



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Unidad Monterrey**

*Termociclador para PCR tiempo real en microdispositivos, portátil y  
fabricado con piezas impresas en 3D y electrónica de estantería*

**Tesis que presenta**

Roberto Alejandro Mendoza Gallegos

**para obtener el grado de Maestro en Ciencias en**

Ingeniería y Física Biomédicas

**Director de tesis**

Dr. José Luis García Cordero

# Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi asesor, el Dr. José Luis García Cordero por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación bajo su dirección y confianza.

También quiero agradecer al CONACYT por el apoyo económico para obtener el grado de Maestría.

Al CINVESTAV Monterrey por permitirme participar en este posgrado multidisciplinario y multicultural.

A la Qfb. Amelia Ríos Rodríguez por proveerme las facilidades de su laboratorio, así como por introducirme en el campo de las técnicas de biología molecular, por sus enseñanzas y su paciencia con mi trabajo.

A mis sinodales por sus consejos y observaciones.

A mis compañeros de laboratorio por el trabajo en equipo, por su amistad y experiencia.

A mi familia por el apoyo incondicional que siempre demuestran y la motivación incomparable que representan. Este trabajo no hubiera sido posible sin ustedes.

# ÍNDICE / CONTENIDO

Lista de abreviaturas .....	5
Resumen .....	6
Abstract .....	7
1. Introducción.....	8
1.1 PCR .....	8
1.1.1 PCR en tiempo real (qPCR).....	11
1.2 Imágenes de fluorescencia .....	14
1.2.1 Medición de fluorescencia.....	16
1.2.2 Filtros ópticos .....	17
1.2.3 Fuentes de iluminación LED .....	18
1.2.4 Sensores de imagen .....	19
1.2.2 Imágenes a color.....	21
Módulo de la cámara en Raspberry Pi .....	22
1.3 Termocicladores .....	23
1.3.1 Tecnología microfluídica para PCR.....	26
1.3.2 Termocicladores para dispositivos microfluídicos .....	30
1.4 Revolución Open-Source.....	36
1.4.1 Manufactura aditiva.....	37
1.5 Conclusión .....	39
1.6 Hipótesis .....	39
2. Objetivos .....	41
2.1 General.....	41
2.2 Específicos .....	41
3. Materiales y métodos experimentales .....	42

3.1 Termociclador .....	42
3.1.1 Algoritmo PID .....	43
3.1.2 Calibración del termistor .....	45
3.1.2 Circuito electrónico.....	46
3.2 Impresión en 3D .....	48
3.3 Medición y análisis de fluorescencia.....	51
3.3.2 Software para el control de la cámara.....	53
3.4 Diseño y fabricación de dispositivos .....	55
3.4.1 Dispositivos de PDMS.....	55
3.4.2 Dispositivos de PMMA .....	55
3.6 PCR cuantitativa .....	57
4. Resultados .....	60
4.1 Caracterización del termociclador.....	60
4.1.1 Calibración del termistor .....	60
4.1.2 Homogenización de la temperatura en el calentador .....	63
4.2 Medición de fluorescencia .....	68
4.3 PCR en tiempo real .....	71
5. Discusión.....	75
6. Conclusiones.....	77
7. Perspectivas.....	78
8. Referencias .....	79
9. Apéndices .....	83
Apéndice A: Script en Python para el control de temperatura .....	83
Apéndice B: Script en Python para medición de fluorescencia en tiempo real .....	86
Apéndice C: Script en Python para la interfaz gráfica de usuario .....	90

## Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CMOS	Semiconductor de metal-óxido
FAM	6-Carboxi fluoresceína
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
LED	Diodo emisor de luz
LOD	Límite de detección
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PID	Proporcional, integral, derivativo
PMMA	Polimetilmetacrilato
POC	Punto de atención
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ROI	Región de interés

# Resumen

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es el estándar de oro para el diagnóstico molecular. En esta técnica se someten a enzimas y ácidos nucleicos a través de ciclos térmicos con el fin de replicar repetidamente la información genética. Sin embargo, una de las limitantes en el área del análisis genético es que la mayoría de termocicladores están hechos para ser usados en laboratorios convencionales, lo que los hace difíciles de operar, voluminosos y costosos. Estas barreras limitan la expansión de su aplicación a lugares de difícil acceso o con escasos recursos económicos.

Para proveer una plataforma más accesible, en esta tesis se desarrolló un sistema barato, compacto y portable para realizar PCR en tiempo real (qPCR). Este sistema integra un contenedor para microfluidos, un sistema de medición de fluorescencia hecho a la medida y componentes electrónicos de estantería para proveer datos cuantitativos sobre el nivel de ADN en una solución. El contenedor para microfluidos se coloca sobre una resistencia de potencia con cubierta de cobre y la energía eléctrica es transformada en calor por el efecto Joule, el cual es controlado junto con un ventilador para enfriar y de esta manera producir un termociclador. El sistema completo fue probado y los resultados obtenidos demuestran que la integración de las partes permite realizar qPCR de manera portable, en tiempo real y con un bajo costo.

# Abstract

The polymerase chain reaction (PCR) is the gold standard technique for molecular diagnostics. In this technique, enzymes and nucleic acids are subjected to thermal cycles in order to replicate genetic information repeatedly. However, one of the main limitations in the area of genetic analysis, is that most of the thermocyclers are made for use in standard laboratories, which makes them bulky, difficult to operate, and expensive. These barriers limit the expansion of PCR applications to places that have difficult access or limited economic resources. To provide a more accessible platform, in this thesis I developed a low-cost, compact and portable system to perform real time PCR (qPCR). This system integrates a microfluidic device, a custom-made fluorescence optical setup and off-the-shelf electronic components to provide quantitative data on the level of DNA in a solution. The microfluidic device is placed on a copper-sheathed power resistor and the electrical energy is converted into heat by the Joule effect. The temperature is controlled together with a fan to cool down the resistor and thus produce a thermal cycle. The complete system was tested with a series of dilutions of DNA and the results obtained demonstrated that our instrument allows to perform qPCR in a portable way, in real time, and at low cost.

# 1. Introducción

## 1.1 PCR

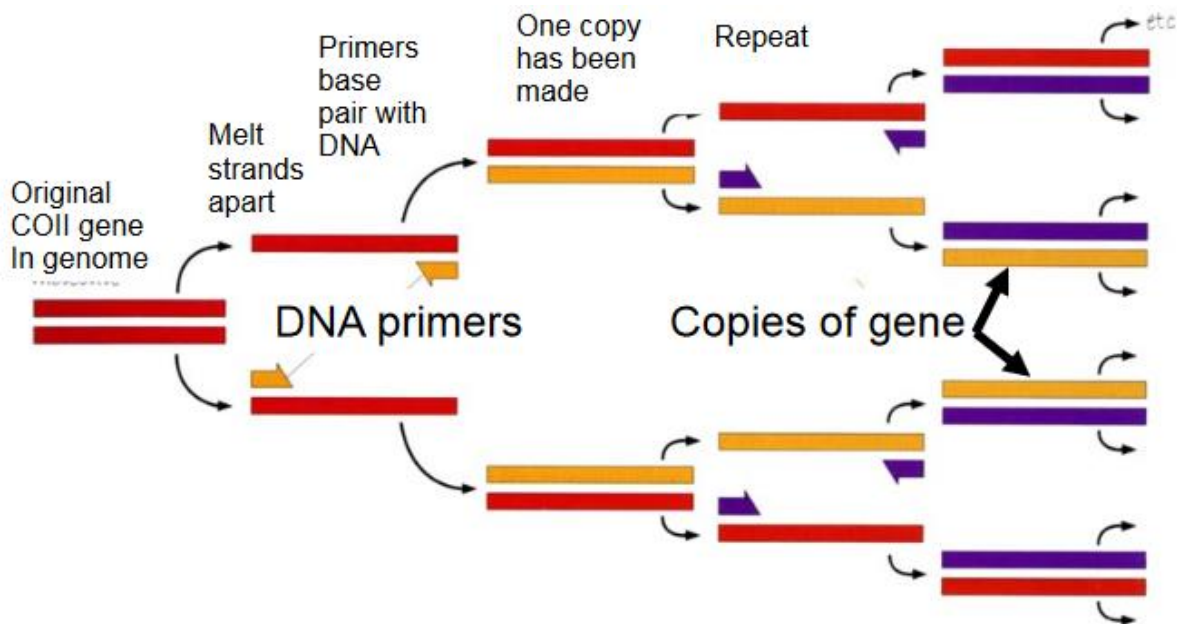
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), inventada en 1983 por el Dr. Kary Mullis, es considerada como uno de los grandes inventos biotecnológicos del siglo pasado. En esta técnica, una pequeña cantidad de ADN es amplificada millones de veces para producir una cantidad detectable. Este proceso es ampliamente usado en biología y medicina, incluyendo aplicaciones como la detección de patógenos [1], clonación de ADN [2], expresión génica [3], identificación de criminales [4] y diagnóstico de enfermedades [5], constituyendo la base de múltiples ensayos “estándares de oro” para el diagnóstico médico.

La reacción de PCR es llevada a cabo ciclando térmicamente una solución que contiene ácidos nucleicos libres, que actúan como bloques para las nuevas cadenas de ADN; oligonucleótidos específicos, los cuales son moléculas cortas de ADN (20 a 30 nucleótidos) sintetizadas para reconocer el inicio de las cadenas que serán replicadas y sirven como señal de inicio para la enzima ADN polimerasa, que es la encargada de replicar; y por último iones de magnesio como  $MgSO_4$  o  $MgCl_2$ , necesarios para la actividad de la polimerasa [6]. Este coctel es comúnmente llamado la mezcla maestra de PCR.

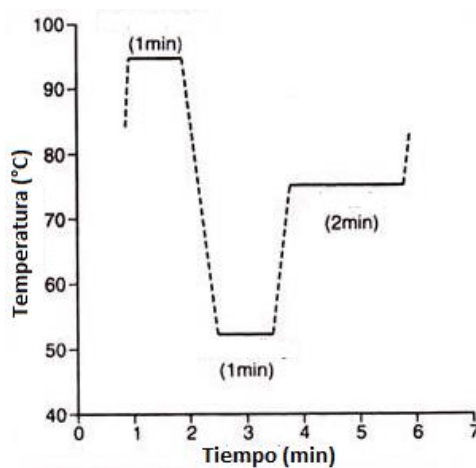
En cada ciclo de reacción PCR hay tres pasos principales. En el primero de ellos la solución se calienta a alrededor de 95 °C. La doble cadena de ADN es desnaturalizada o dividida ya que a esa temperatura, las interacciones conocidas como puentes de hidrógeno se vuelven inestables entre los pares de bases. En el segundo paso se enfría la solución hasta una temperatura de aproximadamente 54 °C permitiendo a los oligonucleótidos formar puentes de hidrógeno con sus segmentos complementarios en la cadena larga de ADN. Los oligonucleótidos están diseñados para alinearse con un sitio específico en el ADN basado en su secuencia. En el tercer paso, se calienta la solución a 72 °C. A esta temperatura, la polimerasa reconoce a los oligonucleótidos alineados con la primer cadena y añade nucleótidos complementarios para replicar la



cadena de ADN. Este ciclo se repite de 25 a 40 veces y se ilustra gráficamente en la **Figura 1**. El perfil de temperatura de un ciclo de PCR se muestra en la **Figura 2**.



**Fig. 1:** Ilustración del proceso de la PCR, donde una doble cadena de ADN es desnaturizada al calentarla alrededor de los 95 °C y posteriormente enfriada para permitir la alineación de los oligonucleótidos que son reconocidos y extendidos por la polimerasa, duplicando el número de cadenas al inicio. El proceso se repite de 25 a 50 veces y de esta manera se forman miles de copias de la molécula inicial. (Figura tomada de [7]).



**Fig. 2:** Un ciclo de PCR mostrando las mesetas en 95, 54 y 72 °C.

Una reacción típica de PCR en un termociclador comercial tarda entre 30 minutos (LightCycler®) y 2 horas (sistema Peltier). Este tiempo de duración es aceptable para ciertas aplicaciones, sin embargo, existen otras que requieren reacciones rápidas tales como las aplicaciones clínicas donde el tratamiento depende del resultado. El tiempo de cada ciclo depende de las características del termociclador. Si el termociclador tarda mucho tiempo en alcanzar cada temperatura, el tiempo de cada ciclo será mayor. Si la conducción o convección de calor es muy lenta en la cámara de reacción, también lo será el ciclo.

Los termocicladores que utilizan elementos Peltier funcionan al convertir el voltaje eléctrico en calor debido al efecto termoeléctrico que se produce en estos semiconductores y transferir el calor por conducción hacia un bloque de aluminio que pesa alrededor de 41 g. Este bloque tarda tiempo en calentarse y transferir el calor al volumen de reacción que se coloca en él. Por su parte, los termocicladores convectivos como el LightCycler funcionan al circular repetidamente el líquido dentro de capilares de reacción por medio de gradientes de temperatura y, han reportado resultados de PCR hasta en 20 minutos [8]. Una razón por la que la PCR ocurre tan rápido en este instrumento es que el volumen de reacción es pequeño (0.5 – 2  $\mu\text{L}$ ), lo que permite que se caliente muy rápido por medio de la convección.

Otro factor que influencia la duración de cada ciclo es la longitud del ADN que será copiado. Las cadenas cortas tardan menos tiempo en replicarse ya que la tasa de inserción de nucleótidos por la Taq polimerasa a 72 °C es de 50 pares de bases/s [9]. Precisamente, la actividad de la polimerasa depende de la concentración de su cofactor, el ion  $\text{Mg}^{2+}$ , el cual, a menor concentración incrementa la precisión de la polimerasa, pero reduce la tasa de polimerización. Por otro lado, a mayor concentración incrementa la tasa de polimerización, pero también aumenta el error, es decir, apareamientos entre bases incorrectas. Al añadir más enzima también incrementan los errores y amplificaciones inespecíficas, pero mejora la eficiencia de la PCR. La actividad de la polimerasa y la concentración óptima de  $\text{Mg}^{2+}$ , nucleótidos y oligonucleótidos dependen del tipo de enzima que se use. Se han desarrollado enzimas variantes de la Taq con diferentes tasas de error, tasas de polimerización y

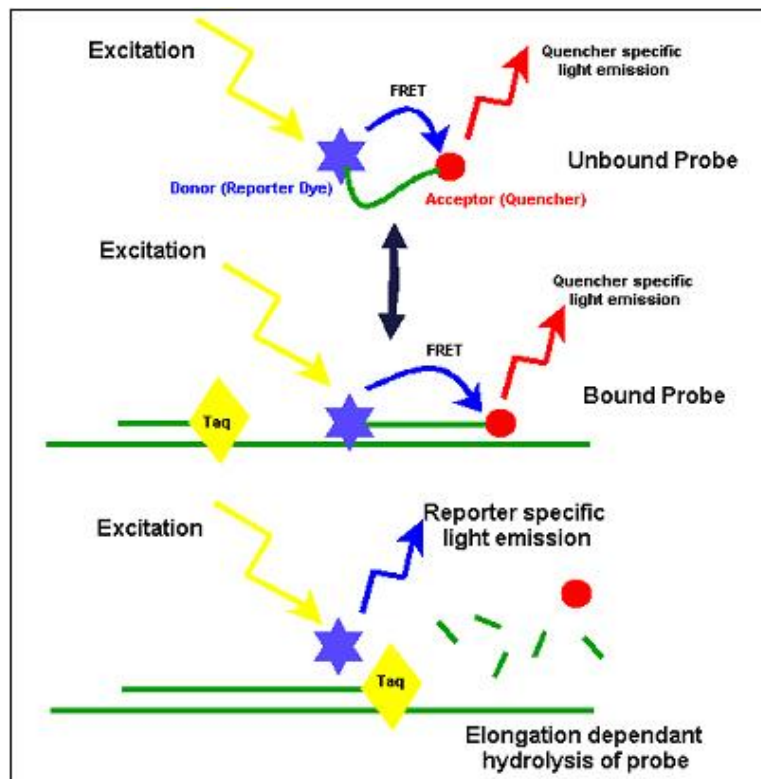
capacidades de corrección de errores las cuales requieren diferentes concentraciones óptimas de reactivos y diversos protocolos, por ejemplo de activación o de incubación [10, 11]. En conclusión, el tiempo de cada ciclo se ve influenciado por el tipo de termociclador, el volumen de reacción, la longitud del ADN que será amplificado y la polimerasa usada.

El ADN amplificado puede ser detectado de diferentes maneras. Una de ellas es tomando la muestra y moviéndola a través de un gel con la aplicación de un campo eléctrico. Los fragmentos de ADN pequeños migran más rápido que los fragmentos más grandes y, al retirar el campo eléctrico, cada fragmento de ADN se detecta midiendo la distancia que recorrió a través del gel por medio de un colorante para el ADN y visualizándolo con iluminación UV. La luz UV causa que un marcador fluorescente añadido al ADN emita una señal fluorescente y así se visualiza la localización de la molécula.

### **1.1.1 PCR en tiempo real (qPCR)**

Otra manera de detectar la amplificación del ADN es monitorear durante cada ciclo la amplitud de fluorescencia emitida por moléculas cuya interacción con el ADN produce señales fluorescentes. Por ejemplo, la molécula SYBR Green es una molécula que fluoresce cuando se une al ADN de doble cadena, por lo que, al amplificarse la cantidad de ADN, habrá más moléculas de SYBR Green emitiendo fluorescencia. Por otro lado, está el uso de sondas marcadas con fluorescencia. Las sondas consisten en cadenas de una hebra de ADN con longitud de 100 a 1000 bases las cuales están hechas para ser complementarias a una secuencia en un fragmento de una cadena que será amplificada y, cuando los lugares donde se alinean las sondas ya están ocupados por ADN de doble cadena, se sabe que la PCR ocurrió en esa molécula [12]. Por ejemplo, en las sondas TaqMan, la sonda consiste en un fluoróforo unido covalentemente al extremo fosfato y un quencher en el extremo hidroxilo. El quencher tiene la función de reprimir la fluorescencia del fluoróforo cuando es excitado, por medio del fenómeno de transferencia de energía de resonancia Förster (FRET). En la fase de alineación, las sondas se alinean con la región complementaria de ADN que

será amplificada y, conforme la polimerasa extiende los primers y sintetiza nuevas cadenas, la actividad exonucleasa de la polimerasa, es decir, su capacidad de escindir nucleótidos uno a uno a partir de un extremo, degrada la prueba, liberando al fluoróforo, eliminando el efecto de quenching y permitiendo la fluorescencia [13]. Este proceso se ilustra en la **Figura 3**.

