividad molar ϵ es función tanto de la longitud de onda como del índice de refracción de la solución y es característico de cada sistema soluto-solvente. Es decir es una propiedad intensiva que no depende de la concentración de la sustancia y representa la absorción de la luz por parte de un mol de soluto para una longitud de onda dada.

Si no se conoce el peso molecular de la sustancia, la ley de Beer se puede expresar como:

$$A = abc \quad (3.6)$$

Donde a se denomina coeficiente de absortividad y sus unidades dependen de las unidades de concentración utilizadas, que pueden estar en g/L o g/mL.

El registro de la variación del coeficiente de absortividad molar ϵ o de la absorbancia **A**, o de la transmitancia **T**, en función de la longitud de onda da origen a lo que se denomina "**espectro**" o curva espectral de una sustancia química. En muchas ocasiones la curva espectral se presenta como absorbancia vs longitud de onda y el espectro se denomina espectro de absorción, o en función de la transmitancia, espectro de transmisión.

De igual forma cuando se registra la emisión de radiación en función de la longitud de onda, los espectros se denominan espectros de emisión, o espectros de fluorescencia¹⁹.

3.5 DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA ÓPTICO BÁSICO DE UN ESPECTROFOTÓMETRO

Los instrumentos para realizar medidas de absorción de luz por parte de las especies químicas, constan básicamente de los siguientes componentes:

- La **fente de luz que emite la radiación** que posteriormente interactúa con la muestra. Si irradia luz en un intervalo amplio de longitudes de onda, recibe el nombre de fuente continua. Si irradia luz solo en ciertas longitudes de onda específicas, recibe el nombre de fuente de líneas.
- Un sistema que permite separar bandas de luz estrechas, o **monocromador**, constituido por filtros, lentes, espejos, redes de difracción, prismas de refracción, rendijas, etc.
- Un compartimiento para colocar la **muestra en celdas o cubetas** adecuadas, dependiendo de la muestra y de la región del espectro utilizada.
- Un sistema para la detección de la radiación que ha atravesado la muestra o un sistema **detector**, cuyas características dependen de la zona del espectro utilizada. Si la señal lumínica es transformada en señal eléctrica el sistema recibe el nombre de **transductor**.
- Un sistema para la **amplificación, transformación y comparación de la señal eléctrica** para su posterior registro.

¹⁹ HOLLAS. Michael. Modern Spectroscopy. 4 ed. Inglaterra: John Wiley. 2004.

- Sistemas de registro de la señal mediante movimiento de agujas o señales digitales o registro gráfico o mediante sistemas computarizados.

Actualmente, los sistemas correspondientes a la fuente, monocromador, celda y detector son llamados **módulos característicos**, ya que su diseño, materiales ópticos y sus características dependen de la región del espectro que se esté utilizando. Los sistemas de amplificación, transformación, comparación de la señal y registro se llaman **módulos procesadores** y presentan características comunes sin importar la zona del espectro utilizado²⁰.

²⁰ WILARD. Hobart. Métodos Instrumentales de Análisis. México: Iberoamericana. (1991).

CAPÍTULO 4: DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO

De acuerdo con lo expuesto en los capítulos anteriores, un instrumento adecuado para la cuantificación de ADN es un espectrofotómetro, por su bajo costo, la simplicidad del equipo, precisión y la confiabilidad de los principios físicos que rige la espectrofotometría.

El equipo a diseñar se compone de tres etapas básicas que son la etapa **óptica, electrónica y software.**

Para el diseño de la etapa óptica la primera opción como fuente de radiación fue un láser centrado en 260 nm, debido a que el ADN absorbe a esta longitud de onda. No obstante, el no contar con financiación externa restringió el desarrollo del proyecto, al diseño de un instrumento con componentes de bajo costo, sin afectar el funcionamiento.

La fuente de radiación láser fue descartada porque no era una fuente de radiación comercial y su construcción era de un valor de \$26000 dólares elaborado por Crystal Optics. La opción considerada fue un bulbo de Deuterio, que también es una fuente de radiación UV, pero se descubrió que requiere elementos ópticos de colimación para radiación UV, de un costo elevado y que además implica una exposición constante a la radiación ultravioleta durante la construcción del equipo, perjudicial para la salud (aumentará el riesgo de enfermedades cutáneas y oculares). Finalmente se optó por utilizar una fuente de radiación visible, que es económica, comercial y no produce daños severos en la salud.

Como ya se mencionó, el ADN absorbe a 260nm, que está por fuera del rango de la radiación visible, por lo cual surgió la necesidad de hacer un tratamiento a la muestra de ADN para correr el pico de absorción dentro del rango de luz visible, este tratamiento consistió en un proceso de coloración de las muestras.

La elección de un colorante requirió la investigación de su naturaleza, propiedades y disponibilidad en el mercado. Como resultado de esta investigación se analizaron dos colorantes, Picogreen y Difenilamina. Debido a que son los colorantes que se adhieren a la molécula de ADN más utilizados en el mercado. El Picogreen corre el pico de absorción del ADN a 532 nm, dando la posibilidad de trabajar con un láser verde, simplificando la etapa óptica, debido a que no requiere elementos de colimación, pero el reactivo es muy costoso, siendo que el vial (kit de coloración) para diez muestras cuesta alrededor de \$1'360.000 pesos. Se pensó en la posibilidad de replicar el colorante, encontrando que el componente principal, es una proteína protegida con una patente, que nuevamente eleva los costos. Finalmente se eligió el **colorante de Difenilamina** por la disponibilidad de sus reactivos, su bajo costo con relación al Picogreen y su reproducibilidad.

Elegido el colorante y hecho la investigación sobre su proceso de obtención, el siguiente paso fue obtener el colorante y teñir el ADN, todo esto se relatará en el capítulo 6.

Con la elección del colorante el pico de absorción se corre a los 600 nm. Implicando una nueva investigación sobre la fuente de radiación a utilizar entre tres opciones: Un láser centrado a 600 nm marca Edmund Optics con un costo de \$2000 dólares; LEDs que emiten a 605 nm pero con intensidad lumínica insuficiente para atravesar la muestra y una **lámpara de luz halógena**; que fue la opción elegida por su funcionalidad y su bajo costo.

La lámpara halógena requiere un sistema de colimación para obtener un haz de luz uniforme de rayos paralelos, debido a que la emisión de luz de la

lámpara es radial. Según lo que se conoce de la óptica geométrica las dos configuraciones mas simples y ampliamente usadas son las basadas en dos lentes

- Dos convergentes
- Uno convergente y uno divergente

El sistema de colimación elegido fue el de un **lente convergente y uno divergente**, ya que permite disminuir la distancia recorrida por la luz, minimizando perdidas en la radiación y disminuyendo el tamaño total del equipo. Ya cumplida la exigencia de rayos paralelos se pasa a restringir la longitud de onda emitida por la lámpara a la longitud de onda de absorción de la muestra. Para ello se tenían tres alternativas, la primera un prisma, descartado porque la dispersión es no lineal, la segunda una red de difracción que posee el grupo de investigación GIOPAD. La red de difracción se descartó por que al ser implementada es sub-utilizada, debido a que no se va a hacer un barrido espectral y que no se van a aprovechar el resto de longitudes de onda. La ultima alternativa es un **filtro pasabandas** centrado en 600 nm.

Para las medidas, la muestra debe estar contenida en **cubetas** de material transparente a la longitud de onda incidente. Tres tipos de cubetas cumplen con esta condición: poliestireno, cuarzo y vidrio; debido a que el colorante es elaborado con ácidos se descarta el uso de cubetas de poliestireno, Por otro lado las de cuarzo son de un costo elevado. Las cubetas utilizadas fueron las de **vidrio** por su menor costo.

La etapa electrónica es la encargada de realizar el acople de la etapa óptica con el PC, esta etapa posee cuatro partes básicas: **alimentación, transducción, amplificación y digitalización.**

Los factores determinantes en el tipo de alimentación son la fuente de radiación seleccionada y el transductor de luz. En la búsqueda de dispositivos de detección de luz, se estudiaron el fotomultiplicador y el fotodetector PIN, el

primero es altamente sensible a la intensidad de luz y a la longitud de onda de la radiación incidente, se descartó por que requiere una fuente de alimentación de mínimo 100 voltios DC, con mucha estabilidad debido a que las variaciones de voltaje afectan de manera significativa la ganancia del fotomultiplicador. La opción mas viable es la utilización de un fotodiodo PIN, que no requiere alimentación y el tiempo de respuesta es bajo con respecto a otros fotodetectores (con excepción de el fotomultiplicador) además es económico, asequible, pero con la desventaja que la ganancia es baja, haciéndose necesaria una etapa de amplificación.

La señal que sale de la etapa de amplificación es una señal analógica y para que pueda ser leída por el usuario del equipo en un computador, es necesario que esta señal sea digitalizada, la digitalización de señales se realiza por medio de una DAQ que es una tarjeta de adquisición de datos con una resolución de 10 bits.

El diseño del software se basó en los requerimientos iniciales del proyecto planteado por el grupo de inmunología, como debe ser de uso fácil para el usuario se escogió LAB VIEW 6i como plataforma de desarrollo, ya que usa un lenguaje de alto nivel (lenguaje grafico). El software debe contar con la posibilidad de guardar un registro con la concentración de ADN, fecha y hora de toma de datos.

4.1 DISEÑO FINAL

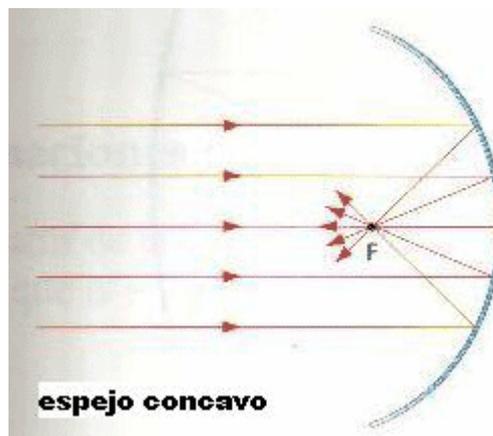
El equipo de cuantificación de ADN en muestras de sangre, construido tiene las partes básicas de un espectrofotómetro. En principio un espectrofotómetro hace un barrido con varias longitudes de onda (o colores), el equipo construido está restringido a un solo color, se le denominó fotocolorímetro (FCL-600), como se habló al inicio del capítulo el instrumento, posee tres etapas básicas:

- 1) Etapa óptica.
- 2) Etapa electrónica.
- 3) Software de tratamiento de datos.

4.1.1 Etapa Óptica

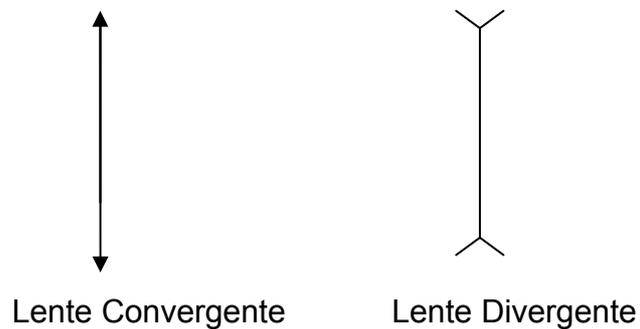
Para la construcción del equipo de medición de ADN en sangre, se seleccionó como fuente de radiación un bulbo de luz halógena de tipo h3, debido a que la luz producida es blanca, por lo cual indica que su espectro de radiación abarca toda la región del visible, conteniendo la longitud de onda de 600 nm, ya que el colorante con el que se trata la muestra de ADN corre el pico a esta longitud de onda. La potencia necesaria para iluminar la muestra, también es satisfecha por el bulbo de luz halógena tipo h3. Esta bombilla seleccionada emite luz en forma radial, para aprovechar una cantidad mayor de radiación con rayos de luz paralelos se hace necesario el situar un espejo cóncavo en la parte de atrás del bulbo como lo muestra la figura 4.1,

Figura 4.1. Rayos de luz reflejados por un espejo cóncavo con una fuente de radiación situada en el foco.



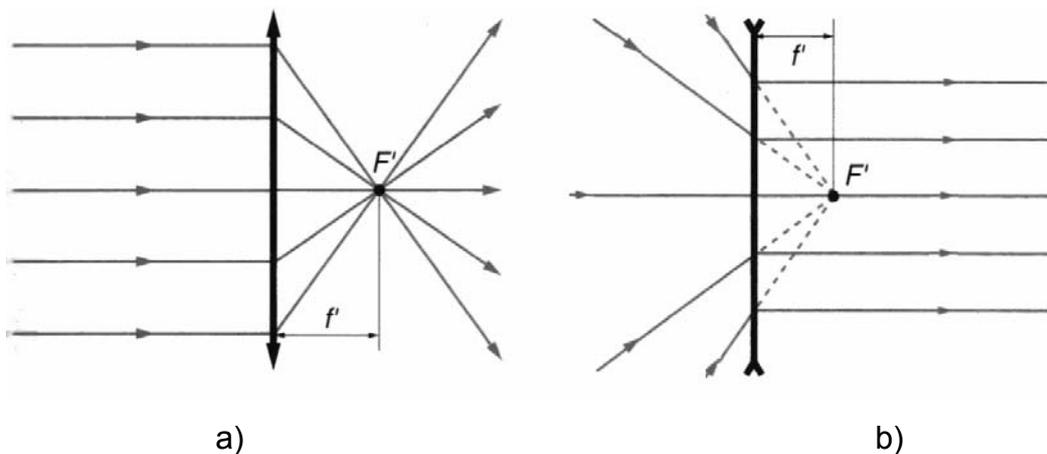
Se utiliza un arreglo de dos lentes uno convergente y uno divergente, para reducir el tamaño del haz aprovechando la misma cantidad de energía en un área menor e iluminando de manera uniforme la muestra con rayos de luz paralelos.

Figura 4.2. Convenciones utilizadas para representar un lente convergente y una divergente.



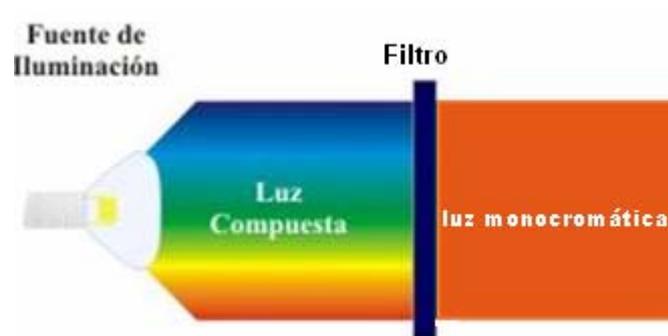
En el arreglo de lentes, el primer lente toma los rayos de luz paralelos y los dirige hacia un punto llamado foco (véase figura 4.3 a), el segundo lente, de diámetro menor, toma los rayos de luz convergentes y los convierte en rayos de luz paralelos, (véase figura 4.3 b), concentrados en un área menor.

Figura 4.3. Comportamiento de los rayos de luz en lentes, a) Rayos de luz al atravesar un lente convergente, b) Rayos de luz al atravesar un lente divergente.



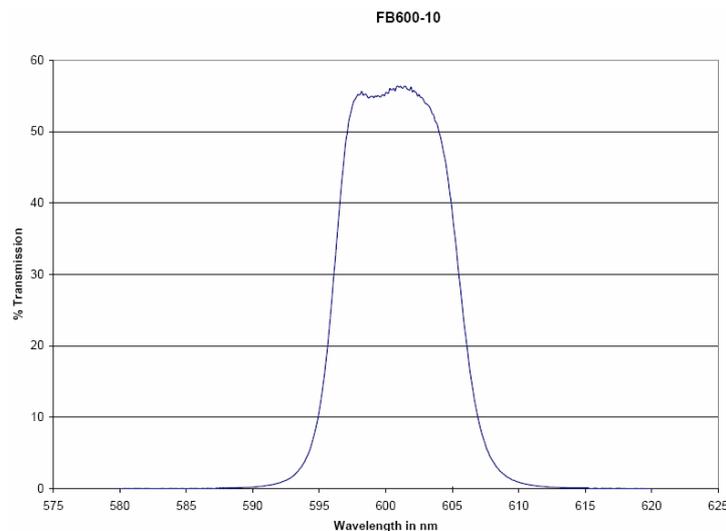
Para la selección de la longitud de onda necesaria para la detección y cuantificación del ADN presente en la sangre, se debe utilizar un filtro pasabandas que deja pasar una región del espectro visible y refleja las otras regiones del espectro, como se ilustra en la siguiente figura.

Figura 4.4. Representación del funcionamiento de un filtro pasabandas



el filtro escogido es el FB600-10 de THORLABS, con un rango de transmisión espectral centrado en 600nm como lo muestra la figura 4.5, de diámetro de 21mm.

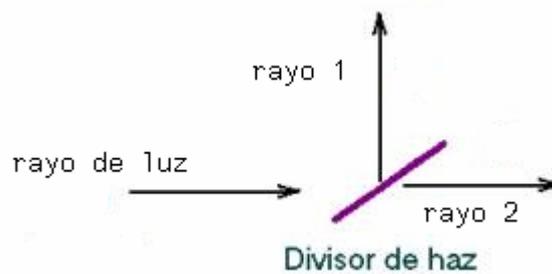
Figura 4.5. Rango de transmisión espectral del filtro pasabandas FB600-10.



Tomado de web:<<http://www.thorlabs.com>>

Luego de obtener la longitud de onda deseada, el rayo de luz pasa a un divisor de haz. El instrumento implementado cuenta con un espejo semiplataado que es semitransparente a la radiación visible, porque el recubrimiento metálico es muy delgado para ser opaco: se puede ver a través de él y al mismo tiempo puede observarse por reflexión. Los divisores de haz se pueden hacer de películas delgadas sobre vidrio. Este dispositivo permite obtener dos rayos, el transmitido y el reflejado (ver figura 4.6).

Figura 4.6. Rayo de luz pasando por un divisor de haz



Para la recolección de la luz se utiliza un lente convergente, el cual se encarga de dirigirla a un fotodetector.

Figura 4.7. Representación del funcionamiento de la etapa óptica.

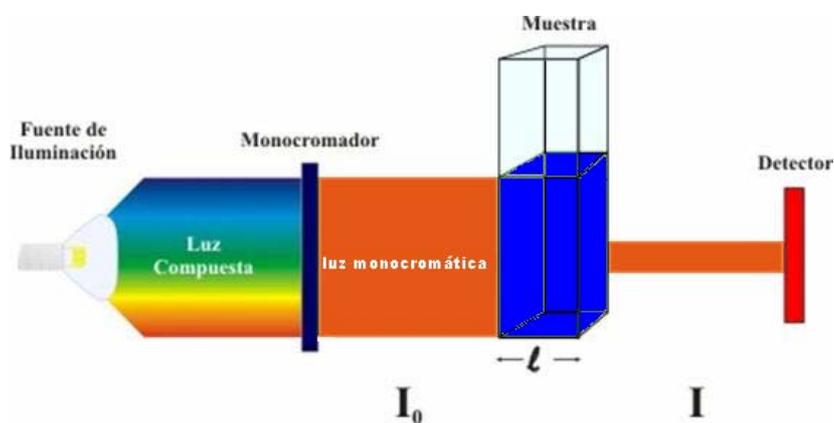
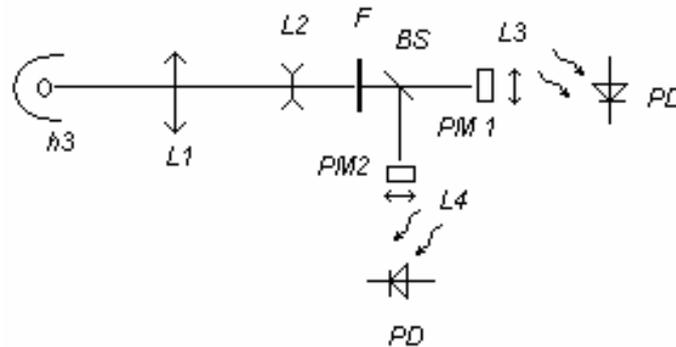


Figura 4.8. Esquema general del diseño de la etapa óptica.



4.1.2 Etapa Electrónica

La etapa electrónica se divide en tres partes: **alimentación**; **detección-amplificación** y **digitalización**.

4.1.2.1 Alimentación

La alimentación de la etapa electrónica debe ser estable para que no fluctúe la fuente de radiación, produciendo así un haz de luz de intensidad uniforme, además debe alimentar los circuitos de transducción, y comunicación con el PC.

La fuente fue seleccionada de acuerdo con los requerimientos de potencia de los dispositivos electrónicos y de la fuente de radiación y considerando la estabilidad requerida por estos dispositivos.

Como el propósito es construir un equipo para la utilización en hospital de recursos limitados, la fuente de alimentación debe ser de fácil reparación o

reemplazo para que la medición de muestras clínicas no se atrase por falta un técnico especializado o de componentes que no estén en el mercado.

4.1.2.2 Detección Amplificación

La detección de la señal se realiza mediante un transductor (fotodetector) el cual convierte la señal de luz a señal eléctrica. La etapa de amplificación es donde la señal electrónica generada por el fotodetector debe ser aumentada. Y para este fin se emplea el factor de amplificación que es llamado “la ganancia del amplificador”, es la relación entre la señal de salida y la señal de entrada. La señal de un fotodiodo PIN es de baja intensidad, por lo tanto es necesario implementar una etapa de amplificación, dependiendo la configuración del circuito del transductor se debe diseñar la etapa de amplificación.

Figura 4.9. Fotografía del fotodetector FDS-100.



Tomado de web:<<http://www.thorlabs.com>>

Como se seleccionó el fotodiodo FDS-100 de THORLABS, el fabricante sugiere un circuito con un filtro RC, circuito que es sensible a la longitud de onda y a la intensidad de la luz incidente para un buen funcionamiento del fotodetector.

La amplificación se realiza mediante un amplificador operacional INA 111 de Texas Instruments, en configuración no inversora.

El amplificador operacional se seleccionó debido a que es un dispositivo para instrumentación industrial, de alta precisión, alta sensibilidad y alta estabilidad.

4.1.2.3 Filtrado

El factor limitante final en la precisión y sensibilidad de cualquier método analítico instrumental, es la presencia de señales no deseadas que se superponen a la señal generada por la sustancia que se desea analizar, estas señales son llamadas RUIDO, siendo derivada la terminología de la radioingeniería. El filtrado consiste en la eliminación o atenuación del ruido mediante arreglos electrónicos o digitales. El fabricante del fotodetector provee un esquema de conexión sugerida con un filtro RC.

El Ruido no es solo emitido por los circuitos, sino que también influyen los reflejos de fuentes de luz ajenas al equipo, para eliminar este tipo de radiación es necesario que el instrumento esté totalmente cubierto por un armazón plástico enterizo que no permita el paso de luz externa hacia el sistema óptico. Otra fuente de ruido es la misma fuente de luz del equipo ya que refleja la luz en las paredes y soportes de los implementos ópticos para evitar estos reflejos fue necesario pintar de negro mate las superficies y lijarlas para que no queden lisas así la luz es absorbida y dispersada para que no sea reflejada hacia donde se sitúan los dispositivos ópticos, muestra y fotodetectores.