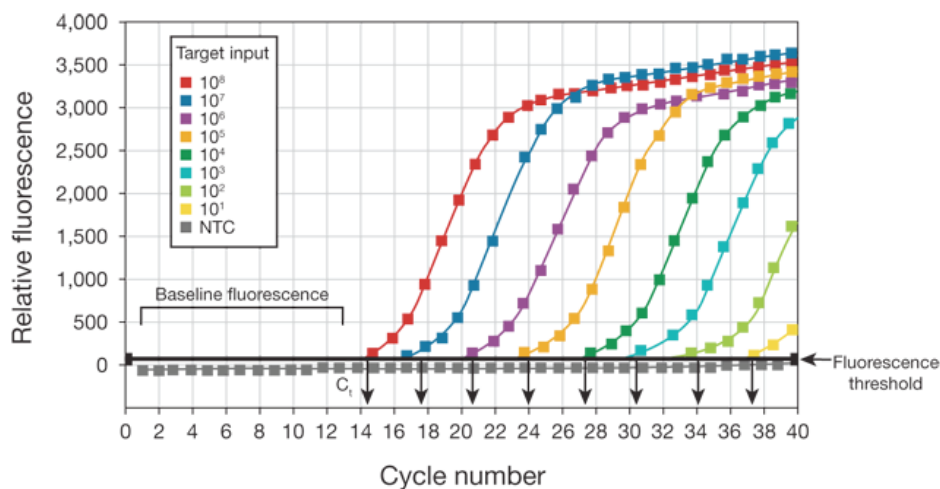


**Fig. 3:** La sonda TaqMan cuya secuencia específica es diseñada para unirse a un segmento entre los 2 oligonucleótidos de la PCR. Primero se muestra una representación de la sonda en solución y posteriormente su degradación durante el proceso de amplificación. Tomada de [14].

La gran ventaja de esta PCR en tiempo real es la eliminación de cualquier post proceso, como electroforesis o hibridación para detectar el producto, mientras que la desventaja es que requiere una polimerasa con actividad exonucleasa como en el caso del ADN polimerasa TaqMan. Esta polimerasa requiere un protocolo de activación de 15 minutos a 95 °C para reducir la ocurrencia de amplicones no específicos [11]. El término amplicón se refiere a segmentos de ADN producidos por la reacción de PCR. El ADN polimerasa TaqMan también tiene la capacidad de extender los

oligonucleótidos y replica cadenas de ADN a la temperatura de alineación (60°), por lo que en la qPCR TaqMan, la extensión se combina el paso de alineación, usando 60 °C como temperatura.

El cambio de fluorescencia es un indicador de la cantidad de moléculas amplificadas, por tanto, al monitorear la amplificación en cada ciclo, es posible detectar cuándo empieza a incrementarse la fluorescencia por encima de un umbral y, a través de curvas de calibración se calcula la cantidad de ADN que había en la muestra inicial (**Figura 4**). La técnica de cuantificación durante cada ciclo de reacción de PCR es llamada PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) y se ha convertido en la técnica por excelencia para la cuantificación de ADN y ARN ya que permite incrementar la precisión de la medición de ADN en las muestras iniciales, también mejora el rango dinámico (abarca entre 6 y 8 órdenes de magnitud), además de que elimina los procesos post-PCR, como hibridación o electroforesis que pueden contaminar las muestras [15]. Sin embargo, para poder realizar esta cuantificación en tiempo real es necesario integrar un sistema óptico para detección de fluorescencia junto con el termociclador por lo que resulta compleja desde el punto de vista de la instrumentación.

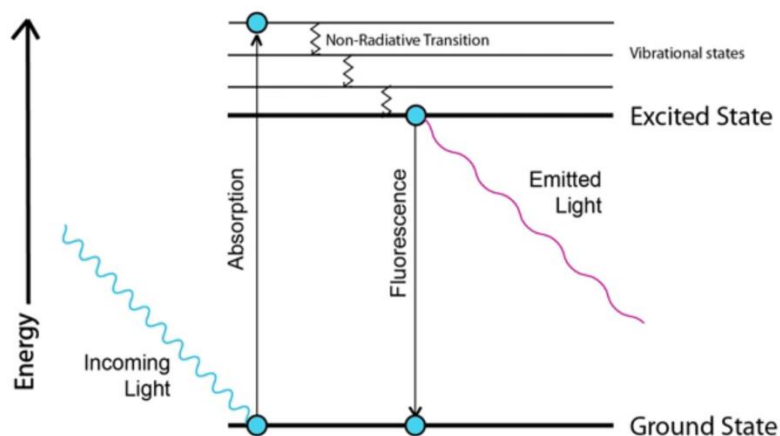


**Fig. 4:** Curvas de amplificación de PCR en tiempo real donde se muestran diferentes concentraciones en la solución inicial y el ciclo umbral a partir del cual se cuantifica la amplificación.

## 1.2 Imágenes de fluorescencia

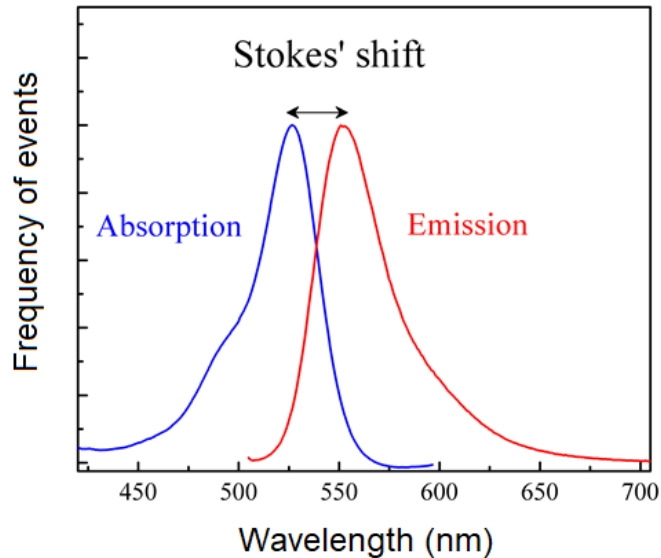
El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando una molécula absorbe energía en forma de fotones y después regresa a su estado basal emitiendo fotones de menor energía. El fotón absorbido, con energía  $hf$ , donde  $h$  es la constante de Planck y  $f$  es su frecuencia, cambia el estado basal de energía  $S_0$  de la molécula a un nivel excitado  $S_1$ . La molécula posteriormente se relaja emitiendo un fotón, disminuyendo su nivel de energía al nivel basal nuevamente. El fotón emitido tiene una menor energía y por tanto una menor longitud de onda, usualmente en el espectro visible, produciendo la luz fluorescente [16] (**Figura 5**).

Los fluoróforos están en estado excitado por alrededor de  $10^{-15}$  a  $10^{-9}$  segundos y este intervalo de tiempo es llamado el tiempo de vida excitado de un fluoróforo. Un fluoróforo puede en teoría pasar a través de estos ciclos de fluorescencia indefinidamente lo cual resulta útil porque puede generar múltiples señales, como un lazo continuo. Sin embargo, en realidad la inestabilidad estructural del fluoróforo degradará y cambiará su estructura y por tanto perderá la habilidad de fluorescer. Este fenómeno es llamado fotoblanqueo [17].



**Fig. 5:** *Proceso de fluorescencia. Una molécula es excitada por un fotón a una longitud de onda precisa, ascendiendo a un nivel de energía mayor. Debido a la vibración térmica en la molécula, ésta pierde energía y después de un tiempo alcanza el estado mínimo de excitación donde emite un fotón y regresa al estado basal nuevamente. Tomada de [16].*

Los fluoróforos tienen su máximo y mínimo de excitación en donde emiten la mayor y menor cantidad de fotones respectivamente. Esto es, después de la excitación, cuando los fluoróforos regresan a su estado basal, es más probable que la luz que emiten ocurra a una longitud de onda particular llamada el máximo de emisión. Este máximo de emisión tiene la misma intensidad que el máximo de excitación. Además, el máximo de emisión tiene una mayor longitud de onda y por tanto menor energía que el mínimo de excitación, lo cual es resultado de la vibración molecular que ocurre durante el estado excitado. Las moléculas también pueden ser excitadas dentro de un ancho de banda alrededor de este máximo, aunque el proceso resulta menos eficiente. La vibración molecular del fluoróforo provoca pérdida de energía en forma de calor. La diferencia de energía entre el máximo de excitación y el máximo de emisión se conoce como desplazamiento de Stokes (**Figura 6**). El desplazamiento de Stokes es característico de cada fluoróforo y la magnitud es determinada por la estructura electrónica de las moléculas fluorescentes.

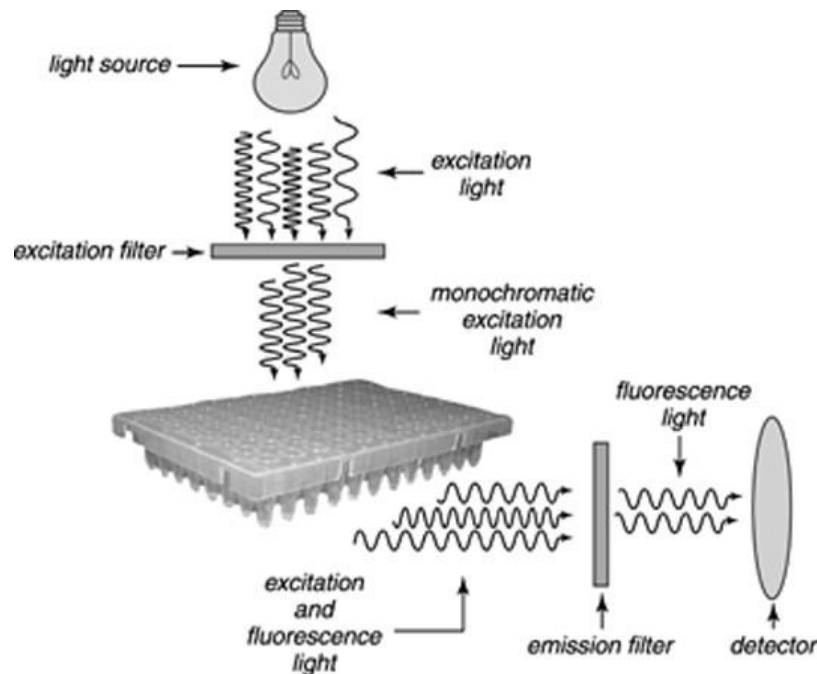


**Fig. 6:** Se ilustra una gráfica de fluorescencia con el máximo de excitación y el máximo de emisión separados por el desplazamiento de Stokes. Tomada de [18].

### 1.2.1 Medición de fluorescencia

Las partes básicas de un sistema de medición de fluorescencia son los filtros ópticos, una fuente de luz y un fotodetector. Los filtros de fluorescencia y la fuente de luz se eligen para que concuerden con las características espectrales de excitación y emisión de los fluoróforos. La fuente de luz emite fotones de excitación en todo el espectro (usualmente luz blanca) o en un rango (ancho de banda) y cuando esta luz encuentra un filtro de excitación, éste bloquea la mayoría del espectro y reduce el ancho de banda, pero la luz que pasa través de él hasta la muestra excita las moléculas de fluorescencia. La fluorescencia emitida por las moléculas viaja hacia el filtro de emisión, el cual deja pasar solamente la luz que emite el fluoróforo y bloquea el fondo (**Figura 7**).





**Fig. 7:** Construcción básica de un sistema de medición de fluorescencia. Luz a de diferentes longitudes de onda se encuentra con el filtro de excitación. Sólo una parte del espectro pasa a través del filtro y excita a las moléculas en la muestra. La muestra emite luz en todas direcciones, y la que se encuentra en dirección al detector pasa a través de un filtro que bloquea la luz de fondo. Tomada de [19].

Para estos sistemas, es importante conocer que la eficiencia de convertir la luz excitante en fluorescencia es baja y sólo uno de muchos fotones excitadores es convertido en un fotón de mayor longitud de onda y puede ser detectado. Además, la fluorescencia es emitida por la muestra en todas direcciones y sólo una fracción puede ser detectada debido a la baja cantidad de luz. Esto significa que la fluorescencia es débil en comparación con la luz de excitación, por lo que es importante separarla eficientemente para poder detectarla. Por esta razón, se usan filtros ópticos de alta calidad que seleccionan exclusivamente la longitud de onda que pasa por ellos.

### 1.2.2 Filtros ópticos

El objetivo de los filtros ópticos es poseer un rango estrecho de longitudes de onda que pasen a través de ellos (pasa-banda), y transmitir la mayor cantidad de luz dentro de esta banda para hacer el sistema lo más sensible posible.

Los filtros ópticos abarcan desde los filtros de vidrio absorbentes de color hasta los filtros de interferencia hechos por deposición de película delgada sobre un sustrato de vidrio que permiten pasar selectivamente la luz de ciertas longitudes de onda. La principal diferencia radica en que los filtros de película delgada responden diferente a la polarización, esto es que están diseñados para ángulos de incidencia particulares, normalmente entre 0° y 45°. Esta propiedad permite cambiar la longitud de onda que deja pasar selectivamente el filtro al rotarlo alrededor de los ejes perpendiculares a la dirección de propagación de la luz [20]. En la **Tabla 1** se observa una comparación entre los filtros de vidrio y los filtros de película delgada.

<b>Tipo de filtro</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Vidrio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativamente barato</li> <li>- Vida larga y estabilidad</li> <li>- No dependen del ángulo de incidencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Número limitado de filtros</li> <li>- Los pasabanda tienen poca transmitancia</li> <li>- Alta autofluorescencia</li> </ul>
<b>Película delgada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flexibilidad para construir cualquier tipo de filtro</li> <li>- Los pasabanda tienen alta transmitancia y pendiente pronunciada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta reflectancia para ciertas longitudes de onda</li> <li>- Sensibles al ángulo de incidencia</li> <li>- Costosos</li> </ul>

**Tabla 1:** *Comparación entre las dos principales clases de filtros para microscopía de fluorescencia.*

Los filtros poliméricos y de papel se incluyen en la categoría de filtros de vidrio ya que comparten propiedades similares, aunque presentan menos autofluorescencia que sus contrapartes de vidrio. En este proyecto se usó un filtro polimérico debido a su disponibilidad, bajo precio y adaptabilidad mecánica.

### **1.2.3 Fuentes de iluminación LED**

Los LEDs son semiconductores dopados de manera que se produzca una unión p-n entre ellos. Al momento de pasar una corriente eléctrica a través de esta unión, se produce un fenómeno de emisión de fotones, cuya longitud de onda depende del material semiconductor del que esté compuesta.

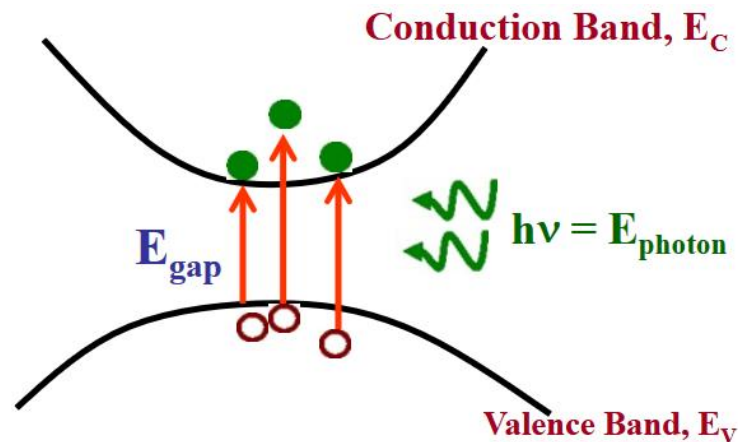
En el campo de la biología, los LEDs comenzaron a usarse en los 90's como fuente de excitación para visualizar fluorescencia [21]. Sin embargo, su uso había sido limitado por la baja eficiencia de conversión de luz y su disponibilidad comercial. Incluso en la actualidad la eficiencia de los LEDs para convertir energía eléctrica en iluminación es de 25 a 35 %, siendo un problema el calor que generan. Aunque, a pesar de su pobre cantidad de iluminación, en comparación con otras fuentes de iluminación en microscopía de fluorescencia como los láseres o las lámparas de arco, los LEDs se calientan menos, además de que requieren menos instrumentación para controlarlos, menos energía, tienen una vida larga y son más compactos. Estas características hacen a los LEDs monocromáticos ideales para la instrumentación de bajo costo y portable donde pueden combinarse con filtros pasa-banda para únicamente permitir el paso de la luz emitida por los fluoróforos. Además, las tendencias actuales en el desarrollo de LEDs apuntan a la expectativa de incrementar significativamente su iluminación en todas las longitudes de onda en los próximos años.

En resumen, en los sistemas de medición de fluorescencia es importante conocer que la luz fluorescente tiene mucha menor intensidad que la luz de excitación. Es igualmente importante conocer las longitudes de onda de excitación y emisión de las moléculas fluorescentes para poder encontrar fuente que produzca la mayor cantidad de luz de excitación y los filtros necesarios para bloquear la luz no deseada que reduzca la calidad de la imagen.

#### **1.2.4 Sensores de imagen**

Los sensores de imagen convierten radiación electromagnética en imágenes, abarcando prácticamente todo el espectro de luz visible. En el rango visible se usan típicamente dos grandes tecnologías: CCD y CMOS. Ambas, se basan en la detección de fotones en silicio, haciendo uso del efecto fotoeléctrico. El principio del efecto fotoeléctrico es registrar las cargas libres producidas cuando un semiconductor, como silicio, es iluminado con fotones de energía  $hf$  [22]. En un semiconductor, hay pocos electrones libres, por lo que la banda de valencia está casi llena en su totalidad y la banda de conducción está vacía. Estas dos bandas se encuentran separadas por una

brecha de energía  $E_g$  (1.12 eV para el silicio). Para generar una señal eléctrica, los electrones deben ser excitados desde la banda de valencia hacia la banda de conducción. Por tanto, cuando la energía de un fotón es mayor que la diferencia de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción, el átomo de silicio puede crear un par electrón-hueco y producir una corriente eléctrica [23] (**Figura 8**).