Figura 4.10. Reflejos causados por la superficie liza de las bases



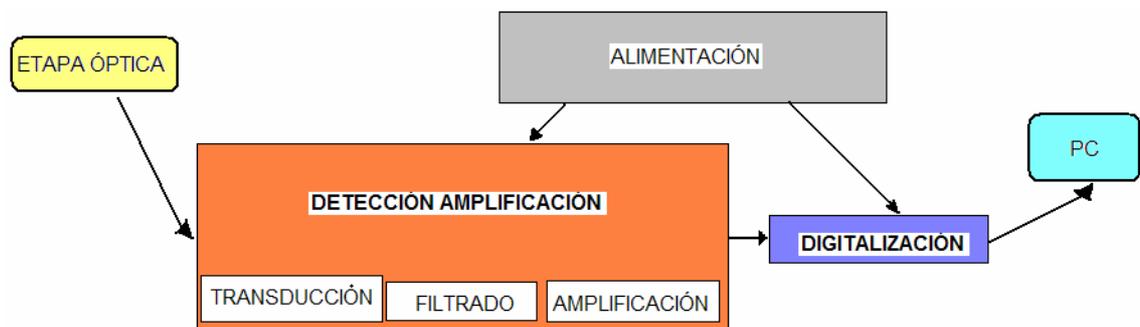
Figura 4.11. Pulido de las superficies para disminución de reflejos causados por la superficie liza de las bases



4.1.2.4 Digitalización

El sistema de digitalización tiene la función de convertir la señal de modo continuo a una señal discreta. La señal emitida por la etapa de amplificación oscila de 0 a 5V DC, la etapa de digitalización esta diseñada para utilizar un PIC de la familia 18FXXX, debido a que tiene 4 conversores Analógico – Digital, la resolución es de 10 bits y la programación es en lenguaje C y se traduce a Assembler para ser embebido en el PIC. Y la comunicación entre el PC y el sistema de digitalización se hace mediante un MAX 232 que utiliza un protocolo RS 232 (puerto serial PC).

Figura 4.12. Esquema de bloques de la etapa electrónica.



CAPITULO 5: CONSTRUCCIÓN Y CALIBRACIÓN

Para la construcción del fotocolorímetro según lo especificado en el capítulo anterior y resumido en la figura 4.6 se procedió de forma similar, es decir, la construcción se dividió en etapas, iniciando con la **etapa óptica**, siguiendo con la **etapa electrónica** y posteriormente la de **software**. Algunos de los elementos utilizados en el equipo requieren de una etapa de **prueba de estabilidad**, que consiste en la observación de su comportamiento en intervalos de tiempo establecidos. Después de realizar la construcción se debe realizar una etapa de **calibración**. A continuación se detalla cada una de estas etapas.

5.1 CONSTRUCCIÓN DE LA ETAPA ÓPTICA

Los componentes de esta etapa son los siguientes:

- ✓ Un Espejo Cóncavo
- ✓ Una Bombilla halógena tipo H3 Ordi Light de 100 W y 12 VDC
- ✓ Un lente Biconvexo de 32 mm de diámetro y distancia focal de 137 mm
- ✓ Un filtro (FB 600-10 THORLABS)
- ✓ Una lente divergente (LD181 THORLABS)
- ✓ Un Divisor de haz (EBS05 THORLABS)
- ✓ Dos porta muestras (cubetas).
- ✓ Dos cubetas (14-385-910B Fisher Scientific)
- ✓ Dos Lentes plano convexos (LA 1074 THORLABS).
- ✓ Dos Fotodetectores (FDS 100 THORLABS)

Cualquier tipo de instrumentación óptica que requiera de lentes debe garantizar la alineación de los ejes ópticos durante la vida útil del equipo. Teniendo esto en cuenta, lo primero que se hizo fue seleccionar una superficie plana para la ubicación de los elementos ópticos, siendo ideal la utilización de láminas acrílicas resistente a la temperatura de exposición. Para minimizar vibraciones que pudieran afectar el desempeño óptico durante la construcción, se fijó al piso una base que se desempeñó como la mesa soporte del equipo. Se garantizó la estabilidad de esta mesa haciendo observaciones con un nivel durante una semana. (Ver figura 5.1).

Teniendo en cuenta que el equipo constaría de lentes de diferentes dimensiones, se hizo necesario determinar a priori las dimensiones del soporte que requeriría cada elemento con el fin de garantizar las alturas de alineación del eje óptico. Se diseñaron planos para cada uno de los soportes que fueron hechos por el técnico Juan Carlos Garzón Obando.

Figura 5.1. Determinación del eje óptico



Para obtener las medidas de los soportes se tuvo en cuenta que el lente debe quedar perpendicular a la base y al eje óptico y que el eje óptico pase por el centro de cada lente. Se procedió de la siguiente manera:

- El elemento de mayor dimensión es el espejo cóncavo, (6 cm de diámetro). Aun si la base de acrílico es resistente a la temperatura de exposición, para altos tiempos de exposición puede sufrir deformaciones, por lo que se anexó al equipo un disipador de calor. Ahora, sumando el radio del espejo (3 cm) y la altura del disipador de calor (3 cm), se obtuvo la altura a la que debía estar el eje óptico con respecto a la base, esto es, 6 cm. Con esta dimensión se marca en una pantalla el eje óptico y esta marca será la referencia para la alineación de los diferentes lentes que componen el equipo.
- El soporte para el primer lente, L1, es tal que ubica el centro de este lente a una altura de 6 cm. respecto a la base. Este lente fue iluminado con un láser rojo para confirmar su alineación con el eje óptico. El proceso se repite para el segundo lente, L2, teniendo en cuenta que su diámetro es de 9 mm.
- Alineados los lentes L1 y L2, el paso siguiente es la ubicación de la fuente de luz. Nuevamente, la fuente de luz debe estar alineada con los lentes, lo que se consigue ubicando el bulbo halógeno en el punto de salida de la luz láser que sirvió de fuente de alineación para los lentes. Para aprovechar al máximo la radiación emitida por la lámpara se le adaptó un espejo cóncavo y, debido a que disipa mucho calor, se le acondicionó un disipador de calor de aluminio y un extractor de calor (ventilador 5 VDC) lo que disminuye la temperatura a la que está sometido la base y el lente L1. Como fue mencionado en el capítulo 4, la función de este lente es convertir los rayos de luz divergentes (de la fuente) en rayos de luz convergentes.
- El haz de luz obtenido por L1 pasa por un filtro pasa-bandas entre 590nm y 610nm y ubicado a 82.2mm de L1. Este filtro permite obtener

la longitud de onda requerida para la absorción de luz por parte de la muestra de ADN coloreada.

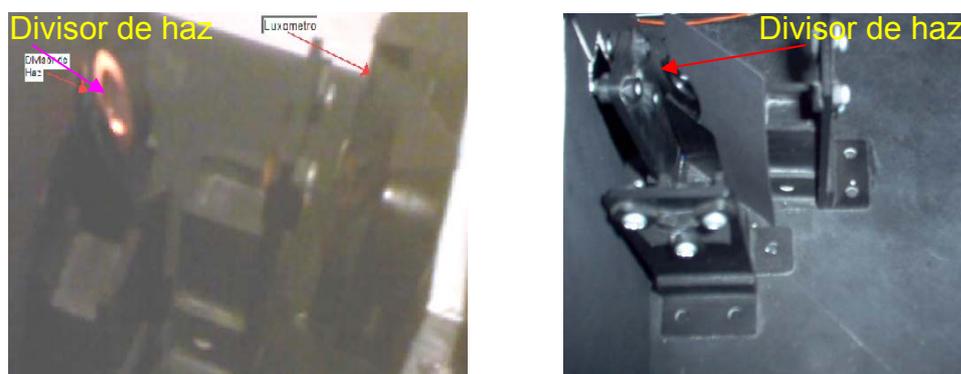
Figura 5.2. Lentes alineados y filtro



- Después del filtro se tienen rayos de luz convergentes centrados en 600nm. Como se mencionó en el capítulo 4, la función de este lente es convertir los rayos convergentes en paralelos. Teniendo en cuenta que su punto focal debe coincidir con el punto focal de L1 (de diámetro mayor), L2 se situó a 102.3mm de L1. Además, debido a su menor diámetro, L2 reduce el diámetro del haz de luz, concentrando una mayor cantidad de energía radiante en un área menor.
- Después de L2 el rayo de luz llega a un divisor de haz que, ubicado a un ángulo de 45° con respecto al eje óptico, fracciona el haz de luz en dos haces iguales de 23.4 mW de intensidad. Este divisor está montado sobre un soporte que obliga a una distancia mínima L2-divisor de 14.5mm. Uno de los haces emergentes del divisor se dirige a una muestra de referencia. Es recomendable ubicar la muestra (porta muestra 2, PM2) a la menor distancia posible para tener una pérdida de

potencia mínima, respecto al divisor para asegurar que los rayos del haz sean paralelos; nuevamente, por razones de dimensión del soporte del haz, para el fotocolorímetro construido esta distancia es de 24.2mm. El otro haz es dirigido hacia la muestra de ADN. Este haz debe llegar a la muestra con la misma intensidad con que llega el otro haz a la muestra de referencia. Para determinar la distancia a la que se debía ubicar la muestra (porta muestra 1, PM1) y cumplir con este requerimiento se hizo uso de un luxómetro, como muestra la figura 5.3. La distancia determinada fue de 21,4mm entre la muestra y el divisor de haz.

Figura 5.3. A la izquierda fotografía del divisor de haz en funcionamiento, a la derecha el divisor de haz.



- Con el luxómetro se determinó que las cubetas que contienen las muestras absorben un 10% de la luz incidente. La cantidad de luz que atraviesa las muestras son recogidas con lentes convergentes plano convexos (L3 y L4) que se ubicaron a 1mm de las cubetas (mínima distancia posible) y se concentra en respectivos fotodetectores (PD1 y PD2) con una respuesta espectral entre 350-1100 nm, área activa de 13.0 mm² situados respecto a L3 y L4 a una distancia igual a su distancia focal, es decir, 12 mm.

En la figura 5.4 se detalla la configuración óptica del fotocolorímetro FCL-600 y en la figura 5.5 se presenta una fotografía de esta configuración óptica. En la figura 5.4 se tiene:

EC: Espejo Cóncavo

H3: Bombilla halógena

L1: Lente Biconvexo

F: Filtro

L2: Lente divergente

BS: Divisor de haz.

PM1 y PM2: Porta muestras

L3 y L4: Lentes plano convexas.

PD1 y PD2: Fotodetectores.

Figura 5.4. Diagrama que muestra la configuración óptica

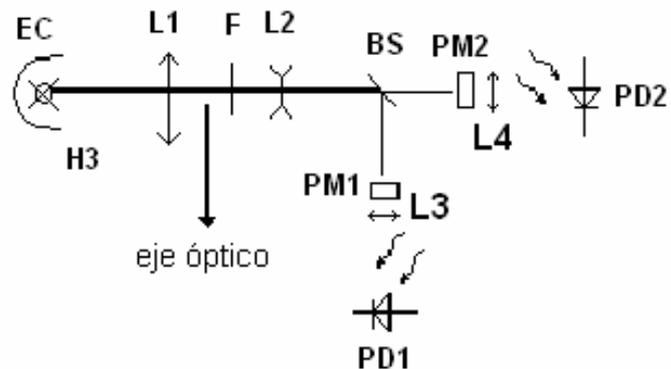


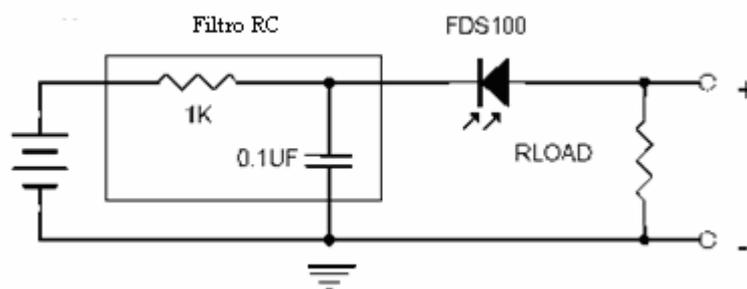
Figura 5.5. Fotografía de la implementación de la etapa óptica



5.2 CONSTRUCCIÓN DE LA ETAPA ELECTRÓNICA

La alimentación eléctrica del sistema es provista por una fuente comercial de 210 watts de potencia (EDI eco 115/230 VAC, con salidas de +5, +12 y -12 VDC) que es altamente estable y cumple con los requerimientos de amperaje (8 amperios) de la bombilla halógena. El acople entre la etapa óptica y la etapa electrónica se realiza mediante los fotodetectores (FDS 100 THORLABS) que convierten la señal de luz en señal eléctrica. Los fotodetectores están configurados en forma fotorresistiva de acuerdo con las especificaciones sugeridas por el fabricante, es decir, en un circuito como el descrito en la figura 5.6 que es sensible a la potencia de luz incidente en los fotodetectores (ecuación 5.1). Ya que para condiciones mínimas de iluminación del equipo el fotodetector entrega un voltaje de 200 mV, la resistencia de carga llamada R_{LOAD} , fue ajustada a 934 K Ω de acuerdo con su ecuación característica para obtener una salida de 1.5, voltaje adecuado para ser amplificado con el Amplificador Operacional INA 111, ya que su offset es alto con respecto al voltaje entregado por el fotodetector.