**Fig. 8:** Efecto fotoeléctrico en el silicio. Tomada de [24].

Los sensores de imagen se han convertido en una gran industria debido a la alta demanda de diferentes aplicaciones como cámaras digitales, computadoras personales, seguridad automotriz y sistemas de seguridad. La tecnología CMOS fue inventada en los años 60 y se caracteriza sobre la CCD, por poseer menor consumo de energía y una mayor integración para componentes pequeños, debido a su proceso de manufactura por litografía. Gracias a estas características, se ha posicionado como la tecnología favorita para implementarse en dispositivos tan masivamente consumidos como los celulares. En la tecnología CCD, el proceso de incidencia de fotones y conversión electrón-hueco, es la misma. Sin embargo, en los sensores CCD la carga es convertida en voltaje en el nodo de salida del pixel, mientras que en los sensores CMOS, la carga es convertida directamente en el pixel. Esto es un parámetro de arquitectura que reduce el costo de la circuitería requerida, así como la complejidad de la cámara, el tamaño del sensor, el consumo de energía y la velocidad de procesamiento. Sin embargo, no siempre es clara la elección de una tecnología sobre otra y se tiene que hacer una evaluación de la mejor tecnología de acuerdo a las necesidades. En este proyecto se usó un sensor CMOS debido a que el objetivo era

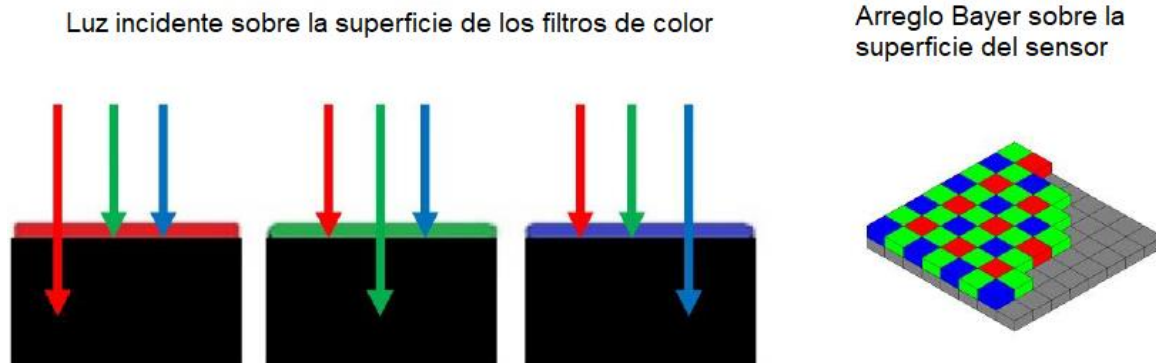
desarrollar un instrumento de bajo costo, portable y para esto que aprovechara la ubicuidad de dispositivos como los celulares que usan cámaras CMOS. En la **Tabla 2** se justifica la elección de este tipo de sensor.

Posibilidades de integración de funciones de imagen (ej: tiempo de exposición, procesamiento de color, medida del tiempo)	Mayor integración en CMOS que en CCD [25]
Consumo de energía	Menor en CMOS que en CCD [26]
Resolución	Comparable [26]
Costo	Menor en CMOS que en CCD [27]
Tamaño	Menor en CMOS [25]

**Tabla 2:** *Tabla comparativa entre sensores CCD y CMOS con parámetros importantes para esta tesis.*

### 1.2.2 Imágenes a color

Capturar imágenes a color requiere filtros de longitudes de onda ya que los pixeles sólo detectan la brillantez o intensidad de los fotones, pero no como tal su color. Se puede decir que los pixeles registran valores de grises desde un rango de blanco puro a negro puro. Para detectar color, típicamente se usan los filtros de color, de los cuales el más común es el arreglo de filtros Bayer. El sistema de filtros Bayer usa filtros de tres colores: rojo, verde y azul (conocidos como colores primarios), y cada pixel en el sensor de imagen se encuentra cubierto por un filtro rojo, verde o azul, formando el arreglo Bayer [28] (**Figura 9**). El color de los filtros representa la longitud de onda que dejan pasar hacia el fotodiodo sensible a luz. Por ejemplo, si un pixel cubierto con un filtro rojo es expuesto a luz roja, los fotones inciden en el fotodiodo y la señal que se genera en la posición de ese fotodiodo será representada en la imagen como una magnitud de color rojo por medio de un algoritmo de interpolación cromática.



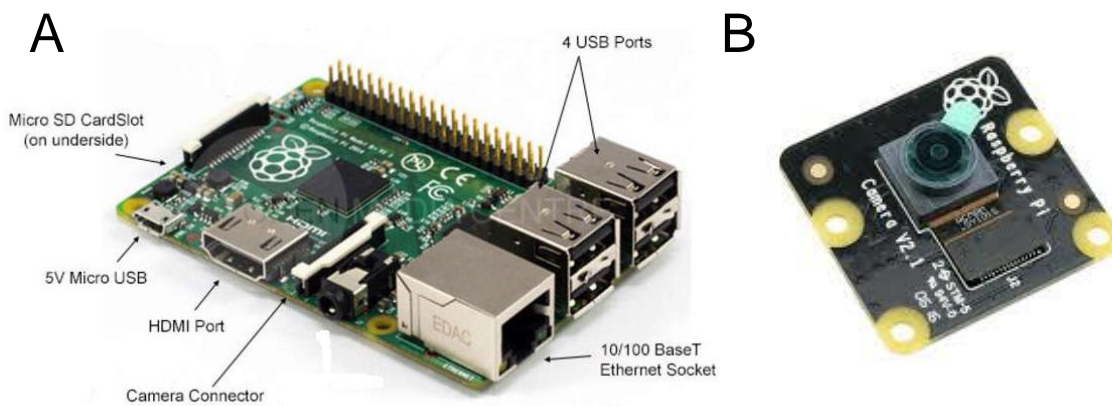
**Fig. 9:** Se ilustra la arquitectura del arreglo de filtros Bayer y el paso selectivo de luz a través de éstos. Tomada de [29].

### ***Módulo de la cámara en Raspberry Pi***

Un sensor de imagen arroja datos que necesitan ser procesados para permitir su apreciación. Para cumplir este propósito, actualmente, existen varias tarjetas computacionales disponibles en el mercado. Una de ellas es la Raspberry Pi, desarrollada en el Reino Unido, por la Fundación Raspberry Pi. La Raspberry Pi es un ordenador en una sola placa del tamaño de una tarjeta de crédito, con microprocesador, memoria SD, timers, cámara, HDMI, entradas/salidas, WiFi, etc (**Figura 10**). En este proyecto, se utilizó una Raspberry Pi 2 modelo B, versión 1.2 de 1 GB la cual tiene un módulo para cámara que puede ser usado para tomar imágenes de video de alta definición, así como fotografías estáticas. El módulo de la cámara se conecta a la Raspberry Pi por un cable flexible en el centro de la propia tarjeta. La razón de escoger este módulo es que posee un sensor CMOS (IMX179, sony) controlable con código abierto (open source), fácil para aprender a usarlo y que cuenta con características similares a las de otros sensores de imagen presentes en celulares (tamaño de pixel, campo de visión del sensor, resolución, etcétera), lo cual lo hace un módulo ideal para representar un modelo de instrumento compatible con celulares y por tanto más accesible y replicable.

El módulo de la cámara usado fue el modelo Pi NoIR (sin filtro infrarrojo), lo cual significa que las imágenes pueden registrar ondas infrarrojas. NoIR otorga la habilidad

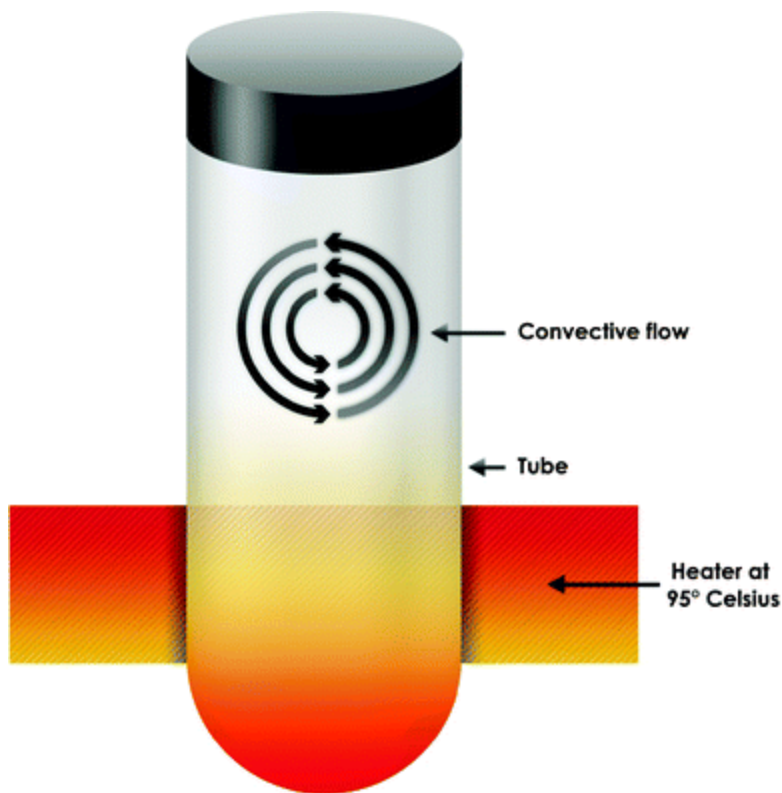
de obtener imágenes incluso en la oscuridad por lo que es la opción preferida para tomar imágenes con poca luz.



**Fig. 10:** A) *Raspberry Pi con sus puertos asociados; 4 puertos USB, 1 puerto ethernet, 1 puerto HDMI, una conexión para tarjeta SD, alimentación y conector para el módulo de la cámara.* B) *Módulo de la cámara NoIR versión 2.1.*

### 1.3 Termocicladores

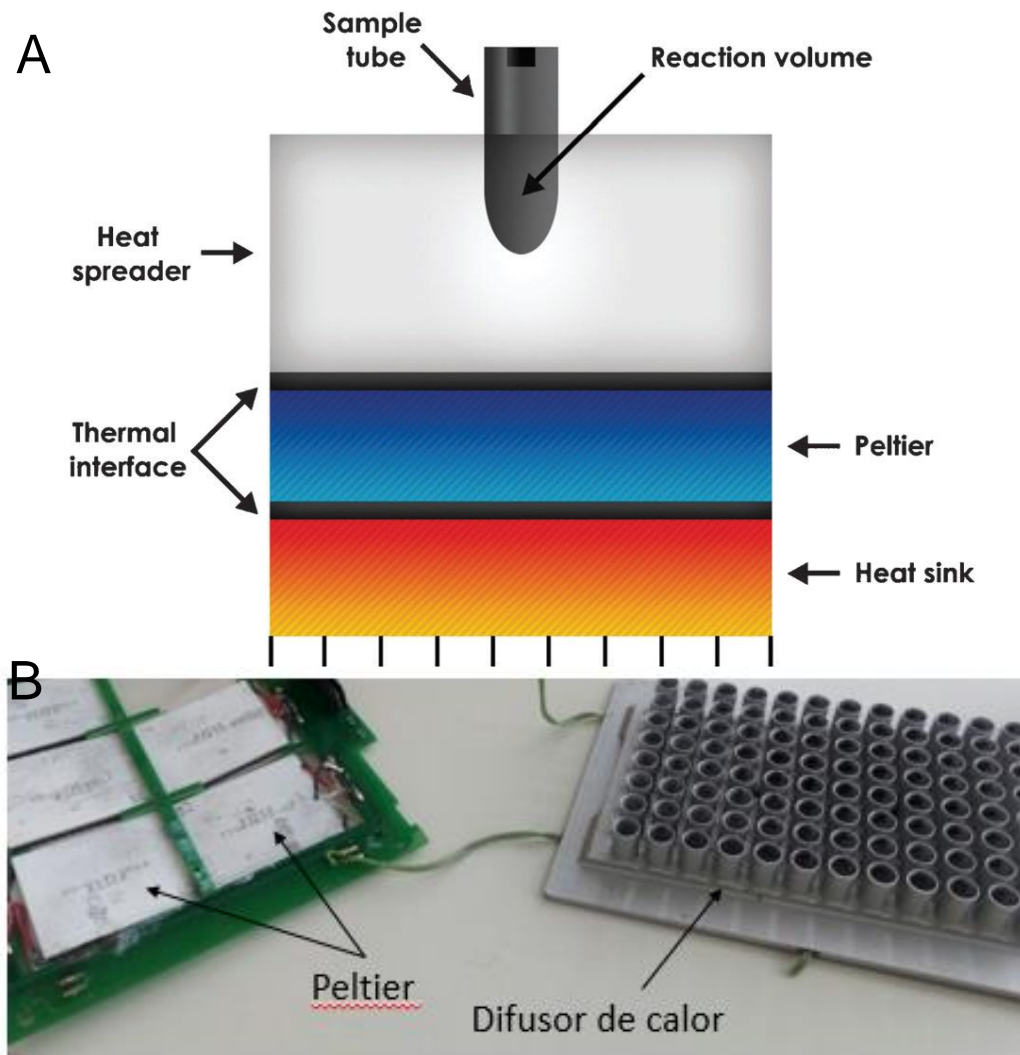
Debido a que la PCR requiere cambios de temperatura en una solución y la medición de fluorescencia emitida, la técnica se realiza en un instrumento con estas capacidades llamado termociclador. Existe una gran variedad de termocicladores y varían de acuerdo con su tamaño y forma, pero generalmente se dividen en dos tipos: convectivos y conductivos. Sin embargo, también han sido reportados muchos otros tipos como los termocicladores asistidos por microondas [30], y los infrarrojos [31] [32]. Los termocicladores convectivos operan con el principio de producir un gradiente térmico en un contenedor de reacción diseñado para que se produzca un flujo convectivo de moléculas, las cuales viajan por líneas de flujo a través de las temperaturas de desnaturalización, alineación y extensión (**Figura 11**). Estos instrumentos constan de una cámara de reacción, una carcasa (housing), un calentador, y un sistema de control [33].



**Fig. 11:** *Ejemplo de un termociclador convectivo donde se calienta un lado del recipiente de reacción lo cual crea un flujo convectivo de moléculas que pasan a través de diferentes temperaturas estacionarias. Tomada de [34].*

Por otro lado, los termocicladores conductivos se basan en la conducción de calor desde una placa caliente hacia el recipiente de reacción y el control de la temperatura por medio de sensores y algoritmos (**Figura 12**). La placa caliente puede ser de distintos tamaños y formas pudiendo ser desde un enfriador termoeléctrico hasta un calentador microfabricado.





**Fig. 12:** A) *Diagrama de bloques de un termociclador conductivo convencional. Tomada de [34].* B) *Fotografía de los módulos Peltier y el bloque difusor de calor donde se colocan los tubos de reacción.*

Estos instrumentos se han vuelto indispensables en laboratorios clínicos y de investigación debido a las aplicaciones que tiene la PCR en el diagnóstico y la prevención de enfermedades. Sin embargo, el costo de los termocicladores comerciales (\$ 2,000 – 20,000 USD) limita la inclusión de la PCR en la rutina práctica de muchos laboratorios, especialmente en países en vías de desarrollo. Incluso, los educadores se han visto obligados a compartir el equipo entre escuelas o manualmente introducir tubos de reacción decenas de veces en los baños de agua para controlar las temperaturas apropiadas como en el método original [35, 36]. Adicionalmente, estos

instrumentos, al estar diseñados para uso en el laboratorio, resultan ser voluminosos, pesados, requieren de personal entrenado para su operación y un ambiente controlado, además de volúmenes de muestra relativamente grandes. Esto representa poca portabilidad y un retraso considerable de tiempo entre la recolección de las muestras biológicas, el diagnóstico y la implementación de contramedidas, haciéndolos poco prácticos para aplicaciones médicas en el punto de atención.

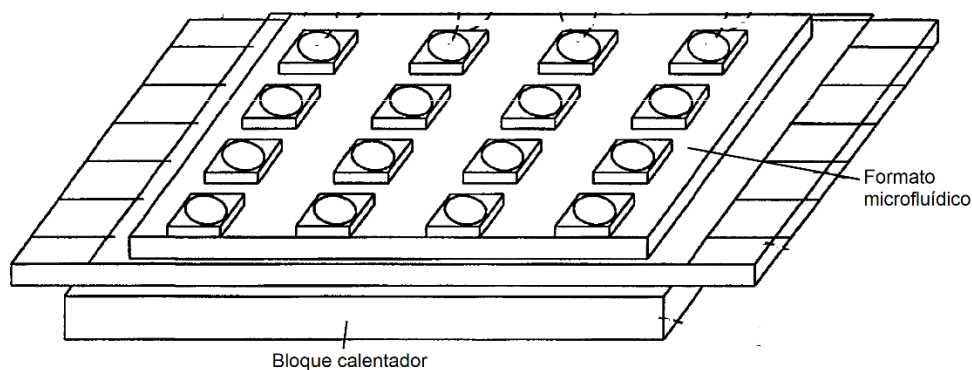
### **1.3.1 Tecnología microfluídica para PCR**

Los microsistemas de análisis total ( $\mu$ TAS), también conocidos como dispositivos *lab on a chip*, integran procesos analíticos completos en plataformas microfluídicas de tamaños desde discos compactos hasta chips electrónicos. En las últimas décadas han emergido estos formatos microfluídicos buscando integrar múltiples componentes para realizar procesos complejos como la PCR y, han empezado a reemplazar las placas de pozos donde convencionalmente se lleva a cabo la PCR por microdispositivos automáticos que contienen volúmenes más pequeños y permiten alcanzar tiempos de calentamiento y enfriamiento más rápidos [37, 38].

Los requerimientos que deben cubrirse para las aplicaciones de PCR en el punto de atención son la miniaturización, bajo costo y facilidad de uso. Para lograr que los termocicladores cumplan con estas características, en las últimas dos décadas se han empleado las tecnologías microfluídicas debido a: (i) su capacidad para manejar volúmenes muy pequeños (en el orden de nL), (ii) la automatización que proveen, (iii) su simplicidad, (iv) portabilidad y (v) tiempos cortos de análisis debido a la transferencia de calor más rápida que se logra en las cantidades pequeñas de masa que manejan. El microdispositivo ideal debería integrar el proceso en pequeños volúmenes, tiempos cortos, con bajo costo, preparación de la muestra y detección, todo de manera paralela en muchas reacciones. Para esto es necesario conjuntar elementos biológicos, ópticos y electrónicos en una sola plataforma para reducir la complejidad del laboratorio a un solo sistema. Según lo revisado en la literatura, no existe tal plataforma aún.

En el ámbito comercial, en los últimos años han salido al mercado termocicladores con formatos microfluídicos. Inicialmente, el método más sencillo para llevar a cabo

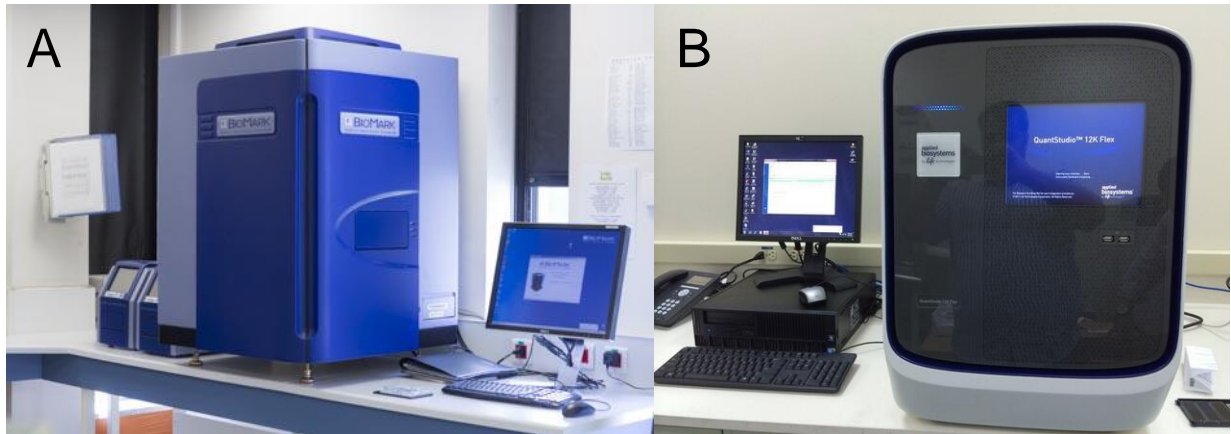
reacciones PCR en un chip microfluídico fue adaptar el clásico termociclador con elementos Peltier para calentar el microdispositivo (**Figura 13**) y de esta manera usarlo como si fuera una placa de pozos miniaturizada y así reducir la cantidad de reactivos necesaria y la masa térmica del sistema.



**Fig. 13:** Esquema de un calentador para formatos microfluídicos. Tomada de [39].

Este principio trajo a termocicladores como el sistema Biomark HD de la compañía Fluidigm® (**Figura 14A**), el cual usa una serie de circuitos microfluídicos integrados para llenar miles de compartimentos de reacción (9180, cada uno con volumen de 6 nL) y llevar a cabo transcripción reversa y PCR de células individuales y de esta manera, sirve como herramienta para detectar mutaciones en el cáncer [40]. También encontramos el QuantStudio® de Thermo Fisher (**Figura 14B**) el cual usa un arreglo de cámaras de reacción con volúmenes de ~800 pL calentadas por el sistema Peltier. A diferencia del Biomark HD, el cual tiene un sistema de medición de fluorescencia integrado, el QuantStudio® analiza las amplificaciones en un lector por separado. Ambos instrumentos son ejemplo de termocicladores para dispositivos microfluídicos que muestran las ventajas de automatización, pequeños volúmenes y paralelización requeridas para la PCR, aunque, también sufren las limitantes de su poca portabilidad por su peso y dimensiones, además de los requerimientos de energía necesarios para que funcionen. En el ámbito comercial, lo más cercano a una versión POC es el Cobas® Liat de Roche Diagnostics que usa tubos capilares con reactivos pre-llenados para realizar la extracción de la muestra y la amplificación. Este instrumento analiza la fluorescencia en el capilar y puede detectar enfermedades infecciosas como la influenza y el ADN de estreptococo en 20 minutos. Sin embargo, no es completamente

portable debido a la energía que requiere, además de que no tiene capacidad para diferentes muestras. En la **Tabla 3**, se muestran las características de termocicladores comerciales con formatos microfluídicos.



**Fig. 14:** A) Termociclador Biomark de Fluidigm®. B) Termociclador QuantStudio®.

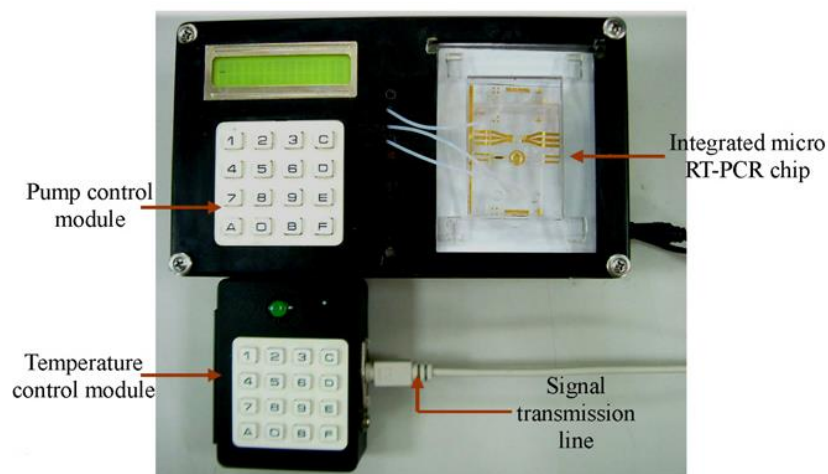
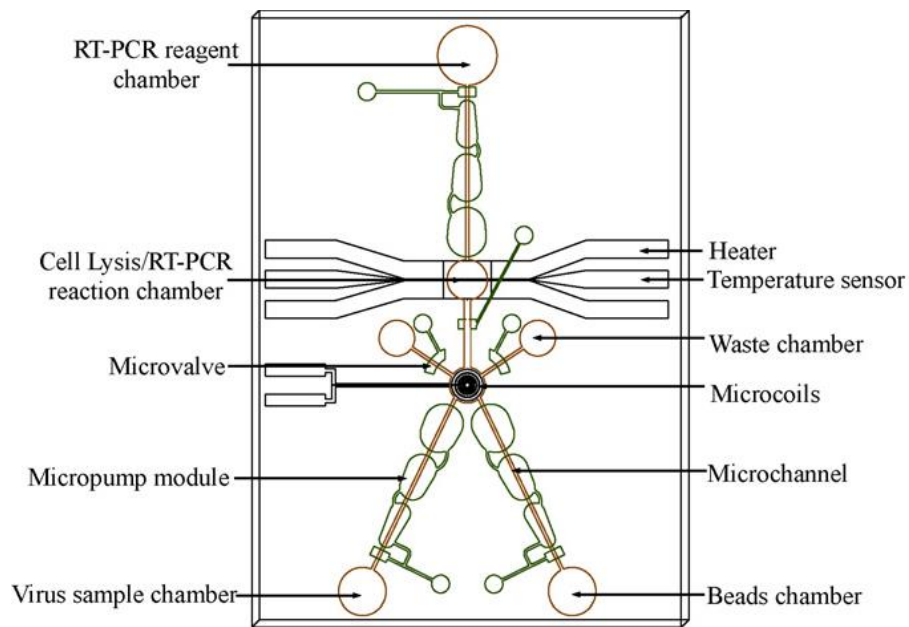
<b>Instrumento</b>	<b>No. de muestras</b>	<b>Número de canales de fluorescencia</b>	<b>Peso y medidas</b>	<b>Fuente de energía</b>	<b>Capacidad para PCR digital</b>	<b>Costo \$USD</b>
<b>Biomark de Fluidigm</b>	48	5	208 Kg 147x102x102 cm	Red externa 110 / 240 V	✓	100,000
<b>RainDrop de RainDance</b>	8	2	37x26x43 cm	Red externa 110 / 240 V	✓	125,000
<b>QuantStudio de Thermo Fischer</b>	10	4	2.4 Kg 21x23.3x13.5 cm	Red externa 110 / 240 V	✓	30,000
<b>Cobas® liat</b>	1	1	17x12x25	Red externa 110 / 240 V	X	25,000

**Tabla 3:** Comparación entre algunos termocicladores representativos para dispositivos microfluídicos. La PCR digital se refiere al método más cuantitativo de la PCR que existe actualmente.

Sumado a las limitantes ya mencionadas sobre el tamaño, la energía que requieren y el personal especializado que requieren, el uso de este tipo de instrumentos no ha sido ampliamente adoptado también en parte a su alto costo. De manera que para poder alcanzar un impacto significativo en el cuidado de la salud o en aplicaciones en el punto de atención en países en vías de desarrollo, es necesario reducir el costo y tamaño de los termocicladores para dispositivos microfluídicos manteniendo su sofisticación.

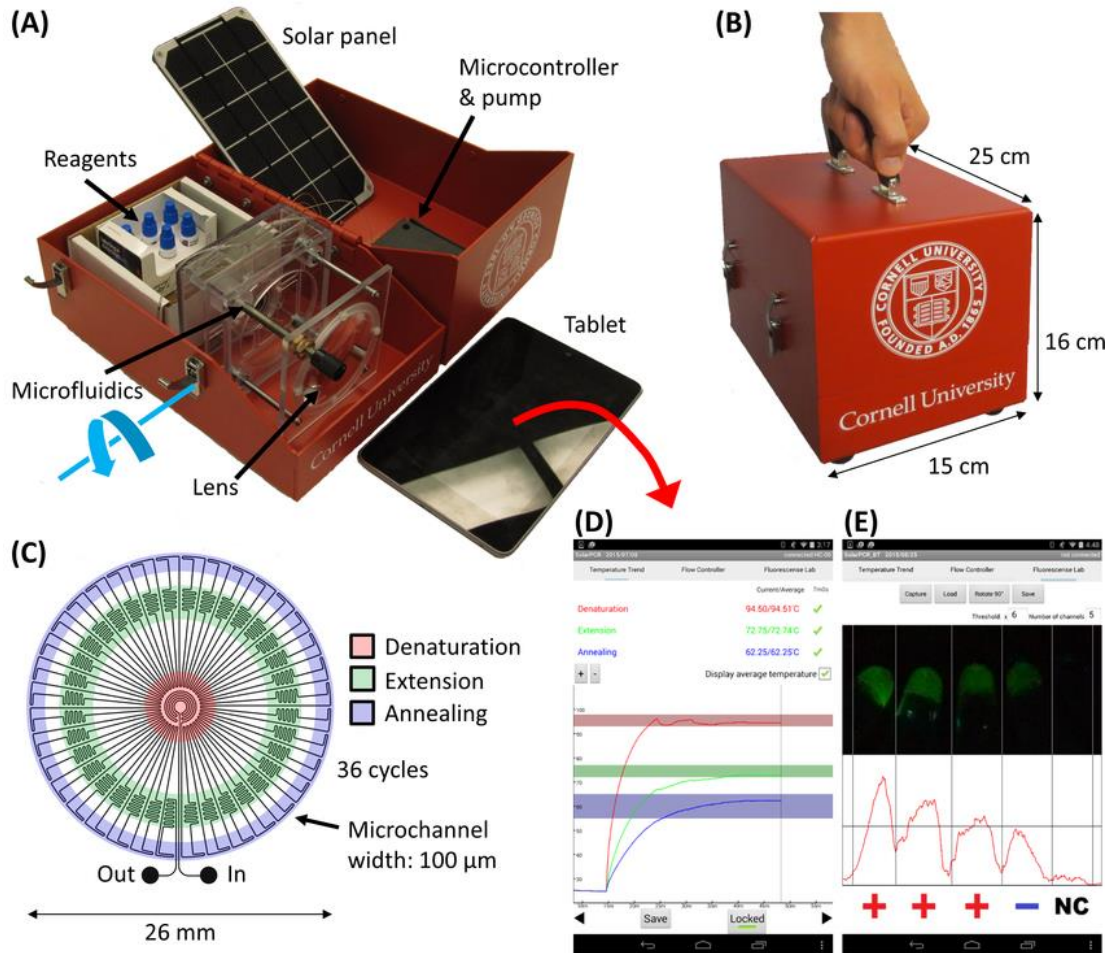
### 1.3.2 Termocicladores para dispositivos microfluídicos

Tratando de superar estas limitantes, ha surgido un campo de investigación para desarrollar termocicladores portables con dispositivos microfluídicos. Uno de ellos es el reportado por Lien et al. [41] quienes desarrollaron un dispositivo microfluídico que integraba bombas, válvulas, microcalentadores y sensores para poder lisar células, capturar virus, purificarlos y realizar PCR en su chip, todo controlado por equipo electrónico portable, reduciendo la cantidad de instrumentos externos y procesamiento manual para obtener amplificaciones de RNA (**Figura 15**).



**Fig. 15:** A) Ilustración del chip microfluídico para procesar muestras biológicas, procesarlas y realizar PCR. B) Fotografía del sistema electrónico de control y transmisión de datos. Tomada de [41].

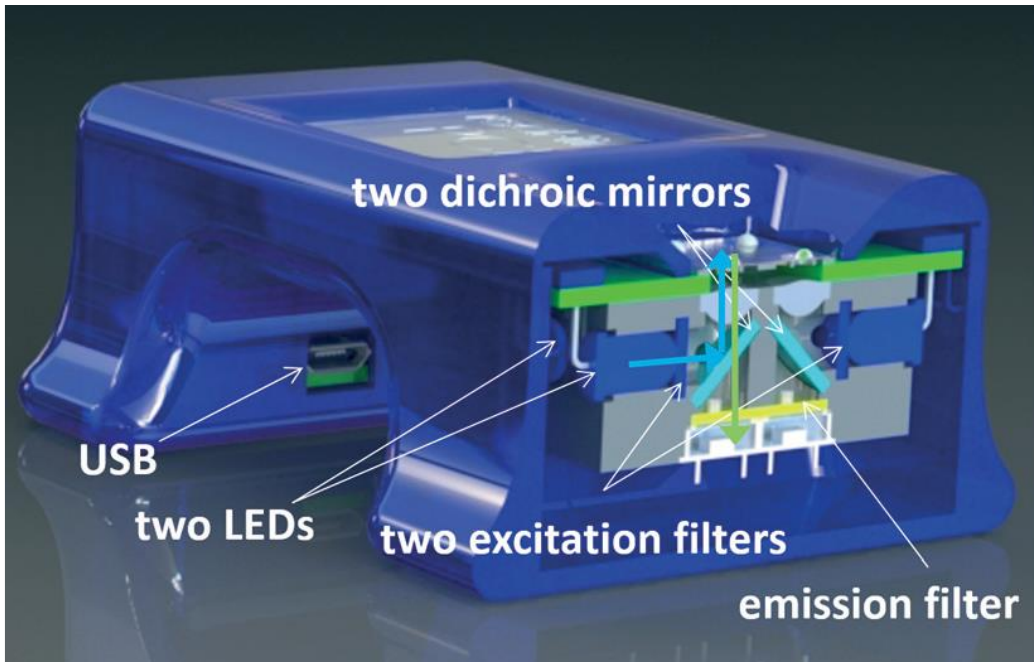
A pesar de las capacidades del chip que desarrollaron, su sistema no era completamente portable ya que no necesitaba de conexión por medio de cables para la transmisión de datos y no realizaba la medición de los productos amplificados directamente en el sitio. En otro proyecto, Jiang et al. [42] desarrollaron un instrumento para realizar PCR usando un lente para enfocar la energía calorífica del sol y formar regiones con diferente temperatura en un disco que contenía canales microfluídicos (**Figura 16**). La reacción de PCR se llevaba a cabo al fluir la solución con la mezcla maestra de PCR a través de estas regiones con las temperaturas de desnaturalización, alineación y extensión, y controlar el tiempo de residencia de la solución en cada temperatura por medio de la velocidad del flujo para llevar a cabo la reacción. La ventaja de este instrumento es que no requiere energía eléctrica para el calentamiento del disco y con una batería fue posible alimentar el circuito electrónico de control de flujo y medición de temperatura. A pesar de eso, el sistema no es adecuado para aplicaciones POC ya que necesita detección post-PCR fuera del chip. Además, su funcionamiento necesita suficiente luz ambiental, una condición que puede limitar su uso en lugares con nubosidad. Por último este tipo de diseños de dominio espacial de la temperatura, donde las muestras son fluidas a través de un solo canal, son propensas a contaminación debido a moléculas adsorbidas en la superficie de los canales [43].



**Fig. 16:** El sistema portable para PCR energizado por energía solar usando un disco con canales microfluídicos y un flujo radial. Un módulo electrónico wireless transfiere datos desde una tablet para controlar el flujo, la temperatura y analizar las reacciones Tomada de [42].

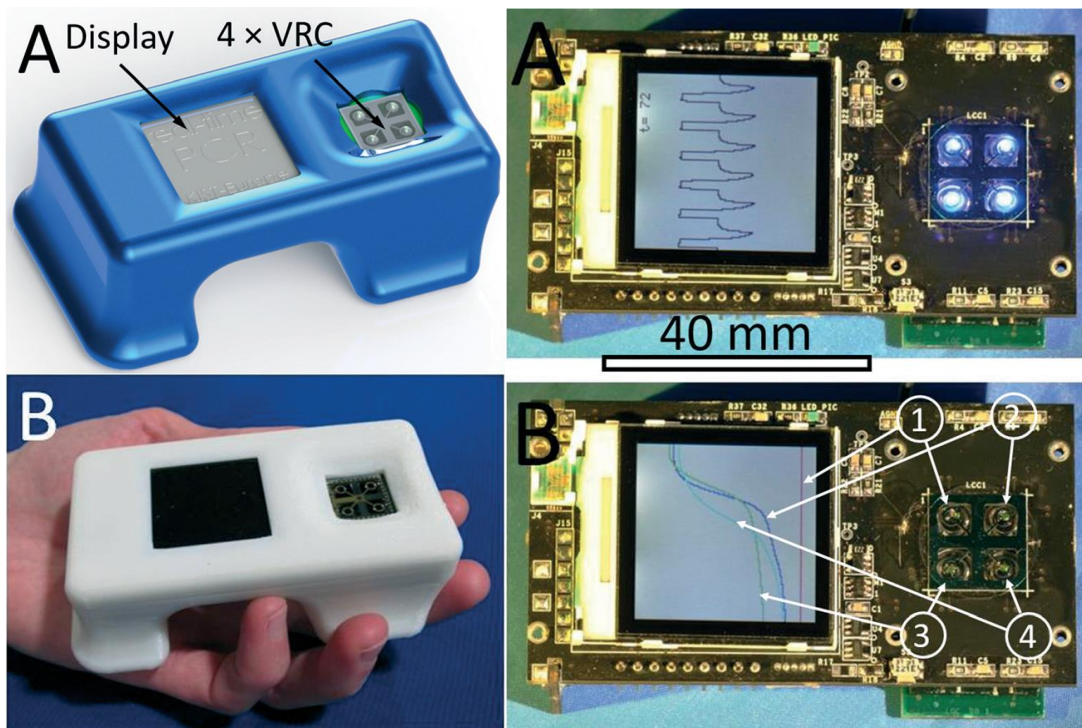
Recientemente un sistema con mayor capacidad se publicó en un artículo donde Ahrberg et al. [44] diseñaron y caracterizaron un dispositivo portable para realizar PCR en un microchip de silicio que funciona como calentador y donde se colocan 4 gotas ( $0.5 \mu\text{L}$ ) con la solución maestra de PCR cubiertas de aceite mineral ( $1.5 \mu\text{L}$ ) para evitar la evaporación y medir en tiempo real la fluorescencia emitida. Este instrumento fue diseñado con un sistema óptico de excitación y detección de fluorescencia basado en LEDs ultrabrillantes de potencia, espejos dicróicos y fotodiodos convencionales para medir la intensidad de fluorescencia de cada gota (**Figura 17**).