Figura 5.6. Circuito sugerido por el fabricante para el fotodetector FDS 100



$$V_o = P(\lambda) * R_e(\lambda) * R_{LOAD} \quad (5.1)$$

El circuito fue elaborado, pero en el momento de ser amplificada se inducía ruido y no lograba estabilizarse para obtener una medida confiable, se le hizo un acople de impedancias presentando una disminución leve del ruido.

Por lo anterior se decidió la implementación de un circuito en el que el fotodetector se configura de forma fotovoltaica y se hace el acople de impedancias con un amplificador operacional TL082 el cual proporciona toda la potencia requerida por la etapa de amplificación, presentando una señal constante y confiable para la medición de diferencias de voltaje.

A pesar de tener un voltaje constante proveniente del fotodetector, este voltaje es muy bajo para efectos de medida, así que requiere de un proceso de amplificación. Para este fin se emplearon amplificadores operacionales (INA 111 Texas Instruments) ajustados con una ganancia de 2000 para acondicionar la señal antes de su digitalización.

Finalmente se tiene la etapa de adquisición de la señal para llevarla al PC. De esta tarea se encarga la tarjeta de adquisición de datos (DAQ) que emplea un dispositivo programable (PIC 18f452 Microchip®) que posee un conversor analógico a digital de 10 bits de resolución, que toma la señal eléctrica amplificada y la digitaliza a través de un programa embebido (ver anexo C) en el cual también se realiza un proceso de filtrado. Posteriormente se envía la señal digital por el puerto serial del PIC a un circuito integrado (MAX 232) para establecer la comunicación con el PC.

Figura 5.7. Esquema Electrónico del FCL-600 (etapa de digitalización)

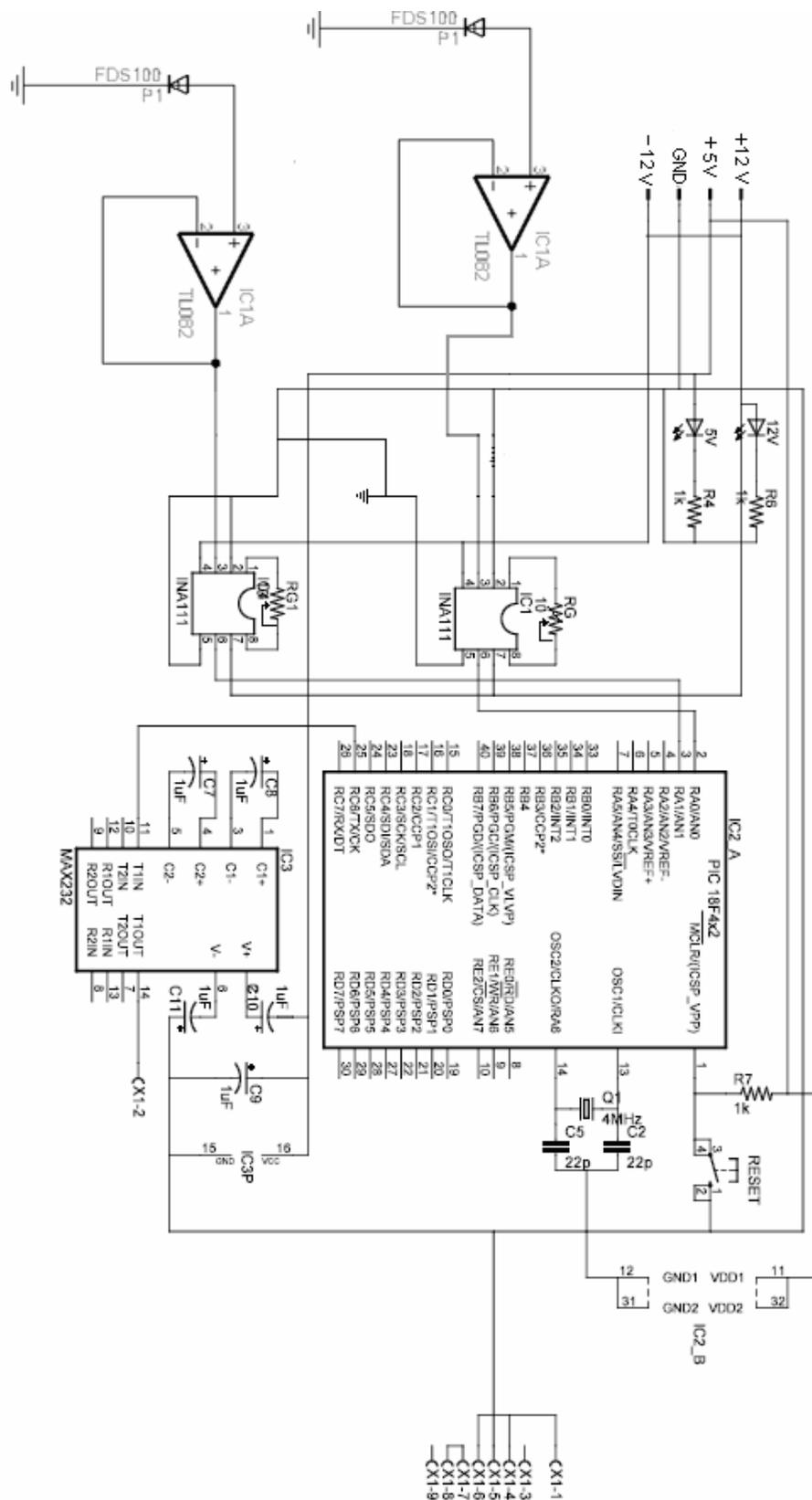
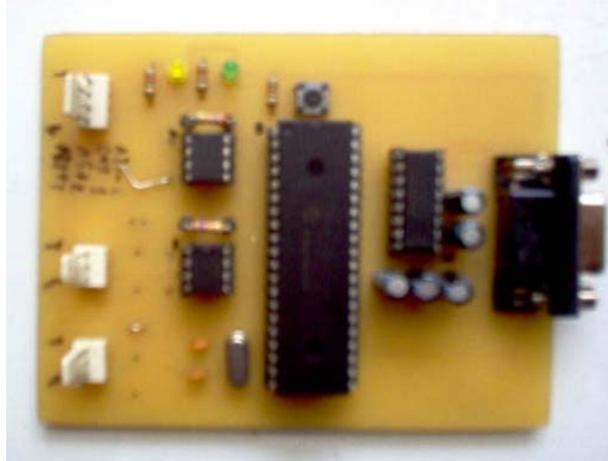


Figura 5.8. Fotografía de la tarjeta de adquisición de datos.



5.3 SOFTWARE

Después de tener el hardware implementado y comprobar la correcta adquisición de datos a través del puerto serial, se procede con la implementación del software sobre la plataforma de desarrollo Lab View 6i, donde se establece una rutina de adquisición por medio de **Sub VIs**.

Cada Sub VI es un proceso o rutina con un fin específico, en la implementación del software los Sub VIs de mayor relevancia son: comunicación serial, apertura-escritura de archivos y los de procesos matemáticos. La rutina de concatenación de datos adquiridos por el puerto serial es realizada con un manejo de arreglos binarios (Sub VI llamado "concatena serial") y convertida a decimal para ser procesado. Este procesamiento consiste en: convertir los datos digitales provenientes de los sensores a voltajes, resta de las señales para la obtención de la diferencia de voltajes, esta diferencia es multiplicada por la pendiente obtenida en la recta de calibración que tiene implícito el coeficiente de absortividad molar, voltaje y el camino óptico, para obtener el valor de la concentración de ADN para ser desplegada en el interfaz de usuario del FCL-600.

Después de digitalizadas las señales eléctricas se almacenan en la memoria del PC, guardando un archivo con la fecha, y medida de la concentración de

ADN, archivo de extensión *.xls (por defecto, ya que el usuario puede escoger la extensión de acuerdo con su necesidad).

La interfaz diseñada e implementada en el FCL- 600 cuenta con un botón de encendido, 6 cuadros de texto que dan la información de la ruta donde se guardada el archivo, hora de toma de la muestra, fecha, voltajes en cada sensor y la concentración de ADN, los cuadros donde aparece la señal q viene los fotodetectores, es utilizada para observar la calibración del equipo y estabilidad de las señales.

En la figura 5.9 se muestra el diagrama de bloques del software implementado, donde aparece todos los diferentes sub VIs que se necesitan para la adquisición de la señal digitalizada y el procesamiento de ella.