**Fig. 17:** Esquema del instrumento donde se muestra la configuración óptica de su sistema de medición de fluorescencia. Las flechas azules muestran la luz de los LEDs y la flecha verde muestra el camino óptico de la luz de fluorescencia emitida por la muestra para ser detectada en el fotodiodo (tomada de [44]).

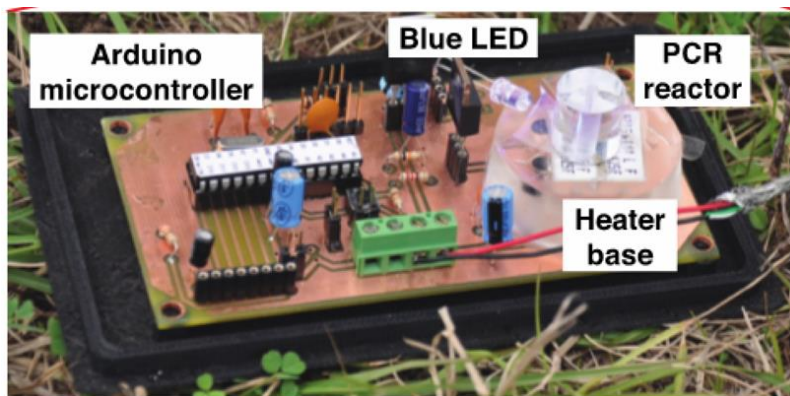
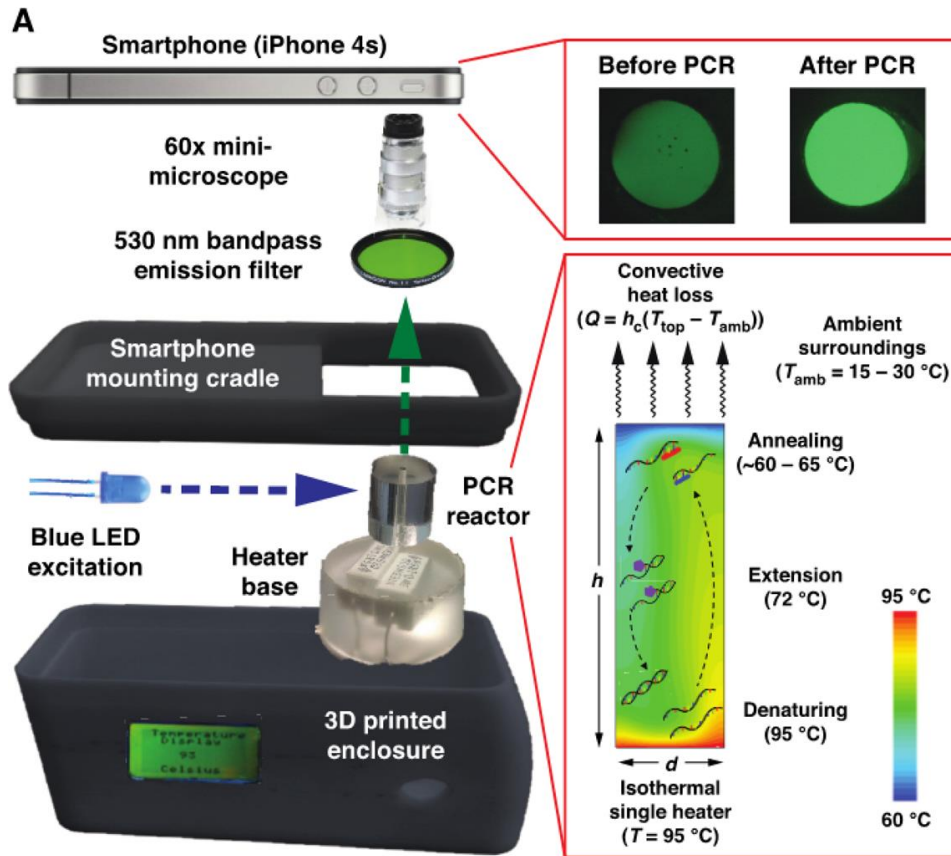
Este sistema tiene las ventajas de ser pequeño e incluso sostenible en una mano (**Figura 18B**), ligero, fácil de usar, e integrado, lo que le confiere portabilidad, además de que permite un análisis en tiempo real de hasta 4 muestras (**Figura 18A**) por lo cual puede incluir controles negativos y positivos (**Figura 18B**). Sin embargo, el sistema que caracterizaron presentaba una importante limitante en el chip microfabricado de silicio el cual tenía una distribución de temperatura heterogénea en su superficie debido al estrés mecánico propio de su método de fabricación (soldadura). Esta desventaja en su diseño causaba que los resultados de la PCR dependieran del lugar donde pusieran la gota. Esta variabilidad afectó la eficiencia de las amplificaciones y los resultados por lo que este instrumento no es trasladable a aplicaciones POC donde se requiere comparar los resultados de una muestra contra la otra. Aunado a esto, el uso de las técnicas de fabricación que utilizaron como micromaquinado y escarbado húmedo lo hace poco escalable y por tanto de difícil acceso también para aplicaciones POC.



**Fig. 18:** Esquema y fotografía del sistema de PCR sostenible en una mano (VRC se refiere a las gotas con la solución para amplificar el ADN). A la derecha, el dispositivo ensamblado y midiendo en tiempo real la temperatura y la fluorescencia durante cada ciclo. Tomada de [44].

En esa dirección, Priye et al. demostraron un termociclador basado en el flujo por convección de los reactivos en un pequeño reactor [45]. Su diseño, en base al fenómeno de convección por gradiente de temperatura en un fluido, permitió facilitar la instrumentación necesaria para calentarlo, ya que una resistencia cerámica de potencia con coste prácticamente cero funcionó como calentador para el fondo del reactor (**Figura 19A**). Su sistema también integró un LED ultrabrillante para excitar a las moléculas fluorescentes y por medio de una cámara CMOS de celular con un filtro de emisión fueron capaces de adquirir imágenes de fluorescencia y analizarlas en tiempo real para monitorear el progreso de la reacción en cada ciclo. Con este diseño, la electrónica para energizar, controlar y comunicar el termociclador fue muy sencilla y fácil de adquirir. Además la construcción del sistema en su totalidad fue sencilla, lo que dota a este instrumento de repetitividad, ligereza y accesibilidad para fabricarlo y adquirirlo (**Figura 19B**). A pesar de esto, una evidente limitante es que depende del

diseño específico del reactor para controlar el flujo convectivo. Esto prohíbe la integración de otros procesos microfluídicos como pre-procesamiento de la muestra, paralelización y compartimentalización en volúmenes más pequeños.



**Fig. 19:** Termociclador convectivo que usa un solo calentador y detecta la fluorescencia con una cámara CMOS ordinaria, un LED y un filtro de emisión. El instrumento fue hecho con componentes electrónicos baratos y rápidamente accesibles. Tomada de [45].

## 1.4 Revolución Open-Source

El término open-source ha existido en el campo del software por décadas, y se refiere a la libertad para distribuir y modificar códigos de software. Sin embargo, el concepto para el hardware open-source ha surgido recientemente en busca de hacer público el diseño de algún instrumento para que cualquier persona pueda estudiar, modificar, distribuir, hacer y vender el diseño o el hardware basado en el diseño. Particularmente, el hardware open-source ha sido aplicado al campo de la ciencia en búsqueda de reducir barreras entre creadores y usuarios de herramientas científicas para apoyar la búsqueda y crecimiento del conocimiento [46-48].

Específicamente para laboratorios de diagnóstico y de investigación, donde se requieren una serie de equipos especializados, los instrumentos open-source son una opción para reducir la barrera de la inversión monetaria y motivar a nuevos laboratorios a entrar en el campo de la biotecnología y la biología molecular.

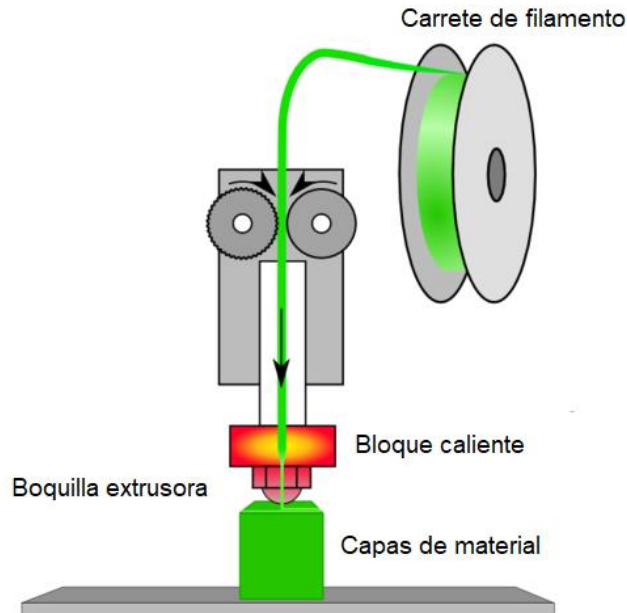
En la actualidad existen diferentes propuestas basadas en el desarrollo de sistemas open-source para laboratorios de biotecnología. Las más populares de estas propuestas están orientadas al desarrollo de equipos no tan complejos y costosos [49, 50]. Estas soluciones involucran el uso de la impresión en 3D que consiste en una técnica de manufactura aditiva para la fabricación de estructuras.

Debido al alto costo y requerimientos para realizar la técnica de PCR, han surgido propuestas open-source, entre ellos OpenPCR (\$600 USD), LavaAmp (\$200 USD) y Coffe Cup PCR (\$350 USD). Dichas propuestas son una opción más accesible que los termocicladores convencionales, pero aún no son comúnmente utilizadas para fines de diagnóstico médico ni son portables. A pesar de eso, la manufactura aditiva ha incrementado su popularidad en años recientes y no sería una sorpresa que estos instrumentos sean utilizados rutinariamente por científicos, educadores y profesionales de la salud [51].

### 1.4.1 Manufactura aditiva

Anteriormente, la impresión en 3D estaba confinada a industrias, instituciones de investigación y profesionales del diseño. Sin embargo, recientemente el mercado de las impresoras al nivel de los consumidores en masa ha crecido considerablemente con la ayuda de una fuerte comunidad de open-source [52]. Un prominente ejemplo es la marca Makerbot (adquirida por Stratasys), la cual surgió de un proyecto open-source conocido como RepRap, y se enfoca en producir impresoras de bajo costo [53].

La capacidad de convertir un modelo virtual computarizado en existencia con relativa velocidad y facilidad es lo que la ha convertido en un fenómeno revolucionario. Existen una gran variedad de técnicas de manufactura aditiva, incluyendo estereolitografía, fabricación con filamento fundido, sinterización selectiva por láser e inyección de material, por nombrar algunos. Estas técnicas comparten la similitud de que son métodos basados en manufactura por capas, en la cual las partes tridimensionales pasan por la deposición secuencial de capas de material en 2 dimensiones (**Figura 20**). Esas capas son literalmente secciones transversales de la parte final y, conforme las capas son delgadas, la impresión en 3D será una representación más fiel del modelo original de CAD. En específico, las impresoras MakerBot (\$2,499 USD) usan una boquilla de 0.4 mm con resolución de 100  $\mu\text{m}$  por capa. Esta impresora está optimizada para depositar capas de ácido poliláctico (PLA) y estireno de acrilonitril butadieno (ABS). Estos termoplásticos son fáciles de extruir y se encuentran disponibles en una gran variedad de colores, además de que son relativamente baratos.



**Fig. 20:** Representación del proceso de manufactura aditiva por capas. Se observa la estructura básica de un sistema de deposición de material en capas de 2 dimensiones. Tomada y adaptada de [54].

Existen numerosos beneficios de la impresión en 3D que la hacen una herramienta atractiva para la ingeniería. El enfoque basado en la manufactura de capas permite la creación de geometrías complejas que serían de otra manera imposible o muy difícil y tardadas de fabricar usando los enfoques de manufactura substractivos tradicionales. Además, la manufactura aditiva es un proceso de fabricación digital, lo que significa que partes muy personalizadas pueden ser fabricadas relativamente baratas, y en un ambiente altamente automatizado. Adicionalmente, la manufactura aditiva tiene la capacidad de prototipado rápido, lo cual quiere decir que los ingenieros pueden diseñar y probar rápidamente con gran velocidad y libertad. Finalmente, la manufactura aditiva tiene el potencial de permitir a cualquiera diseñar, construir y crear una gran variedad de herramientas con un solo instrumento que puede convertirse en una extensión de la imaginación.

## 1.5 Conclusión

En las secciones anteriores se han mencionado los avances recientes en termocicladores con dispositivos microfluídicos, los cuales han producido instrumentos integrados, pequeños, ligeros, accesibles, sensibles y rápidos. La mayoría de esos sistemas podrían ser utilizados para aplicaciones de diagnóstico y detección de patógenos a pesar de las limitantes con las que cuentan. Sin embargo, aunque la técnica de la PCR es ampliamente usada en las ciencias biológicas y que ha revolucionado la forma en la que se extrae información de muestras biológicas, todavía no se ha reportado un termociclador pequeño y portable que sea compatible con chips microfluídicos de diferentes diseños (**Tabla 4**).

## 1.6 Hipótesis

Para traer la técnica de qPCR en dispositivos microfluídicos a regiones de escasos recursos, incluyendo países en vías de desarrollo y escuelas, puede ser integrado un sistema que haga uso de las técnicas de manufactura orientadas a consumidores, como la impresión en 3D, con componentes electrónicos accesibles y de rápido acceso (estantería).

Instrumento	Detección integrada	No de reacciones	Peso y medidas	Fuente de energía	Precisión	Dispositivos microfluídicos	Electrónica de estantería	Fabricación y ensamblaje rápidos	Costo de materiales \$USD
Snodgrass et al.	X	1	15x16x25 cm	Batería	± 5°C	X	X	X	< 1,000
Ahrberg et al.	✓	4	10x6x33 cm	Batería	± 0.25°C	X	X	X	> 1,000
Priye et al.	✓	1	0.4 Kg 6x12x8 cm	Batería	± 2°C	X	✓	X	600
Ideal	✓	> 4	<1 Kg < 10x 10x10 cm	Batería	± 0.25°C	✓	✓	✓	Lo menor posible

**Tabla 4:** *Tabla comparativa de los termocicladores para dispositivos microfluídicos de mayor relevancia en la literatura (número de citas) y las características de un termociclador ideal.*



## **2. Objetivos**

### **2.1 General**

Diseñar y fabricar un dispositivo termociclador portable y de fabricación simple para la amplificación de cadenas de ácidos nucleicos en microdispositivos usando componentes electrónicos de estantería, plataformas open-source y técnicas de manufactura aditiva.

### **2.2 Específicos**

1. Diseñar, ensamblar y caracterizar un sistema para ciclar la temperatura en microdispositivos usando componentes electrónicos de estantería.
2. Adaptar un sistema óptico hecho a la medida e impreso en 3D para la medición de fluorescencia.
3. Evaluar el funcionamiento del sistema a través de experimentos de qPCR y comparar su rendimiento contra un instrumento comercial.

## 3. Materiales y métodos experimentales

### 3.1 Termociclador

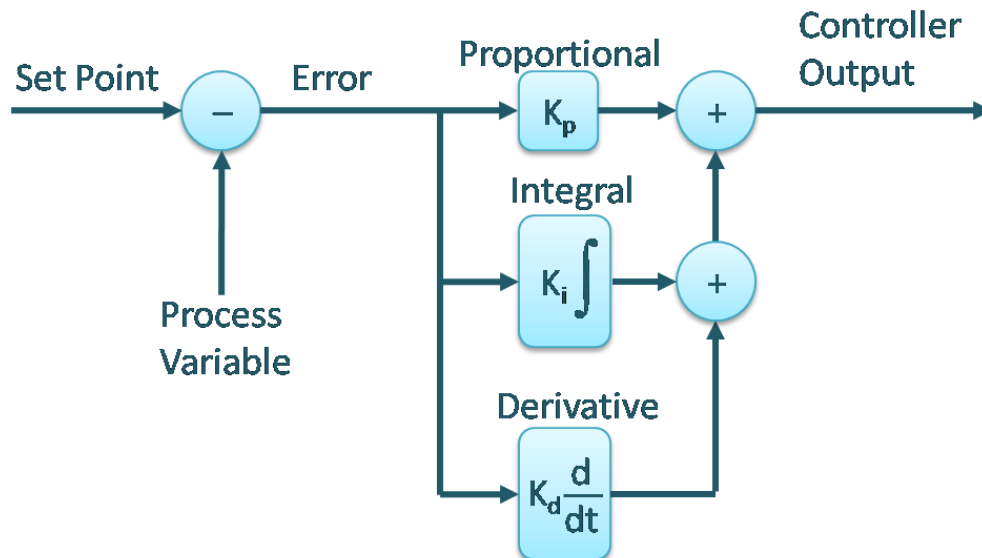
Para desarrollar el termociclador fue necesario encontrar un sistema de calentamiento, uno de enfriamiento, uno para obtener imágenes de fluorescencia y un sistema electrónico programable para controlar todo. Estos sistemas se conformaron, en esencia, con una resistencia de potencia, un ventilador de computadora, electrónica básica, una cámara CMOS, un LED azul, y chips de acrílico, todo dentro de una cubierta impresa en 3D y controlado por una computadora de tarjeta única Raspberry Pi modelo 2 versión 1.2. Para controlar el sistema se desarrolló una interfaz gráfica de usuario (GUI) en el lenguaje de programación Python 2.7 para monitorear y programar en tiempo real la temperatura en el chip, encender el LED para excitar a las moléculas fluorescentes y adquirir imágenes con la cámara.

Para evitar usar los elementos Peltier que requieren grandes corrientes para operar, se seleccionó como bloque central del termociclador una resistencia de potencia de 50  $\Omega$ , 5 W (280CR5-50-RC, Mouser, USA) como calentador y un ventilador de computadora (71P8674, Newark Element14) como enfriador. La resistencia funciona al convertir la corriente eléctrica en calor debido al efecto Joule, mientras que el ventilador permite enfriarla por convección. La boquilla del ventilador fue colocada directamente hacia la resistencia, la cual fue cubierta con cinta adhesiva de cobre conductivo (T118112, 3M) para homogeneizar la temperatura en su superficie. La temperatura fue monitoreada en tiempo real con un termistor de coeficiente de temperatura negativo ó NTC (B57540G0502+002, Epcos) conectado a un convertidor analógico-digital (ADC, LM324, Texas Instruments).