Figura 5.9. Programa en Lab View 6i para la adquisición y procesamiento de datos

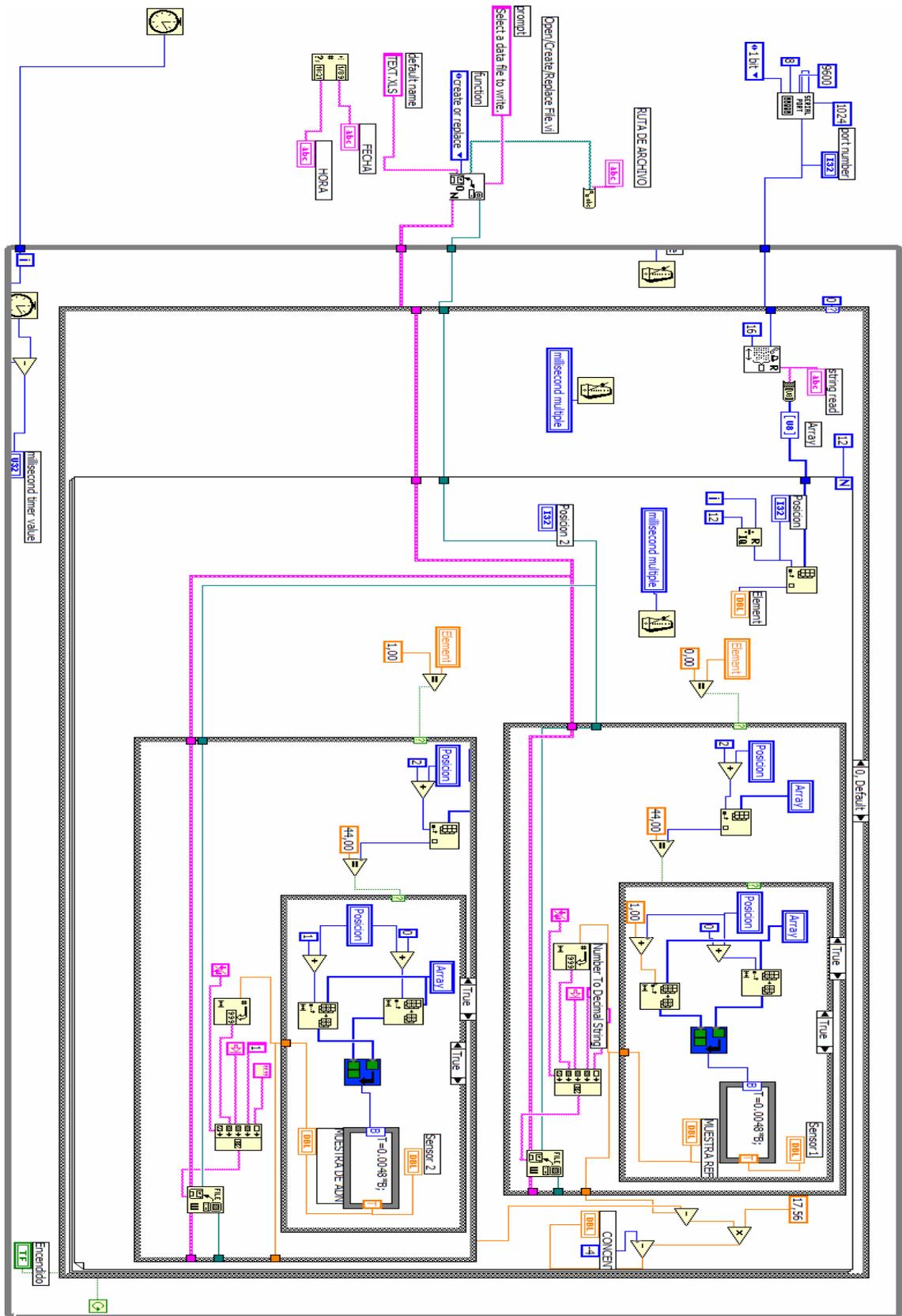


Figura 5.10. Fotografía del FCL-600 en funcionamiento

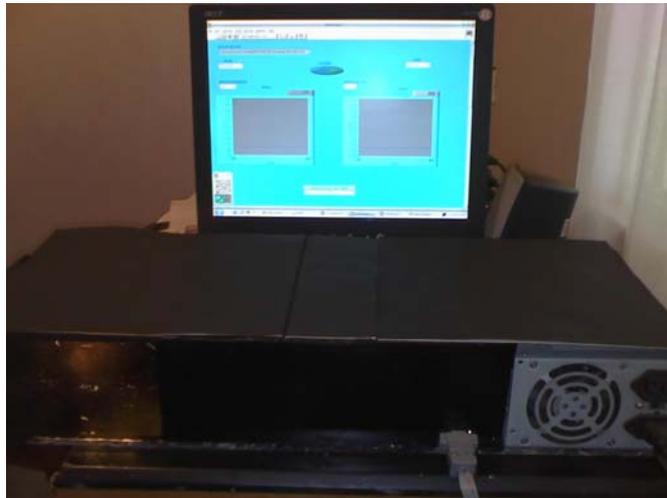


Figura 5.11. Fotografía interfaz en Lab View 6i. En la izquierda se observa la señal proveniente del fotodetector (amplificada) proveniente de la muestra de referencia. A la derecha se observa la correspondiente respuesta de la muestra en estudio. La diferencia entre las dos medidas de voltaje corresponde a la concentración de ADN de la muestra en estudio.

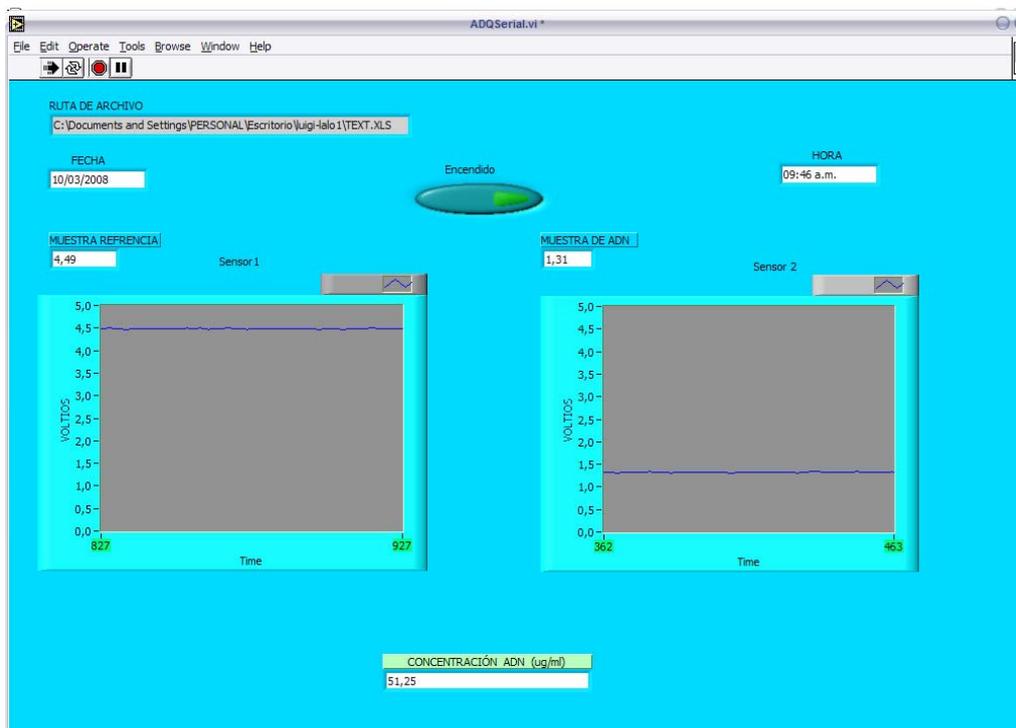


Figura 5.12. Fotografía FCL-600, especificando sus componentes

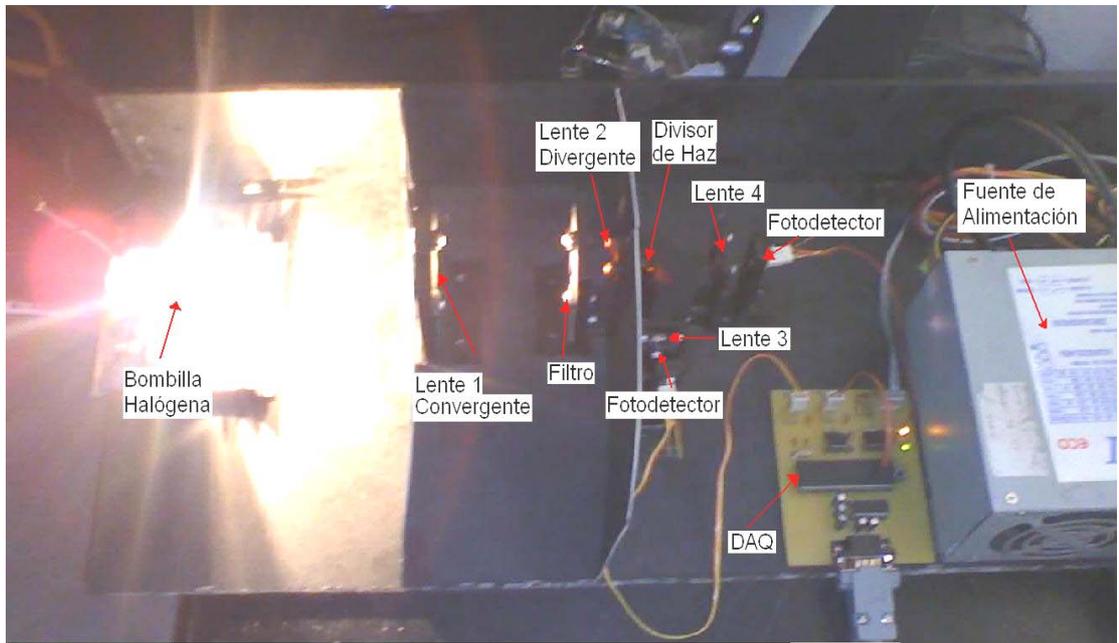
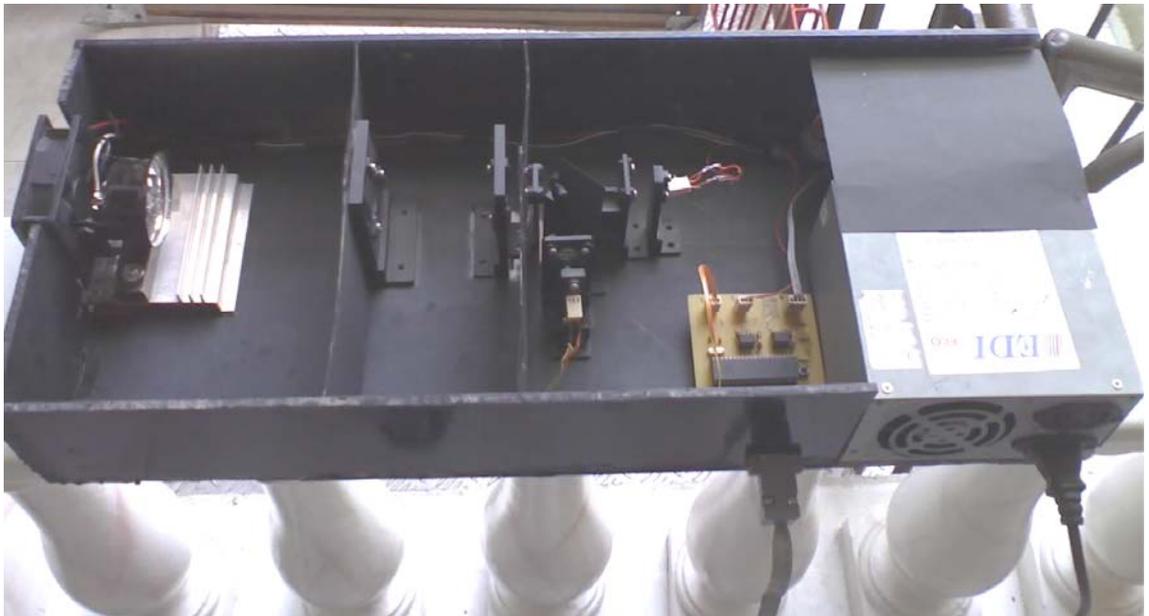


Figura 5.13. Fotografía del interior FCL-600.



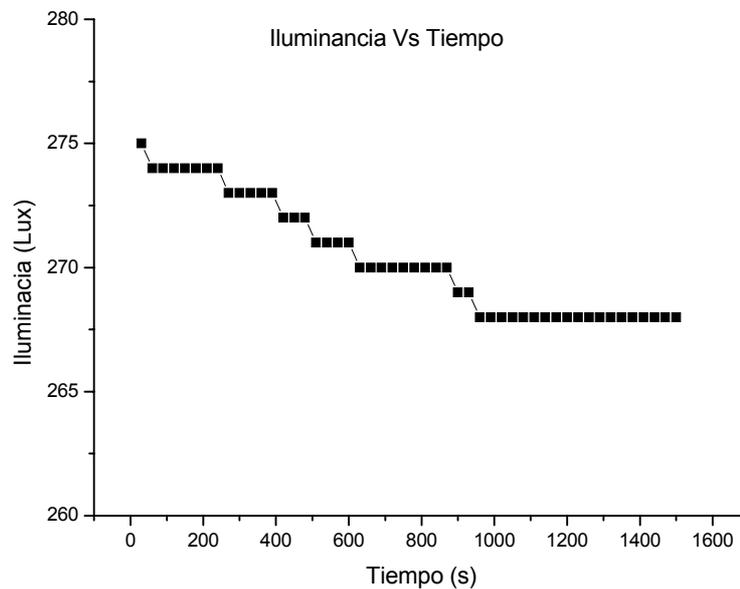
5.4 PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES

Los componentes que requirieron de prueba de estabilidad fueron la fuente de alimentación, la fuente de luz y el divisor de haz.

➤ Fuente de luz

Para la verificación del requerimiento de estabilidad de la fuente de luz se realizaron medidas de iluminancia vs tiempo. El instrumento de medida utilizado fue un luxómetro y el rango de tiempo elegido fue de 0 a 1600 segundos con intervalos de 30 segundos. El resultado se muestra en la gráfica 5.1.