El dispositivo de acrílico se colocó sobre la resistencia con el termistor dentro de uno de sus pozos. La resistencia y el ventilador se controlan con un algoritmo que usa modulación de ancho de pulsos (PWM) integrado con un control derivativo integral proporcional (PID).

### 3.1.1 Algoritmo PID

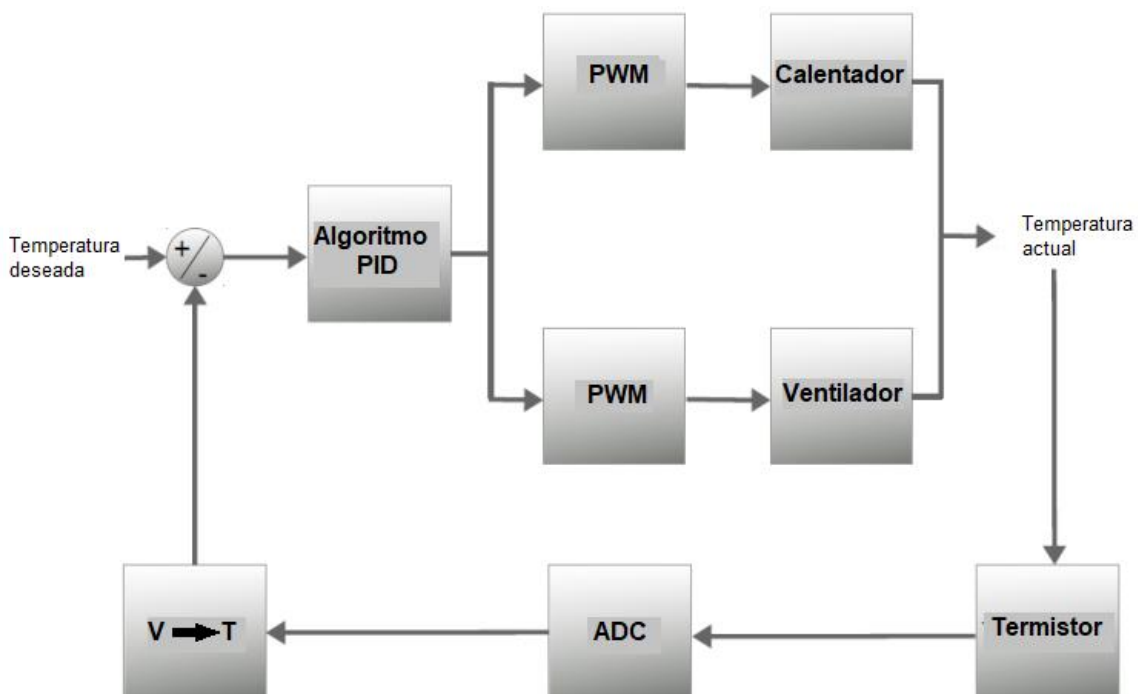
El control derivativo integral proporcional (PID) es un mecanismo de control por retroalimentación donde se calcula el error entre un valor medido en el sistema y su valor deseado (error). El algoritmo PID, como se observa en la **Figura 21**, consiste en la suma de 3 parámetros: el proporcional, el integral y el derivativo. Estos 3 parámetros se obtienen mediante operaciones de multiplicación para el valor proporcional, integración para el valor integral y derivación para el valor derivativo donde cada operación contiene una constante que permanece a través de los ciclos y cuyo valor óptimo depende del sistema PID.



**Fig. 21:** Esquema del controlador PID en un lazo de retroalimentación donde se calcula el error y se calculan los valores de cada acción para controlar el sistema. Los valores usados en este termociclador fueron  $K_p=1$ ,  $K_i=0.285$  y  $K_d=0.383$ . Figura tomada de [55].

Para decidir si la resistencia se calienta o no en el sistema aquí desarrollado, se envía una señal PWM (salida analógica del microcontrolador). La señal PWM toma un valor entre 0 y 255 (8 bits) de acuerdo a la salida del algoritmo de control PID en base a la retroalimentación del sensor (**Figura 22**). Si la temperatura que se está midiendo es mucho menor que el punto deseado, el algoritmo PID enviará un valor de salida de 255

en el PWM para que la mayor corriente posible circule por la resistencia y se caliente rápido. El valor entre el 0 y el 255 determinará qué tanta corriente pasa por la resistencia y por tanto que tan rápido se calienta. De igual manera el algoritmo controla una salida para PWM del ventilador y determina su velocidad y qué tanto aire enfría la resistencia. En el control PID el término proporcional depende del último error y repercute en la rapidez con que el sistema alcanza el punto deseado. El valor integral depende de la acumulación de errores previos y ayuda a disminuir la variación en el punto deseado o estado estable. El valor derivativo es una anticipación a errores futuros, por lo que evita tanto el sobre calentamiento como el sobre enfriamiento. En el lenguaje de programación Python, existen librerías que contienen controladores PID. Lo único que hay que hacer para manejarlas es proporcionar los valores correctos a los parámetros de diseño y esperar que el método de programación retorne un valor y ajustarlo al PWM.



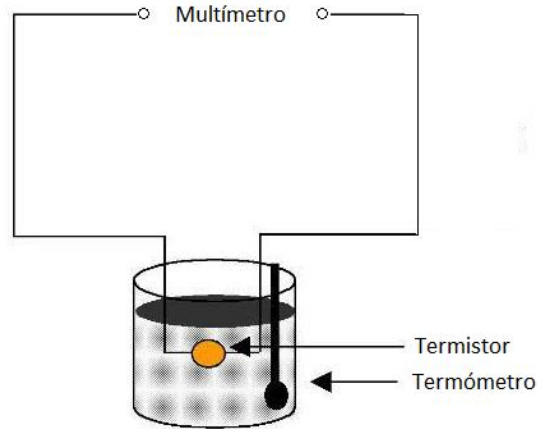
**Fig. 22:** Diagrama de flujo del algoritmo para el control de temperatura programado en la Raspberry Pi.

El algoritmo PID fue programado en la Raspberry Pi y la calibración se realizó de manera empírica: si se obtenía una pendiente de calentamiento lenta, se cambiaban los valores para obtener una subida rápida, pero si se presentaba sobre calentamiento se volvían a cambiar para amortiguar la pendiente. Lo mismo se hizo para controlar los errores en el punto deseado o estado estable. Cabe mencionar que estos valores dependen de un número de factores como la posición del ventilador, el circuito electrónico, elementos electrónicos cuyas propiedades internas no se conocen, el voltaje de alimentación, el material donde se coloca el sensor (vidrio, acrílico, PDMS), la interfaz entre el calentador y el chip, por lo que este método de calibración resultaba más práctico que modelar el sistema mediante una aproximación y hacer un cálculo teórico de los parámetros ideales.

### **3.1.2 Calibración del termistor**

Un termistor es un semiconductor encapsulado cuya resistencia depende de la temperatura. En este caso el termistor utilizado fue NTC (Negative Temperature Coefficient), lo que significa que disminuye su resistencia conforme aumenta la temperatura. Fue necesario realizar una calibración del termistor usado para este instrumento.

Para calibrar el termistor se utilizó el arreglo experimental de la **Figura 23**, el cual consistió de un baño María, un termómetro digital con resolución de 0.1 °C y un multímetro digital Fluke. El termistor y el termómetro fueron colocados dentro del vaso de precipitados lleno. Fue importante mantener los sensores del termistor y el termómetro juntos para tener una calibración lo mejor posible. La resistencia del termistor se midió con el multímetro digital. Se colocó el vaso de precipitados lleno sobre una plancha y se calentó el agua desde 25 hasta 95 °C y cada 5 °C se registraba la resistencia del termistor desplegada en el multímetro.



**Fig. 23:** Arreglo experimental para la calibración del termistor. El termistor y el termómetro se colocaron dentro del vaso de precipitados. La resistencia del termistor se midió con un multímetro digital cuyo display indicaba la resistencia correspondiente a la temperatura.

### 3.1.2 Circuito electrónico

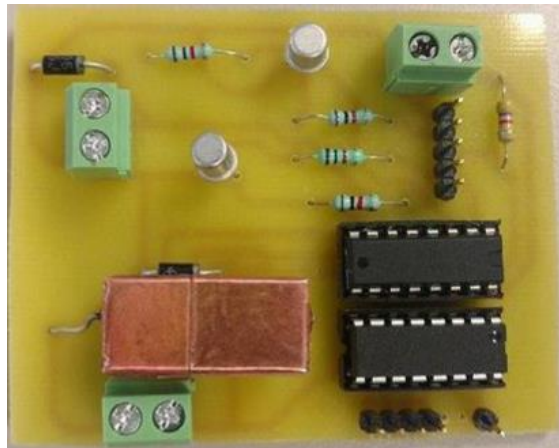
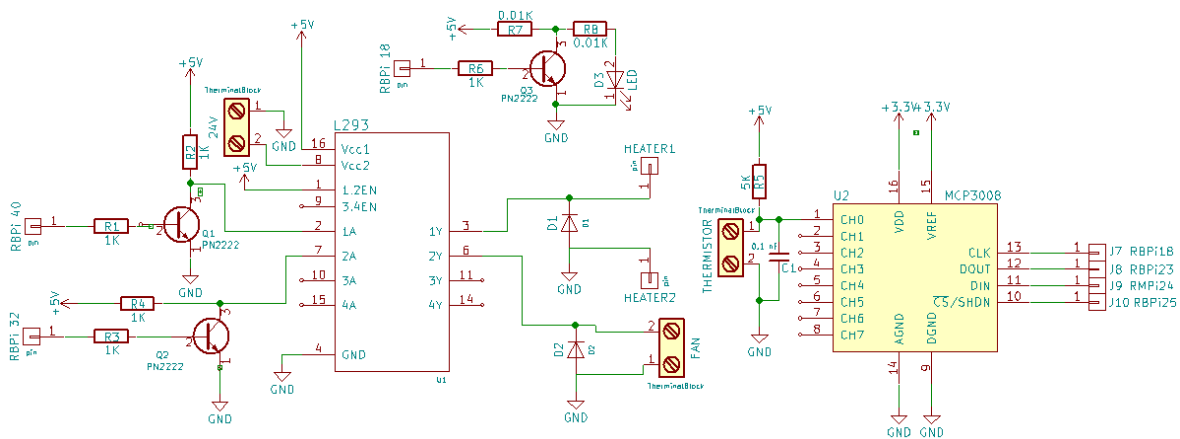
Se diseñó en el software KiCAD una tarjeta de circuito electrónico impreso (PCB) para los componentes electrónicos de control y funcionamiento apropiado de la resistencia y el ventilador y proveerles una interfaz con la Raspberry Pi. Esta PCB contiene:

- Terminales para la resistencia y el ventilador.
- Un controlador tipo H para motor (L293, Texas Instruments) el cual funciona como interfaz entre el control digital de los pines de la Raspberry Pi hacia los elementos de potencia cuyo funcionamiento depende de la energía de la fuente.
- Un ADC para leer el voltaje en el termistor en configuración tipo puente.
- Componentes electrónicos discretos (diodos, transistores, resistencias, bloques terminales) para el control de los voltajes y corrientes, conexión y protección.

Para hacer el ruteo de los componentes se deshabilitaron las reglas de diseño en el software (DRC).

La PCB se grabó sobre una placa de fibra de vidrio recubierta unilateralmente de cobre por medio de una máquina fresadora (MDX-40a Roland). En la fabricación se utilizó

una broca número 45 (cortador en V a 45°) para delimitar las pistas del circuito usando los siguientes parámetros de grabado en el software Dr. Engraver: X/Y Speed = 5 mm/s, Spindle RPM = 15000, Z Speed = 2 mm/s, Z Up Position = 0.5 mm, Z Down Position = -1.3 mm, Z Engraving Pitch: 0.02 mm. A su vez, para remover el cobre excedente a dichas pistas, se seleccionó el parámetro de Infill = 0.1. El proceso total se llevó a cabo en aproximadamente 10 horas. Finalmente, la PCB fue perforada con un taladro y una broca de 0.09 mm en los lugares correspondientes a los componentes electrónicos.



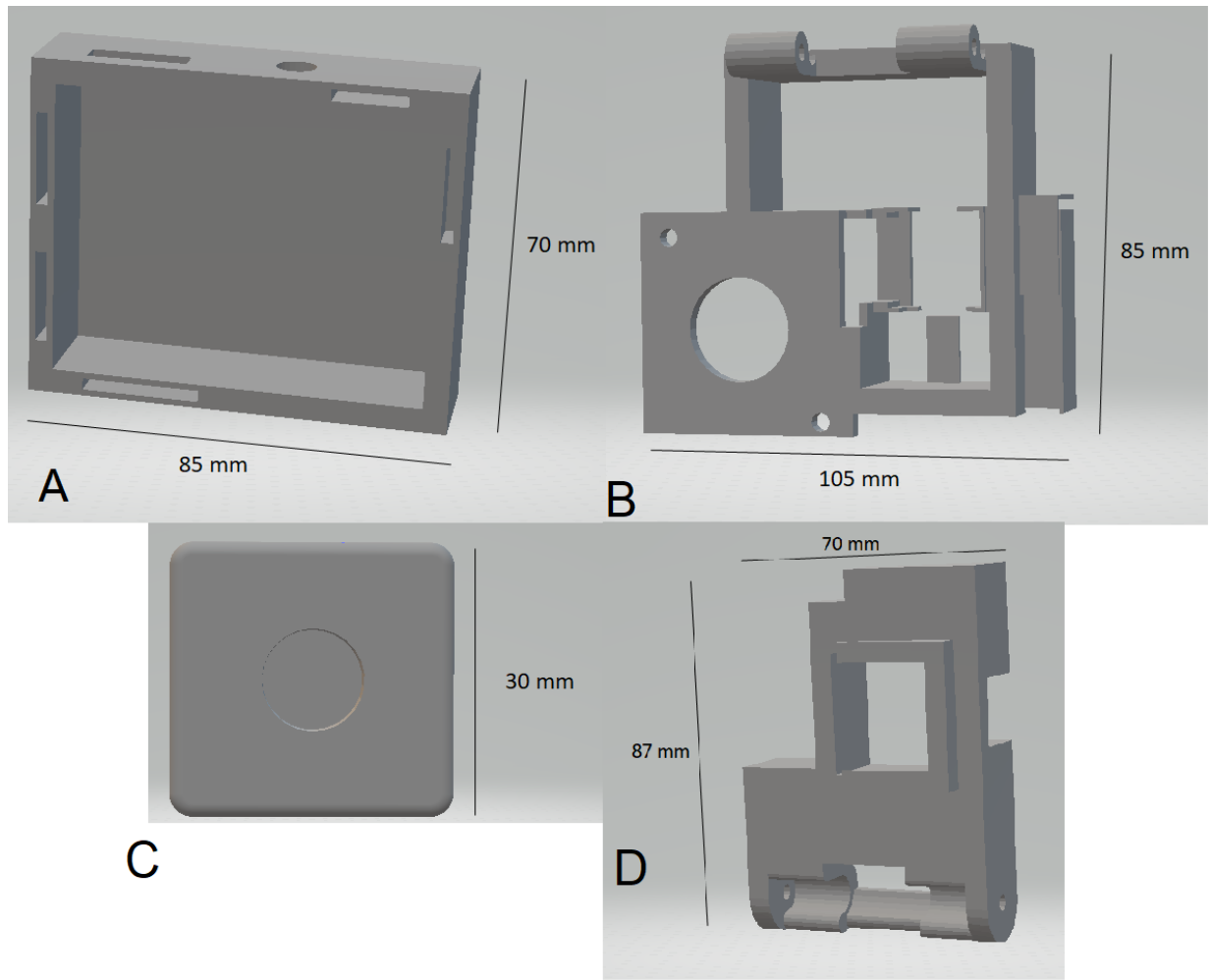
**Fig. 24:** Esquemático de la PCB para el termociclador (arriba). Fotografía de la PCB (abajo).

El instrumento fue energizado con una fuente de 24 V (VCS50US24, XP Power) y se utilizó un regulador de voltaje DC-DC (OKI78SR, Murata) para alimentar la Raspberry Pi y la tablet.