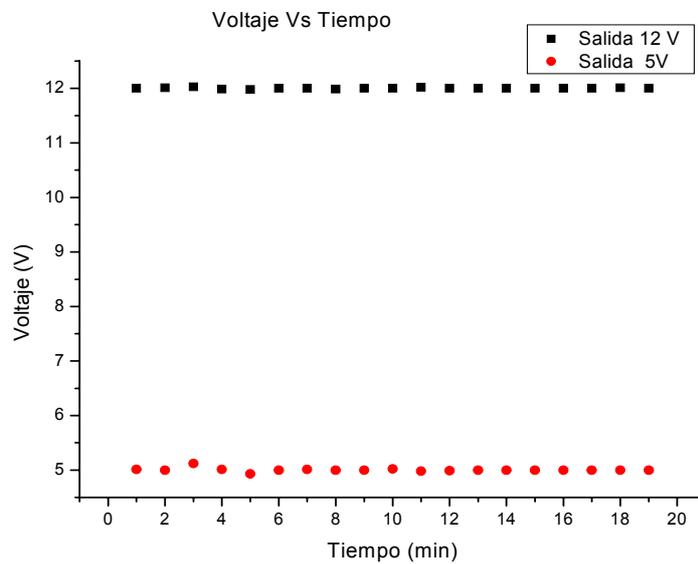
Gráfica 5.1. Estabilidad de la lámpara halógena, se observa la estabilidad de la iluminancia es alcanzada después de los 1000s



➤ Fuente de voltaje

Para asegurar que no hay fluctuaciones en las medidas del equipo por parte de la alimentación del equipo, se observó la estabilidad de las salidas de 5 V y 12 V de la fuente EDI eco durante 20 minutos, los resultados obtenidos se observan en la gráfica 5.2

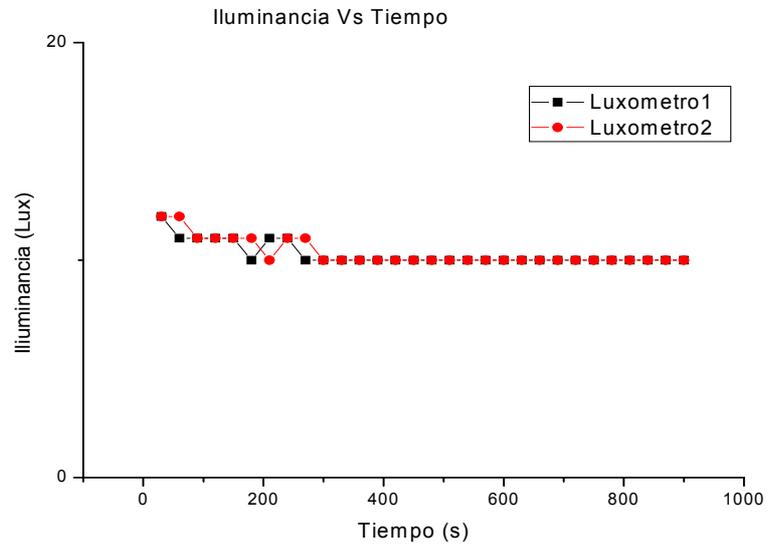
Gráfica 5.2. Estabilidad de la fuente de voltaje EDI eco



➤ Divisor de haz

El divisor de haz debe garantizar que los haces de luz que salen de él deben tener intensidades iguales, en la grafica 5.3 se observa que este requisito es cumplido por el divisor de haz, las señales luminosas son medidas por 2 luxómetros situados en la posición de los fotodetectores respectivos, el muestreo de las señales se realizó durante 1000 s con intervalos de 30 s

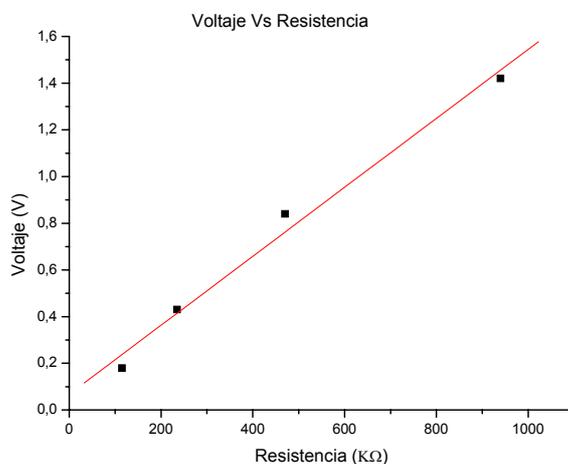
Gráfica 5.3. Medición de la iluminancia de luz después del divisor de haz



- Cálculo de la potencia incidente sobre el foto detector

Para calcular la potencia luminosa que llega a los fotodetectores se implementa el circuito descrito en la figura 5.6 debido a que la potencia puede ser calculada colocando un trimer (potenciómetro de precisión) como RLOAD, y variarlo para medir el voltaje de salida. Con los datos de variación de resistencia y de voltaje medidos se elabora una curva (gráfica 5.4), donde su pendiente es equivalente a la potencia incidente por la responsividad espectral del fotodetector a 600 nm (ver ecuación 5.1)

Gráfica 5.4. Voltajes medidos vs Resistencia variadas en el trimer.



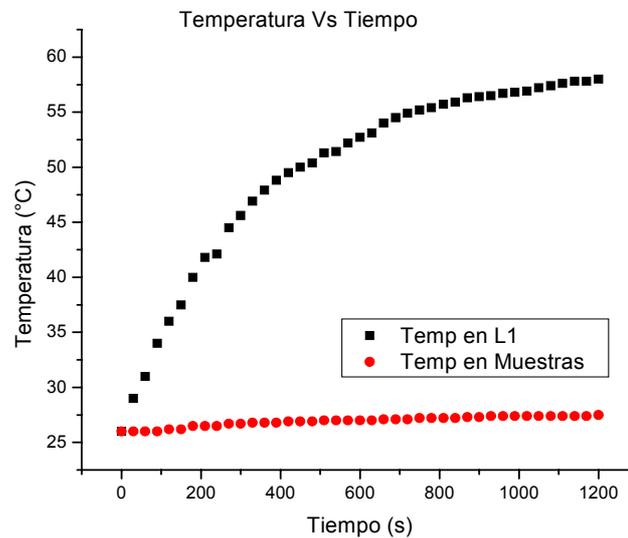
La pendiente de la gráfica 5.4 es de $1,5 \cdot 10^{-6} / 0.38$ (Respuesta espectral 600 nm) nos da como resultado $4 \cdot 10^{-6} \text{ W}$ que es la potencia luminosa incidente sobre el fotodetector.

- Temperatura a la que está sometido el primer lente y las muestras

Debido a los rangos de temperatura de operación de los lentes (-10°C a 80°C) y la termosensibilidad de las muestras de ADN, se hace necesario medir la temperatura máxima a la que están expuestos durante el proceso de medición de concentración de ADN. Se obtuvo que la muestra es sometida a una temperatura 2 grados mayor a la de la temperatura ambiente que es la temperatura del equipo en funcionamiento en el compartimiento de las muestras (ver gráfica 5.5).

La temperatura a la que está expuesto el lente biconvexo (L1) llega a 60°C (ver gráfica 5.5) que se encuentra en el rango de operación permitido por el material de los lentes.

Gráfica 5.5. Gráfica de temperatura vs. Tiempo en el interior del FCL-600.



5.5 CALIBRACIÓN DEL FCL-600

La correcta calibración de los equipos proporciona la seguridad de que los productos o servicios que se ofrecen reúnen las especificaciones requeridas.

Calibración es el procedimiento de comparación entre lo que indica un instrumento y lo que "debiera indicar" de acuerdo con un **patrón de referencia** con valor conocido. Es el procedimiento metrológico que permite determinar con suficiente precisión cuál es el valor de los errores de los instrumentos de medición, siendo de vital importancia que dichos errores sean lo suficientemente pequeños y que hayan sido determinados con la mayor precisión posible.

Para el FCL-600 la calibración involucra los siguientes procesos: una calibración de las **partes electrónica** (fotodetectores) y **óptica** (alineación de lentes) y la elaboración de una **curva de calibración** que determine el rango de medida confiable del instrumento.

5.5.1 Calibración de las partes electrónica y óptica

El instrumento utilizado para medir la iluminancia que llega a los fotodetectores fue un luxómetro LX-102 LUTRON. La resta entre estas medidas de iluminancia medida por los fotodetectores se hizo con la tarjeta de adquisición de datos, DAQ. Si la diferencia es diferente de cero se realiza un proceso de corrimiento de cero (calibrado), implementado en el software de la DAQ.

Para la alineación de los lentes se colocó un láser sobre la base del equipo para utilizarlo como referencia del eje óptico y se marcó el spot producido por el láser sobre una pantalla fija. Los lentes fueron ubicados de tal manera que brindaran un spot uniforme y centrado con el eje óptico.

5.5.2 Elaboración de curva de patrón para el FCL-600

Para construir una curva de calibración que determine el rango de confiabilidad del FCL-600, se tomó como instrumento de referencia el espectrofotómetro GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator de BIOCHROM LTD, del Grupo de Investigación de Genética Humana Aplicada (GIGHA) de la Facultad de Salud de la Universidad del Cauca.

Este espectrofotómetro fue diseñado específicamente para medidas de ADN, ARN, Oligonucleótidos y cultivo de bacterias y posee un ancho de banda de 5 nm que garantiza una mayor precisión en la medida, dando como límite 35 ng de ADN (micro-cubetas)²¹. El GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator hace la medida directamente con luz ultravioleta, es decir, a 260 nm, que es la longitud de onda de absorción del ADN, y reporta absorbancia y concentración para esta longitud de onda, además, este instrumento tiene la posibilidad de medir absorbancia en otras longitudes de onda, entre ellas, 600 nm, mas no concentración.

²¹ BIOCHROM Cambridge Science Park Milton Road CAMBRIDGE CB4 0FJ UK
<http://www.biochrom.co.uk/UV_Vis_Spectrophotometry/GeneQuant>

Para obtener la curva de calibración se requiere conocer la medida de concentración de ADN presente en las muestras en estudio. Como ya se dijo, es necesario colorar las muestras para que absorban a la longitud de onda de la fuente de luz del FCL-600, es decir, 600 nm. Si el proceso de coloración se da para el ciento por ciento de la muestra, se espera que la coloración afecte la absorbancia de la muestra más no la concentración de ADN en ella. Como primer paso se requiere verificar esta hipótesis.

El FCL-600 da como medida directa la diferencia de voltaje entre una muestra en estudio y una muestra de referencia. La muestra en estudio, después de su tratamiento, consiste en una mezcla de agua, colorante y ADN. La muestra de referencia consiste en una mezcla de agua y colorante. Ni el agua ni el ADN absorben radiación de 600 nm, por lo tanto cualquier medida de absorción proviene del colorante. Si la diferencia de voltaje medida por el FCL-600 entre el sensor de la muestra en estudio y el de la muestra de referencia, es cero, representará una absorción del colorante, no del ADN. Por el contrario, una diferencia de voltaje diferente de cero corresponderá al efecto de absorbancia del ADN. Por lo anterior, la curva de calibración que se construirá se basará en la relación entre la diferencia de voltaje y la concentración de ADN (tomada de medidas previas con el GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator) para 4 muestras con diferentes concentraciones. La obtención de las muestras partió de una muestra inicial que registró, con el GeneQuant, una concentración de 50.2 $\mu\text{g/ml}$, a partir de esa muestra se hicieron 5 diluciones (50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125% en agua, ver tabla 6.1).

Figura 5.14. A la izquierda fotografía del espectrofotómetro GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, a la derecha medición de concentración de ADN con espectrofotómetro.



La toma de datos así como los resultados obtenidos tanto para la calibración como para la prueba de funcionamiento del FCL-600 se exponen en el capítulo siguiente.

CAPITULO 6: RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este capítulo se reportan los tratamientos de muestra, la toma de datos, elaboración de curvas y análisis de resultados para el correcto funcionamiento del fotocolorímetro FCL-600 construido para la medición y cuantificación de niveles de ADN presentes en sangre.

6.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para que la muestra de ADN absorba en la longitud de onda de la fuente de radiación del FCL-600 es necesario hacerle un proceso de coloración. Como primer paso se requiere de un proceso de extracción de muestras de ADN en sangre y posteriormente su coloración.

6.1.1 Extracción de ADN en sangre

La extracción de las muestras de ADN fue realizada por el Grupo de Genética Humana Aplicada (GIGHA) de la Universidad del Cauca. Para este propósito se utilizaron dos protocolos de extracción que tienen en común el uso de un reactivo denominado CHELEX que se encarga de atrapar los componentes diferentes al ADN.

El protocolo 1 consiste en someter la muestra a lavados sucesivos con agua destilada y posterior centrifugado hasta obtener un botón blanco de ADN. Posteriormente se agrega el CHELEX y la solución se somete a baño maría a 56° C durante 30 min, después se lleva a agua a 100° C durante 8 min . Con el fin de obtener el ADN purificado. Este protocolo no es el adecuado porque en cada lavado se pierde una cantidad de ADN apreciable.

El protocolo 2 consiste en un único lavado con histopaque y PBS (Phosphate Buffer Saline). El histopaque es una solución que permite un rápido recubrimiento de células mononucleares en pequeños volúmenes de sangre, el PBS es un amortiguador. El lavado con estos dos productos da como resultado la extracción del ADN de los linfocitos con mínimas pérdidas de ADN.

Para el proceso de preparación de muestras en este trabajo se eligió el protocolo 2 por la siguiente razón: cuando se sigue el protocolo 1, además de tener pérdidas de ADN, el ADN que se extrae proviene de todos los componentes de la sangre. Siguiendo el protocolo 2 se extrae ADN de los linfocitos. Con este trabajo se pretende que la medida de cuantificación de ADN en sangre pueda ser utilizada en el estudio de la relación que existe entre la alteración de la concentración de ADN y enfermedades auto-inmunes, es decir, aquellas relacionadas con la proporción de linfocitos en la sangre. Esto hace que el protocolo 2 sea el indicado. Los pasos seguidos en este protocolo se detallan a continuación.

➤ Extracción de la sangre de un voluntario

En principio cualquier muestra de sangre es útil para efectos de calibración, no obstante se prefiere un donador sano (sin reporte de enfermedades autoinmunes) de modo que la concentración de ADN en la muestra de sangre sea mínima, con lo que se garantiza mayor sensibilidad del equipo.

➤ Mezcla de la muestra de sangre con histopaque

Esta mezcla se hace adicionando la sangre al histopaque lentamente, como se observa en la figura 6.1

Figura 6.1. Fotografía de la adición de Histopaque a la muestra de Sangre

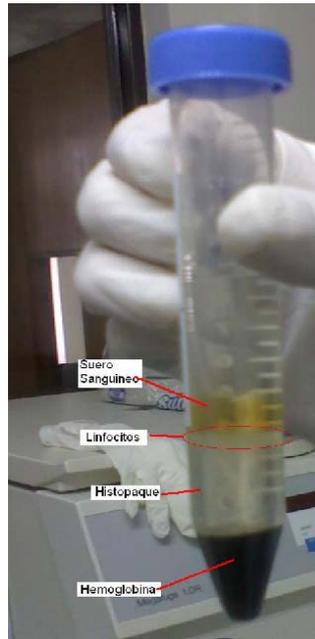


La solución se deja en reposo por aproximadamente 10 minutos con el fin de permitir el efecto del histopaque. Posteriormente se adiciona PBS a la muestra y se lleva a centrifugado durante media hora a 2000 rpm, proceso que facilita el proceso de separado de los linfocitos del resto de componentes como se observa en la figura 6.2.

- Se extraen los linfocitos y se hace un lavado con PBS (amortiguador).

Con ayuda de una micropipeta se extrae la capa de linfocitos y se le adiciona al PBS. La función del PBS es hacer una última purificación a la muestra de modo que se garantice la presencia única de linfocitos. Luego se lleva la solución a un centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm. Después se descarta el sobrenadante, nuevamente se hace una última adición de PBS y se lleva a centrifugado durante 10 min a 14000 rpm lo que genera la destrucción celular de los linfocitos, provocando la precipitación del ADN que forma un botón blanco.

Figura 6.2. Compuestos de la sangre ya separados.



- Se purifica el ADN

En la figura 6.3 se observa el botón blanco consistente de ADN. Con el fin de purificar este ADN se le adiciona CHELEX al 15%, que, junto con un proceso de centrifugado de 8 min a 12.000 rpm y posterior baño maría a 57°C, provoca la precipitación de los componentes diferentes al ADN, dejando en la superficie una mezcla de ADN y agua, como se observa en la figura 6.4.

Figura 6.3. Formación de Botón de ADN.



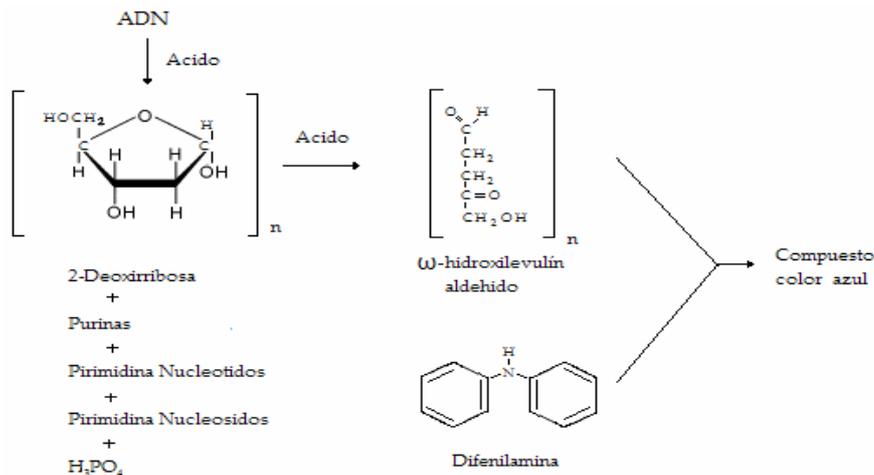
Figura 6.4. Muestras de ADN purificado.



6.1.2 Coloración de la muestra

Para lograr una coloración de la molécula de ADN es necesario hacer uso de un colorante que reaccione con alguno de sus componentes. De acuerdo con la estructura molecular de los nucleótidos (figura 1, capítulo II), se hizo el proceso de coloración de la muestra con difenilamina (DFA). Este colorante reacciona selectivamente con 2-deoxipentosas. En disolución ácida la deoxipentosa se convierte en ω -hidroxilevulín aldehído que reacciona con la DFA para dar un compuesto azul. La intensidad del color azul, que se mide en 600 nanómetros, es directamente proporcional a la concentración del azúcar (componente fundamental del ADN, ver figura 1 cap. 2). La reacción de difenilamina se representa en la figura 6.5.

Figura 6.5. Reacción de difenilamina con el ADN [1]



Para la coloración de la muestra se mezcla 1 ml de solución de DFA al 2%, con 1ml de la muestra de ADN homogenizado a medir.

6.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DE CURVA PATRÓN PARA EL FCL-600

6.2.1 Pruebas con el GeneQuant

Para la elaboración de la curva se sigue el proceso descrito en el ítem 5.5.2 del capítulo anterior. Como primer paso se cuantificaron las 5 muestras de ADN con el GeneQuant a 260 nm, por lo que no requirieron de coloración. A esta longitud de onda el GeneQuant entrega datos de concentración y absorbancia, como se indica en la siguiente tabla 6.1. Como era de esperar, a menor concentración se obtiene menor absorbancia por parte de la muestra. Estos datos dan una medida de la concentración de las muestras antes del proceso de coloración, lo que permitirá determinar la efectividad del proceso de coloración.

Tabla 6.1. Datos de concentración y absorbancia obtenidos con el espectrofotómetro GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator para la muestra en estudio sin coloración.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
1	27.00	0.540
2	12.17	0.243
3	9.30	0.186
4	5.95	0.119
5	3.95	0.079

Como paso siguiente se tiñeron las muestras y se midió su absorbancia con el GeneQuant a 600 nm. Como ya fue dicho, a esta longitud de onda el GeneQuant no entrega datos de concentración, no obstante es posible calcularla a partir de los datos de absorbancia haciendo uso de la ley de Bourguer- Lambert- Beer, ecuación 3.6 del capítulo 3. En la tabla 6.2 se registran los datos de absorbancia (medida) y concentración (calculada) para 4 muestras con parámetros de coeficiente de absortividad molar ($\epsilon_{600} = 0.033 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$, $b=1\text{cm}$). La quinta muestra (diluida al 3.125%) registró un valor de absorbancia muy baja, fuera del rango de confiabilidad del equipo, por lo que se descartó su medida.

Tabla 6.2. Resultados de medición de concentración de ADN con el espectrofotómetro GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator a 600 nm

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia Medida
1	12,27	0,405
2	6,07	0,200
3	3,93	0,130
4	2,69	0,089
5	*	Descartado

En el proceso de coloración cada muestra fue disuelta en 1 ml de colorante de DFA, lo que en principio debe llevar su concentración a la mitad. En la tabla 6.3 se observa una comparación de los datos de concentración esperada cuando se aplica el colorante (50% de la concentración antes del colorante) y de la calculada a partir de la ley de Lambert-Bourguer-Beer.

Tabla 6.3. Comparación de concentraciones.

Muestra	Concentración antes de colorante (µg/ml)	Concentración Calculada después del colorante (µg/ml)	Diferencia de concentraciones (µg/ml)
1	13,50	12,27	1,23
2	6,09	6,07	0,02
3	4,65	3,93	0,72
4	2,97	2,69	0,28
5	1,95	*	*

De la tabla anterior podemos observar que en todas las muestras ocurrió una pérdida de ADN, que se pudo producir en la manipulación de las mismas en el proceso de coloración, debido a que el ADN se pega en las paredes de los diferentes recipientes donde la muestra ha estado contenida y en las paredes de las puntas de las micropipetas.

6.2.2 Pruebas con el FCL-600

Como ya fue expresado, el fotocolorímetro FCL-600 entrega datos de concentración a partir de la medida de diferencia de voltajes entre el fotodetector ubicado en la muestra de referencia y el ubicado en la muestra en estudio. En adelante no se tomarán medidas con la muestra 5 por las razones ya citadas. En la tabla 6.4 se presentan dichas medidas.

Tabla 6.4. Medida de la diferencia de voltaje con el FCL-600 para cada muestra en estudio

Muestra	VS1 (V)	VS2 (V)	ΔV (V)
1	4.50	3.57	0,93
2	4.48	3,93	0,55
3	4.50	4.03	0,47
4	4.47	4.50	-0,03

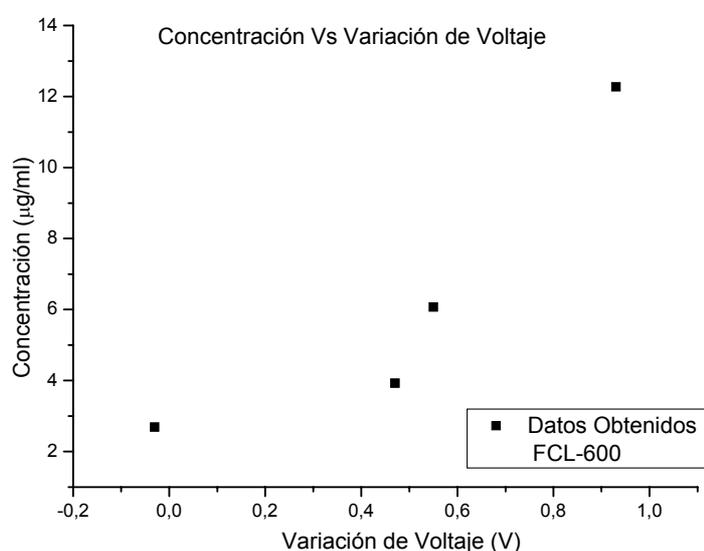
Para la calibración del instrumento se grafican los datos ΔV para cada muestra respecto a la concentración medida por el GeneQuant, de acuerdo con los datos registrados en la tabla 6.5

Tabla 6.5. Diferencia de voltaje medido por el FCL-600 y concentración medida con el GeneQuant

Muestra	ΔV (V)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
	FCL-600	GeneQuant
1	0,93	12,27
2	0,55	6,07
3	0,47	3,93
4	-0,03	2,69

A seguir, se grafican estos resultados para observar su comportamiento. En la gráfica 6.1 se observa tan comportamiento. Dato de ΔV para la muestra 4 no corresponde al rango de confiabilidad del FCL-600, ya que de acuerdo con su patrón de funcionamiento no es aceptable un valor negativo para esta diferencia, por lo que en adelante se descartará la medida de esta muestra.