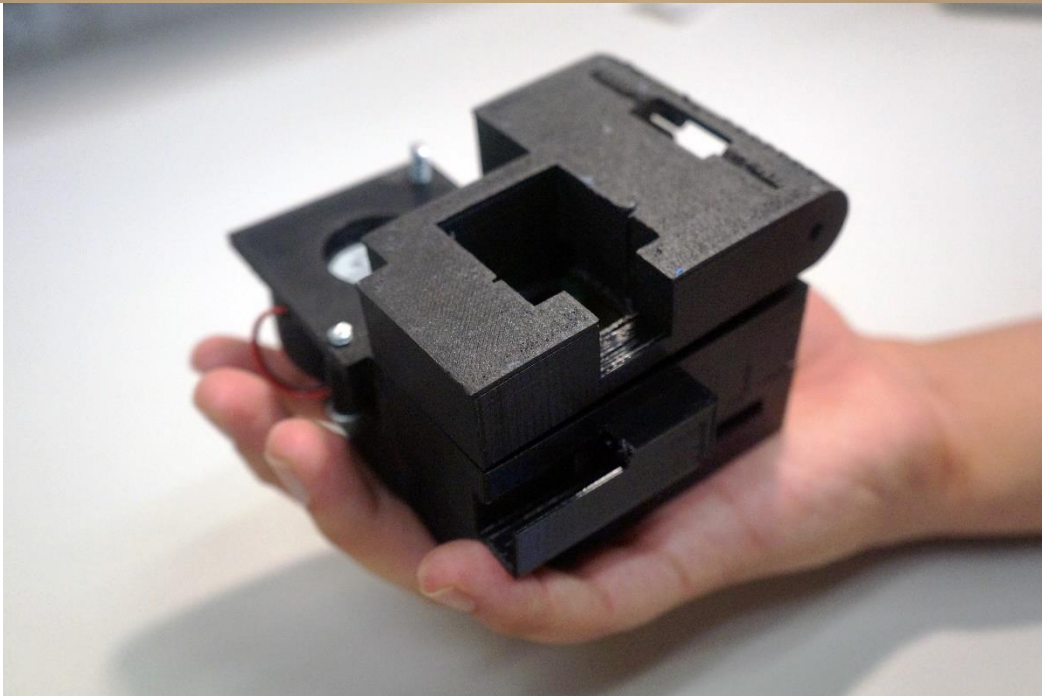
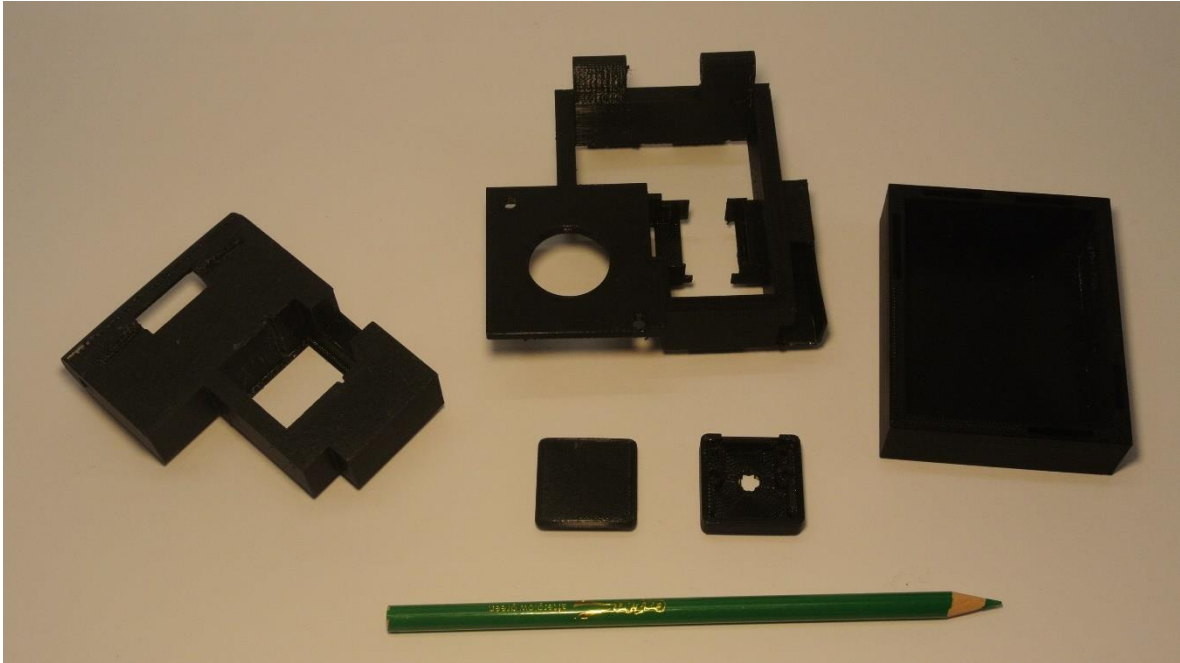
### 3.2 Impresión en 3D

Se diseñaron piezas en 3D para el instrumento usando el software Inventor 2017 (Autodesk, edición de estudiantes) y se fabricaron con ácido poliláctico en diferentes colores usando una impresora 3D Makerbot Replicator 2, con un inyector de 0.4 mm y capas de impresión de 0.2 mm. El chasis del instrumento (**Figura 25 y 26**) consiste de cuatro elementos: a) un contenedor en el fondo para la tarjeta electrónica y el calentador, b) una pieza intermedia para sostener el ventilador y el LED, c) una cubierta para la cámara CMOS, y d) una tapa para sostener la cámara con su cubierta y bloquear luz ambiental. El tiempo total de impresión para un instrumento resultó ser 20 horas a una velocidad de 40 mm/s. El peso total de las piezas en 3D fue de 110 g (**Tabla 5**), lo que representa un costo de fabricación menor a \$5 USD en material, representando uno de los chasis más ligeros y baratos que se hayan reportado, según lo reportado anteriormente en la **Tabla 4**.





**Fig. 25:** Vista en 3D de las piezas del instrumento. A) El contenedor para los componentes electrónicos en la tarjeta, B) espacios donde se coloca el ventilador y el LED para fluorescencia, C) la cubierta para la cámara, y D) tapa para bloquear la luz ambiental y coloca la cámara.



**Fig. 26:** *Fotografía por separado de las piezas impresas en 3D y abajo una fotografía de las piezas ensambladas.*

<i>Componente</i>	<i>Peso (g)</i>
Base para la PCB	29
Pieza intermedia	28.6
Tapa	26
Cubierta para la cámara	6
<i>Total</i>	<i>89.6</i>

**Tabla 5:** *Peso de las piezas en 3D.*

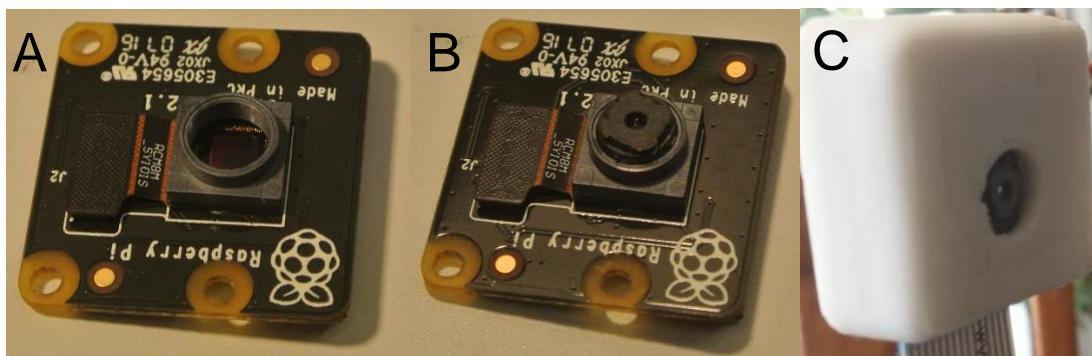
### 3.3 Medición y análisis de fluorescencia

El sistema se diseñó para realizar qPCR en muestras usando las sondas TaqMan con el reportero 6-FAM, el cual tiene su máximo de absorbancia en 488 nm, y su máximo de emisión en 525 nm. Para detectar la fluorescencia de esta molécula se usó un LED de 23.5 lm (OSW-6303, Newark) cuyo máximo de emisión se encuentra en 475 nm. El LED se colocó en su base del lado opuesto al ventilador dentro de la pieza en 3D intermedia a unos 10° sobre el plano horizontal para excitar las soluciones dentro del chip y no contaminar el camino óptico hacia la cámara CMOS, la cual se ubicaba a algunos centímetros sobre el chip para visualizar los pozos.

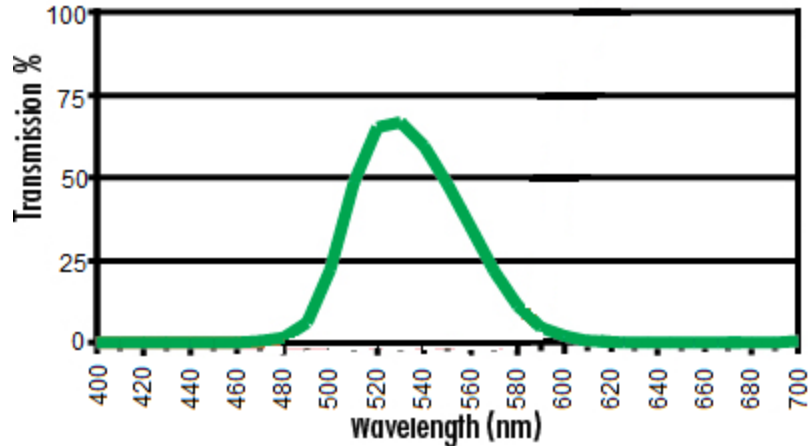
La fluorescencia emitida se midió con el módulo del sensor de la cámara versión 2 para la Raspberry Pi (IMX219, SONY). Las características importantes de este sensor se presentan en la **Tabla 6**. El lente de la cámara fue desatornillado gentilmente (**Figura 27A**) y reposicionado a una distancia en la que permitiera enfocar objetos pequeños y cercanos (**Figura 27B**). Además, se colocó un filtro óptico pasabanda (520 ±10 nm, Wratten #58) entre el lente y el sensor. La gráfica del espectro de transmitancia que tiene este filtro se muestra en la **Figura 28**. Todo el módulo de la cámara fue montado en una carcasa impresa en 3D posicionada verticalmente en dirección a los dispositivos microfluídicos (**Figura 27C**).

Voltaje de alimentación	1.5 V
Tamaño de pixel	1.4 $\mu\text{m}$ x 1.4 $\mu\text{m}$
Factor de relleno	~30%
Resolución del sensor	2592x1944 pixeles
Campo de visión	3.76 x 2.74 mm <sup>2</sup>
Cuadros por segundo	Hasta 120
Rango de temperatura	Operando 30 – 70 Estable 0 – 50
Corriente oscura	16 mV/s
Resolución de salida	8/10 bits

**Tabla 6:** Características del sensor CMOS IMX219.



**Fig. 27:** En la figura A) y B) se ilustra como el lente del sensor fue removido para colocar el filtro óptico directamente sobre el sensor y después se vuelve a atornillar a una distancia con otro punto focal. C) Cámara cubierta con la pieza impresa en 3D.



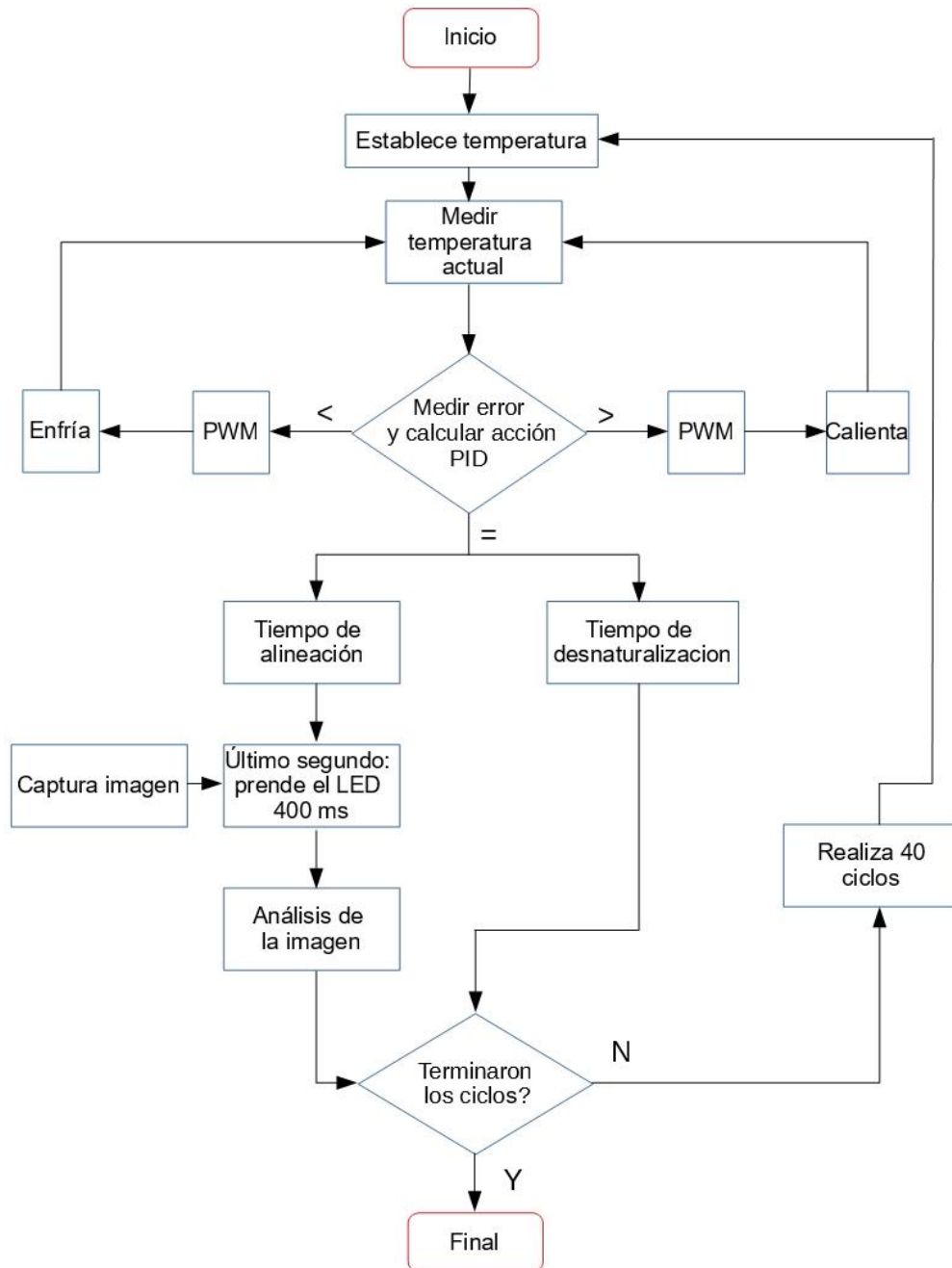
**Fig. 28:** *Espectro del filtro de emisión para el filtro #58 Wratten.*

### 3.3.2 Software para el control de la cámara

Para controlar la cámara y monitorear la señal de fluorescencia de cada pozo en el chip, se desarrolló utilizando la GUI programada en Python 2.7 usando la librería Tkinter para interfaces gráficas y Opencv para el procesamiento de imágenes. En el lenguaje Python se utilizaron las librerías para la cámara de la Raspberry Pi y se controlaron parámetros del sensor como modo de exposición y auto-balance de blancos para dejarlos en un valor fijo y que no modificaran las imágenes, aunque cambiara la fluorescencia de la solución. Para las imágenes de fluorescencia se utilizó un tiempo de exposición del sensor de 400 ms, ya que en la configuración en la que se colocaron los componentes, este tiempo permitía obtener las mejores imágenes.

Las imágenes se adquirieron en formato RGB crudo y como pre-procesamiento se aplicó una transformada gamma ( $\gamma = 2.4$ ) para contrarrestar los efectos no lineales de la circuitería CMOS y medir respuestas con mayor linealidad entre señal y luminancia [56]. Al inicio del programa de qPCR, el programa pide al usuario seleccionar el centro de las regiones de interés (ROI) correspondientes a cada pozo. Posteriormente, en cada ROI se midió el valor promedio de intensidad de los píxeles y este valor se utilizó como intensidad de fluorescencia de fondo. Como se ilustra en la **Figura 29**, al final de cada ciclo de alineación/extensión (último segundo), se adquiere una imagen y se calcula de nueva cuenta la intensidad de fluorescencia en cada ROI y se grafica la

diferencia entre este valor y el valor de fondo en cada ciclo, produciendo una línea base en los primeros ciclos. Finalmente, la imagen de cada ROI se corta y muestra en la GUI para apreciar en tiempo real el progreso de la reacción.



**Fig. 29:** Esquemático del algoritmo para el control de los ciclos de temperatura en base a un controlador PID de lazo cerrado, captura de imágenes de fluorescencia y procesamiento de imágenes en tiempo real.

## 3.4 Diseño y fabricación de dispositivos

### 3.4.1 Dispositivos de PDMS

Para la caracterización térmica del termociclador en chips de microfluídica se utilizó un chip de PDMS como modelo. Los dispositivos se fabricaron colocando prepolímero PDMS en relación 5:1 con agente curador (Sylgard® 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation, USA) sobre una base de acrílico hasta obtener una altura de aproximadamente 6 mm. Después, la base de acrílico era colocada en una cámara de vacío para degasificar el PDMS durante 10 minutos. Posteriormente el acrílico se introducía en un horno de convección y se dejó curando a 80 °C por un periodo de 120 minutos. Se retiró un cubo de PDMS cortándolo con un escalpelo y se perforaron agujeros con un sacabocados de 2 mm.

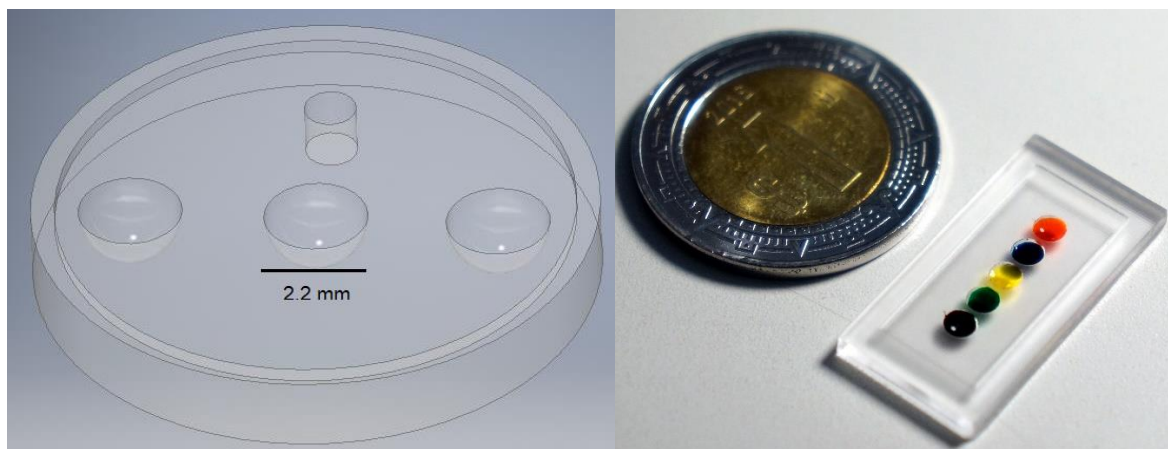
Los chips de PDMS se colocaban en una cámara de tratamiento de plasma junto con un cubreobjetos durante 90 s e inmediatamente después se ponían en contacto para unirlos covalentemente. Por último, los dispositivos se colocaban en una parrilla a 90 °C por 5 minutos para asegurar la unión.

### 3.4.2 Dispositivos de PMMA

Se diseñaron dispositivos de acrílico de tal manera que tuvieran pozos para contener las soluciones a amplificar, tal como se muestra en la **Figura 30**. Los pozos se diseñaron con un diámetro de 2.2 mm y una profundidad de 1.1 mm, con un volumen total de 2.788  $\mu\text{L}$ . Estos dispositivos se diseñaron en el software de diseño asistido por computadora (CAD) (Autodesk Inventor 2017 edición de estudiantes) para generar archivos con extensión STL, el cual es el formato estándar para datos de piezas de manufactura. Los archivos se importaron en el software SRP player (Roland DG, Alemania), el cual generaba los comandos para fabricarlos en hojas de polimetilmetacrilato (PMMA o acrílico) de 2.4 mm de grosor con una máquina de fresado de alta precisión MDX-40A (Roland DG, Alemania). Este programa generaba las trayectorias, velocidades y revoluciones de la fresa con punta de bola de 1 mm de

diámetro 1635-0394.058 (Kyocera, Japón), para que ésta fresara los pozos y los dejara redondeados.

Se realizaron 2 diferentes diseños: uno de 22 mm x 11 mm que cubría toda la superficie de la resistencia y se utilizó para la caracterización de la fluorescencia, y otro circular con diámetro de 10 mm para realizar la PCR. La razón de cambiar a un diseño circular fue la adaptación a un pequeño soporte metálico que tenía esa forma para evitar que el dispositivo se moviera durante el enfriamiento por el ventilador.