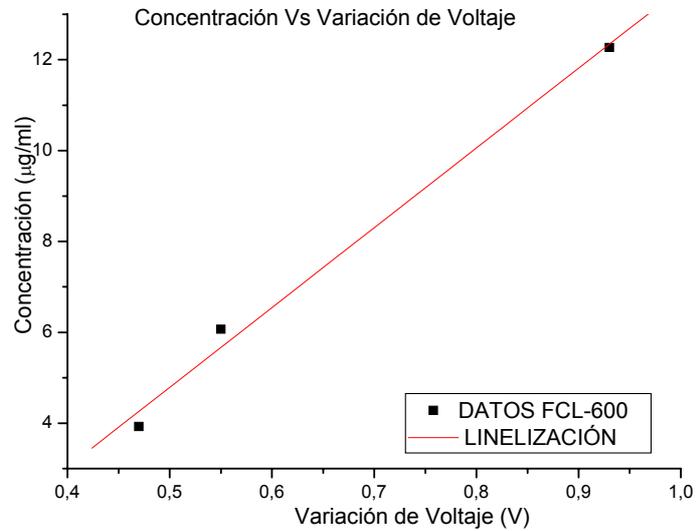
Grafica 6.1. Medidas de variación de voltaje con FCL-600.



6.2.3 Construcción de la curva de calibración

En la gráfica 6.2 se presenta el comportamiento de la diferencia de voltaje (medido con el FCL-600) con la concentración (medida con el GeneQuant) para las 3 muestras en estudio.

Grafica 6.2. Linealización de datos obtenidos con el FCL-600



De acuerdo con la gráfica anterior se puede determinar que la curva de calibración tiene una pendiente de **17,56 µg/Vml**, con un límite superior de **66,24 µg/ml** debido a la máxima variación de voltaje posible del FCL-600 y una concentración de **2,67 µg/ml** como límite inferior obtenido de la tabla 6.5. La ecuación que representa esta relación está dada por

$$C=17,56\Delta V - 4 \quad (6.1)$$

con un error de: **1,52µg/Vml**

Con esta gráfica será posible en adelante arrojar datos de concentración de ADN a partir de la medición de datos de diferencia de potencial en el FCL-600.

6.3 CUANTIFICACIÓN DE ADN EN MUESTRAS CON CONCENTRACIÓN DESCONOCIDA CON EL FOTOCOLORÍMETRO FCL-600

Para comprobar que la recta de calibración es válida para diferentes concentraciones, esto es, que el FCL-600 está listo para mediciones, se realizó el procedimiento de medición para dos muestras de concentración desconocida. Los valores calculados a partir de la curva de calibración fueron comparados con las concentraciones obtenidas midiendo con el GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculador. La fotografía de la figura 6.6 muestra el dispositivo con una muestra teñida y la muestra de referencia.

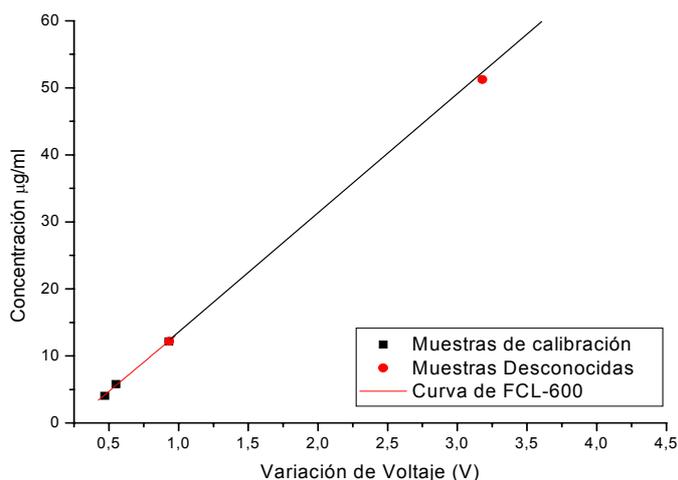
Figura 6.6. Medición de muestras teñidas con DFA, usando FCL-600.



Para la primera medición se utilizó ADN comercial de *E. Coli* (cortesía laboratorio bajas temperaturas Universidad del Cauca), se tiñó y se midió con el FCL-600. El resultado fue de **12,20 µg/ml**.

En la segunda medición se utilizó una muestra de ADN de un voluntario y se obtuvo una concentración de **51,25 µg/ml**. Ambos valores se llevaron a la curva de calibración como se muestra en la gráfica 6.3.

Grafica 6.3. Datos de concentración medida con el FCL-600 sobre curva de calibración.



Las dos muestras fueron medidas con el GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6.6. Muestras con concentración desconocida medidas con el FCL-600 y el Gene Quant

Muestra	FCL-600	GeneQuant	Diferencia
E.Coli	12,20	12.45	0.25
Voluntario	51,25	51.28	0.03

Para la muestra de ADN de E. Coli **12.45µg/ml** y para la muestra de ADN del voluntario **51.28 µg/ml**. En la tabla 6.5 se registran estos datos y la diferencia entre ellos. Esta diferencia está dentro del margen de error encontrado a partir de la curva de calibración del FCL-600, lo que garantiza confiabilidad en su funcionamiento.

CONCLUSIONES

En la ejecución del proyecto se presentaron inconvenientes de diferente índole como limitaciones de disponibilidad de los elementos, laboratorios, ceses de actividades de la Universidad y presupuesto. A pesar de todo ello se alcanzó el objetivo general del proyecto, es decir, se hizo el diseño y la construcción de un equipo para la medición de concentración de ADN en sangre, al que se denominó fotocolorímetro FCL-600. Los datos tomados con el instrumento fueron validados con el espectrofotómetro GeneQuant *pro* RNA/DNA calculator diseñado y fabricado conforme a un sistema de calidad aprobado (ISO 9001).

Durante el proceso de diseño y construcción del instrumento se llegó a conclusiones de tipo técnico tales como:

- El bulbo de radiación utilizado se escogió por su disponibilidad y su bajo costo, logrando obtener la radiación deseada, sin embargo hay mucha pérdida de intensidad de luz que podría ser aprovechada para obtener mejores resultados, ampliando el rango de medición y la precisión del equipo.
- El sistema de lentes utilizado para la colimación de luz no son los óptimos, obteniendo una cantidad de luz mínima para la iluminación de las muestras, teniendo pérdidas significativas en la potencia irradiada por la fuente de luz, perdiendo resolución en la medida.
- El funcionamiento de los fotodetectores en una configuración fotorresistiva (sugerencia del fabricante) no es el mas adecuado debido a la presencia de ruido, al ser puestos en una configuración fotovoltaica

- con un acople de impedancias se optimiza el funcionamiento, observado en la atenuación del ruido.

- Es posible construir un equipo para mediciones biomédicas que cumpla con las exigencias de precisión en la obtención de resultados para investigación con bajo presupuesto.
- Durante la realización del proyecto salió al mercado un equipo diseñado y optimizado para la medición de concentración de ADN que fue adquirido por el Grupo de Genética Humana Aplicada de la Universidad del Cauca, lo que permitió contar con una instrumentación adecuada y medición directa para el proceso de calibración y comparación de resultados del FCL-600.

- Es importante la interacción entre los diferentes grupos de investigación de las diversas áreas, con el fin de obtener mejores resultados y la realización de proyectos de gran envergadura. En este trabajo se contó con la colaboración del Grupo de Investigación de Genética Humana Aplicada (GIGHA), Grupo de Biología Celular y Molecular, Grupo de Ciencia y Tecnología de Materiales Cerámicos (CYTEMAC), Grupo de Inmunología y enfermedades infecciosas, Grupo de Óptica y Láser (GOL), Grupo de Física de Bajas Temperaturas (FISBATEM), Aguas Residuales, Departamento de Química y los demás miembros del Grupo de Investigación en Óptica Aplicada y Didáctica (GIOPAD).

ANEXO A

MANUAL DE USO FCL-600

Ubicación e Instalación

Cerciórese de que el lugar de instalación propuesto cumpla con condiciones ambientales para un funcionamiento seguro:

- Sólo para uso en interiores

- Temperatura 10°C a 40°C

El instrumento debe colocarse sobre un estante o mesa plana y dura, que proporcione soporte adecuado al peso del equipo (2.5 kg) y de modo que el aire pueda circular libremente alrededor del instrumento. El instrumento tiene unas dimensiones de (60x 25x 10) cm.

Cerciórese de que no se encuentren obstruidas las entradas ni las salidas del ventilador de enfriamiento; coloque el instrumento por lo menos a 5 cm de la pared.

Cerciórese que la correa de comunicación entre el puerto serial del FCL-600 y el computador está conectada correctamente.

Este equipo debe conectarse a un regulador de voltaje de 120 VAC

Encienda el instrumento en el panel posterior del equipo; Espere aproximadamente 15 minutos después del encendido para que se establezca la salida de la fuente de radiación (lámpara halógena).

Ponga la muestra de referencia (colorante de Difenilamina + agua) y la muestra en estudio (Difenilamina+agua+ADN) en las cubetas de vidrio. El volumen mínimo que se debe agregar a cada una de las cubetas es de 2 ml para tener una medida confiable.

Ubique las cubetas en el compartimiento de muestras del FCL-600.

Ponga a funcionar el software del equipo en labView versión (6.i)

Espere aproximadamente 5 s para que el software despliegue la medida de concentración de ADN en unidades de ($\mu\text{g/ml}$), así como la fecha y hora de la toma de datos, que depende de la configuración de hora y fecha del computador donde este instalado el software.

ANEXO B

RECOMENDACIONES FUTURAS

- Se recomienda utilizar el bombillo halógeno y no una fuente de radiación ultravioleta debido a que la exposición continua a este tipo de radiación puede causar cáncer en la piel.
- Reemplazando el filtro (FB 600-10 THORLABS) por un filtro de este equipo, para realizar cuantificación de ADN con un colorante llamado Picogreen, que ha diferencia del colorante de difenilamina no esta hecho con ácidos nocivos para la salud, la ganancia de la etapa de amplificación es variable debido a que fue puesto un trimer como resistencia de ganancia, el fotodetector también es sensible a la longitud de onda de 532 nm, la fuente de luz contiene la longitud de onda de absorción del ADN teñido con picogreen.

BIBLIOGRAFÍA

A. BRUGAROLAS. Aplicación de la citofluorometría a los tumores sólidos para medida del ADN y fase S. En: Medicina Clínica, Vol. 101, No. 19. 1993 p 750-756.

BIOCHROM Cambridge Science Park Milton Road CAMBRIDGE CB4 0FJ UK
<http://www.biochrom.co.uk/UV_Vis_Spectrophotometry/GeneQuant>

BREGMAN, Allyn. Laboratory investigations in cell and molecular biology. 3 ed. Nueva York: John Wiley. 1996.

CONNOR Enrique. Web:
<<http://www.uv.es/oconnor/medicina/Citometria%20AB.ppt>>

CULTEK,S.L. Web<http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?P=Aplicacion_QPCR&opc=introduccion>

CURTIS, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000.

DINIZ-FREITAS M, GARCÍA-GARCÍA A, CRESPO-ABELLEIRA A, MARTINS-CARNEIRO JL, GÁNDARA-REY JM. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. En: Medicina Oral, Vol.9. 2004 p.355-61.

GARRIDO M. J. Purificación y serología del virus del mosaico enanizante del maíz - raza venezolana. En: Agronomía Trop. Vol. 43, No 3, 1993. p 87-106.

GONZALES HORTA Azucena. En: Fitotecnia Mexicana, Vol. 28, No. 002, 2005.

HOLLAS. Michael. Modern Spectroscopy. 4 ed. Inglaterra: John Wiley. 2004.

MARTÍNEZ CONTRERAS Luz Aurora Tipos de Papilomavirus de alto riesgo circulantes en mujeres de San Luís de Potosí y Guanajuato. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnología, A.C. México. 2005.

OLSEN D, Eugene. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté. 1986.

SKOOG DOUGLAS. Principios de Análisis Instrumental. 5 ed. Madrid: Mc Graw Hill. 2001.

STEPHANOS Hadziyannis. The New England Journal of Medicine. Web: <http://www.accesomedia.com/display_release.html?id=10296>.

VALDIVIA BONET Luis. Fotobiología Cutánea: Generalidades.En: Revista Peruana de Dermatología, Vol. 12, No 2, 2002.

Web :< <http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis>>.

WILARD. Hobart. Métodos Instrumentales de Análisis. México: Iberoamericana. 1991.