**Fig. 30:** Modelo en 3D del dispositivo con pozos para realizar PCR. A la derecha, foto del dispositivo con el tamaño del calentador que se utilizó para la caracterización de fluorescencia.

Después de la fabricación en la máquina CNC, los dispositivos fueron lavados con agua y soplados con nitrógeno. Posteriormente, fueron expuestos a un tratamiento para pulirlos y redondear lo más posible los pozos. Para este tratamiento se colocaron los dispositivos en un portaobjetos dentro de un plato de Petri (9 mm) y se vertió 1 mL de cloroformo (288306, Sigma Aldrich) a los lados del portaobjetos. El plato de Petri se colocó dentro de otro plato de Petri (12 mm) lleno de agua para evitar la evaporación. Después de 3 minutos, los dispositivos fueron retirados y se llevaron a un plato caliente a 60 °C y se dejaron durante 2 minutos para remover completamente el cloroformo.

Luego, los dispositivos fueron esterilizados con etanol dentro de una cabina de bioseguridad para esterilizarlos. Finalmente, se lavaron con jabón RNaseZAP (R2020,



Sigma Aldrich) para remover potenciales inhibidores de la PCR y se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL a temperatura ambiente hasta su uso.

### 3.6 PCR cuantitativa

Para este proyecto se empleó cADN del gen 18S extraído de corazones de ratones de la cepa C57BL/6 en el Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Monterrey.

La cantidad de ADN se midió en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Applied Biosystems) utilizando 2  $\mu$ L de la muestra. Se registraron los valores de concentración A260/280 y A260/230, calculados a partir del valor de las proporciones de la absorbancia a diferentes longitudes de onda, buscando obtener valores mayores a 1.9 en ambas.

Con el fin de validar el dispositivo termociclador de este proyecto, se realizó una curva estándar [56] de qPCR en un termociclador comercial como control. La curva se realizó con un mínimo de 6 concentraciones distintas. Después de preparar las concentraciones de cADN correspondientes, se preparó mezcla de reacción suficiente para todas las muestras por triplicado y control negativo. Cada reacción requirió 10  $\mu$ L de TaqMan Universal PCR Master Mix (4304437, Applied Biosystems), 7  $\mu$ L de agua libre de RNAsas (10977, Life Technologies) y 1  $\mu$ L de las sondas para ensayo TaqMan correspondientes al gen 18S (4333760F, Applied Biosystems). Se distribuyó la mezcla en tubos de polipropileno para PCR de 200  $\mu$ L y a cada tubo se le añadieron 2  $\mu$ L de la concentración correspondiente de cADN, o de agua en el caso del control negativo. Se cerraron los tubos con su tapa y se centrifugó por 20 segundos para eliminar las burbujas en el fondo de los tubos. Se colocaron sobre un sujetador para 48 tubos y se introdujeron en el termociclador StepOne, Applied Biosystems y se siguió el programa sugerido por el proveedor (**Tabla 7**).

Temperatura (° C)	Tiempo
50	2 minutos
95	10 minutos
95 (40 veces)	15 segundos
60 (40 veces)	1 minuto

**Tabla 7:** Programa de qPCR sugerido por el proveedor de los reactivos.

Para los experimentos en los dispositivos de acrílico, la reacción se preparó mezclando 5  $\mu\text{L}$  de TaqMan Universal PCR Master Mix, 3  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas, 0.5  $\mu\text{L}$  de las sondas para ensayo TaqMan correspondientes al gen 18S, 0.5  $\mu\text{L}$  de BSA (A9467, Sigma Aldrich) 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para prevenir adsorción a las paredes de acrílico y 1  $\mu\text{L}$  de la muestra de cADN. De este volumen total de 10  $\mu\text{L}$ , se tomaron 2  $\mu\text{L}$  y se colocaron en los pozos del dispositivo, ver **Tabla 8**. Posteriormente, se colocaban 60  $\mu\text{L}$  de aceite mineral (M5904, Sigma Aldrich) para evitar la evaporación.

Reactivo	Volumen en termociclador comercial ( $\mu\text{L}$ )	Volumen en el chip ( $\mu\text{L}$ )	Detalles
TaqMan Universal Master Mix (2x)	10	5	4304437, Applied Biosystems
Agua libre de RNAsas	7	3	10977, Life Technologies
Oligonucleótidos y sonda TaqMan	1	0.5	4333760F, Applied Biosystems
BSA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	NA	0.5	A9647, Sigma Aldrich
18S cDNA	2	1	

**Tabla 8:** Comparación de reactivos entre la PCR en termociclador comercial y el termociclador de este proyecto.

Los chips fueron colocados sobre el calentador del termociclador impreso en 3D, y se siguió el programa sugerido por el proveedor (**Tabla 7**).

Durante el último segundo del periodo de extensión/alineación, se adquirieron imágenes de fluorescencia y en tiempo real se procesaron para monitorear la intensidad en cada pozo con solución.

De cada medición de fluorescencia al final de cada ciclo se utilizó un programa en Python para calcular la segunda derivada entre datos consecutivos. Para un punto en una serie de datos consecutivos  $x[i-1]$ ,  $x[i]$  y  $x[i+1]$ , la segunda derivada se aproximó con una diferencia central de la siguiente manera:

$$\text{Segunda derivada } [i] = x[i+1] + x[i-1] - 2*x[i]$$

donde "i" es el número de ciclo y  $x[i]$  es el valor de fluorescencia. Con este programa se detectó el ciclo en el que la segunda derivada es menor, y en caso de repetirse, se tomó el primero de estos valores mínimos para realizar una curva contra el logaritmo de la concentración.

Para el caso de la PCR de control en el termociclador comercial, y se seleccionaron aquellos experimentos donde el ajuste semi-logarítmico de la curva estándar mostrara una pendiente de  $-3.32 \pm 0.332$  y con una  $R^2$  mayor a 0.9, lo cual significa que la eficiencia de amplificación es muy cercana al 100%.

## 4. Resultados

Se diseñó un instrumento capaz de controlar la temperatura en un chip de micropozos con un algoritmo de lazo cerrado sin que existiera un gradiente térmico en el calentador, así como con la habilidad de medir fluorescencia en los niveles de intensidad de la PCR para integrar estos sistemas y realizar qPCR. Este instrumento es de fabricación sencilla debido a que está conformado por piezas impresas en 3D y electrónica de estantería, portable porque sus dimensiones totales fueron de 105 x 87 x 70 mm y su peso de 494.1 g (**Tabla 9**) y el costo total de producción resultó de \$150 USD.

<i>Componente</i>	<i>Peso (g)</i>
Base para la PCB	29
Pieza intermedia con el ventilador	62.6
Tapa	26
Cámara con filtro y cubierta en 3D	9
PCB	30
Raspberry Pi	43
LED	4
Tablet con base impresa en 3D	290
Chip de PMMA	0.5
<i>Total</i>	<i>494.1</i>

**Tabla 9:** *Peso de los componentes que conforman el termociclador diseñado.*

### 4.1 Caracterización del termociclador

#### 4.1.1 Calibración del termistor

Para caracterizar térmicamente el sistema y realizar PCR de manera precisa, primero fue necesario obtener mediciones exactas de temperatura. Con el arreglo experimental descrito en la sección de métodos y por medio de la ecuación de Steinhart-Hart fue

posible calibrar el termistor utilizado para convertir la resistencia medida a temperatura [57]. En esta ecuación, la temperatura en grados Kelvin está dada por el inverso de

$$\frac{1}{T} = A + B \ln(R) + C |\ln(R)|^3,$$

donde R es la resistencia en  $\Omega$ , y A, B y C son los coeficientes de Steinhart-Hart. Para encontrar estos coeficientes se tomaron tres mediciones a diferentes temperaturas T1, T2 y T3, i.e.,

$$\begin{bmatrix} 1 & \ln(R1) & \ln(R1)^3 \\ 1 & \ln(R2) & \ln(R2)^3 \\ 1 & \ln(R3) & \ln(R3)^3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A \\ B \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{T1} \\ \frac{1}{T2} \\ \frac{1}{T3} \end{bmatrix}.$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones anterior se obtuvieron A, B y C con los siguientes cálculos:

$$L1 = \ln(R1), L2 = \ln(R2), L3 = \ln(R3),$$

$$Y1 = \frac{1}{T1}, Y2 = \frac{1}{T2}, Y3 = \frac{1}{T3},$$

$$\gamma2 = \frac{Y2-Y1}{L2-L1}, \gamma3 = \frac{Y3-Y1}{L3-L1},$$

$$C = \left( \frac{\gamma3-\gamma2}{L3-L2} \right) (L1 + L2 + L3)^{-1},$$

$$B = \gamma2 - C(L1^2 + L1L2 + L2^2),$$

$$A = Y1 - (B + L1^2C)L1,$$

Los coeficientes obtenidos fueron:

$$A = 0.0002616883351,$$

$$B = 0.0004239496143,$$

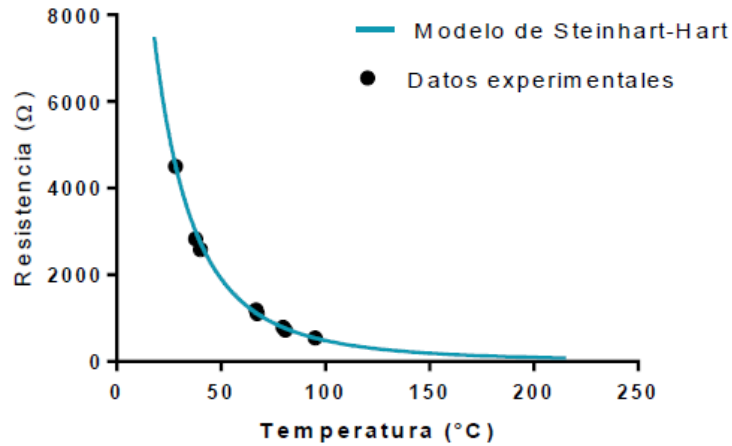
$$C = -0.0000008541145797.$$

Con base a estos coeficientes, se compararon los valores medidos y los valores del modelo y se comparan en la siguiente tabla:

Temperatura (°C)	Resistencia predicha por el modelo ( $\Omega$ )	Resistencia medida ( $\Omega$ )
27	4 160	4147
42	2 775	2 755
46	2 340	2 324
68	1 405	1 414
78	910	920
95	570	560

**Tabla 10:** Comparación entre valores medidos y valores predichos por el modelo Steinhart-Hart para el termistor calibrado.

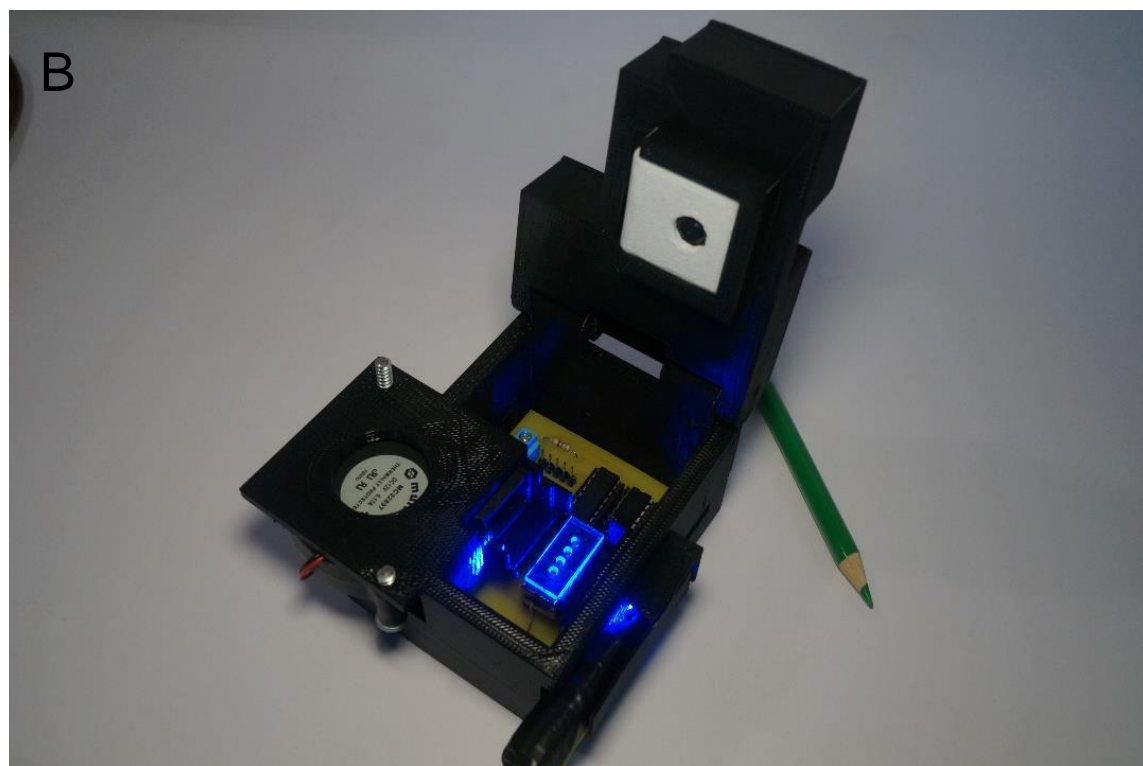
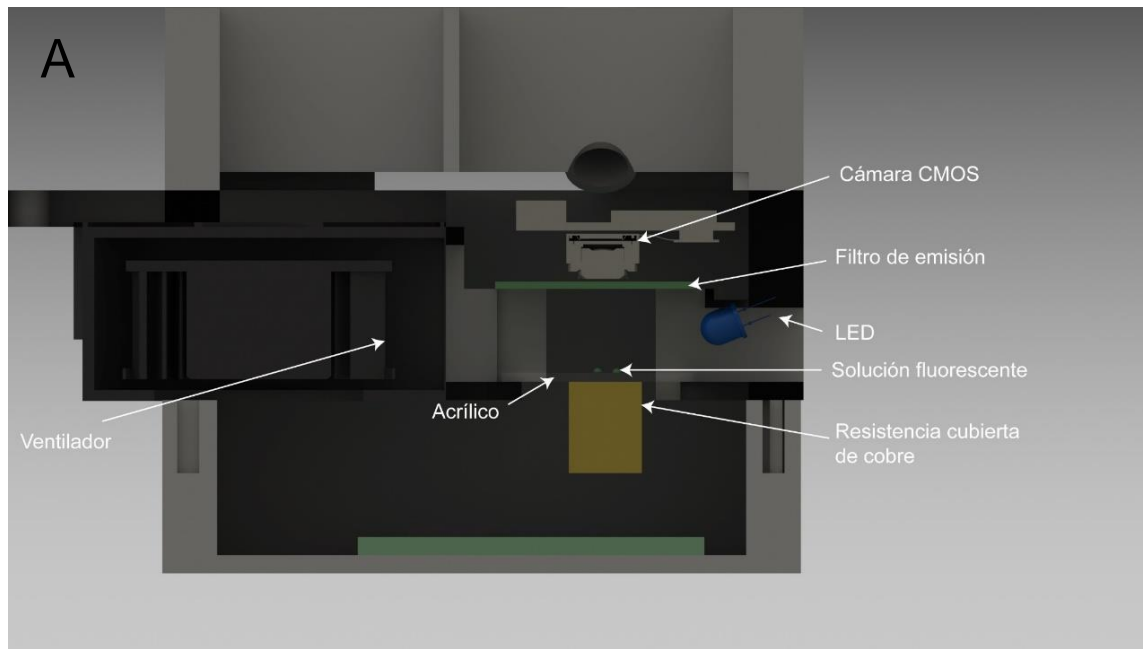
En la **figura 31** se muestra que la máxima variación medida fue de 20  $\Omega$ , lo que representa una variación en la medición de 0.5 °C, un error que se consideró suficiente para este tipo de sistema.



**Fig. 31:** Curva del termistor cuyo rango de confiabilidad es de 0 a 250 °C.

#### 4.1.2 Homogenización de la temperatura en el calentador

En la **Figura 32** se muestra un esquema renderizado y una foto del termociclador impreso en 3D. Debido a la naturaleza del elemento calentador y que no está diseñado para esta clase de instrumentos, la distribución de calor en su superficie no es homogénea, siendo más grande en los lados que en el centro. Debido a que no se encontró un método para resolver este problema, se investigaron formas accesibles de reducir el gradiente al mínimo.

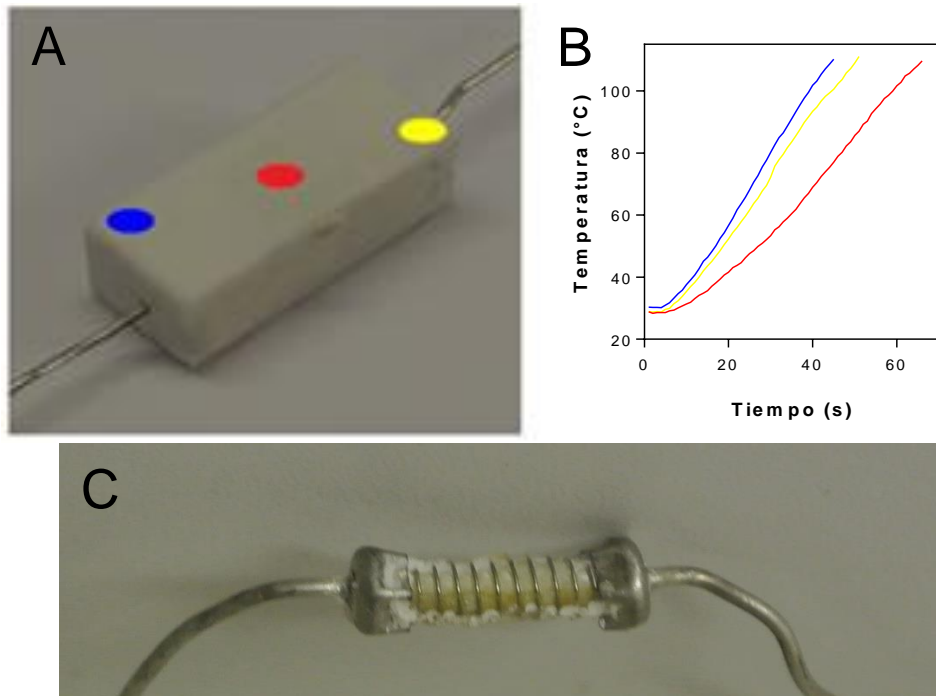


**Fig. 32:** A) Vista renderizada del termociclador con sus componentes internos y B) Foto mostrando el interior de un termociclador.

En la **Figura 33** se muestra una gráfica de la temperatura en tres puntos de la superficie de la resistencia energizada por un PWM del 100%. En la gráfica se observa el gradiente con las mayores temperaturas en los extremos, inclusive hay 25 °C de

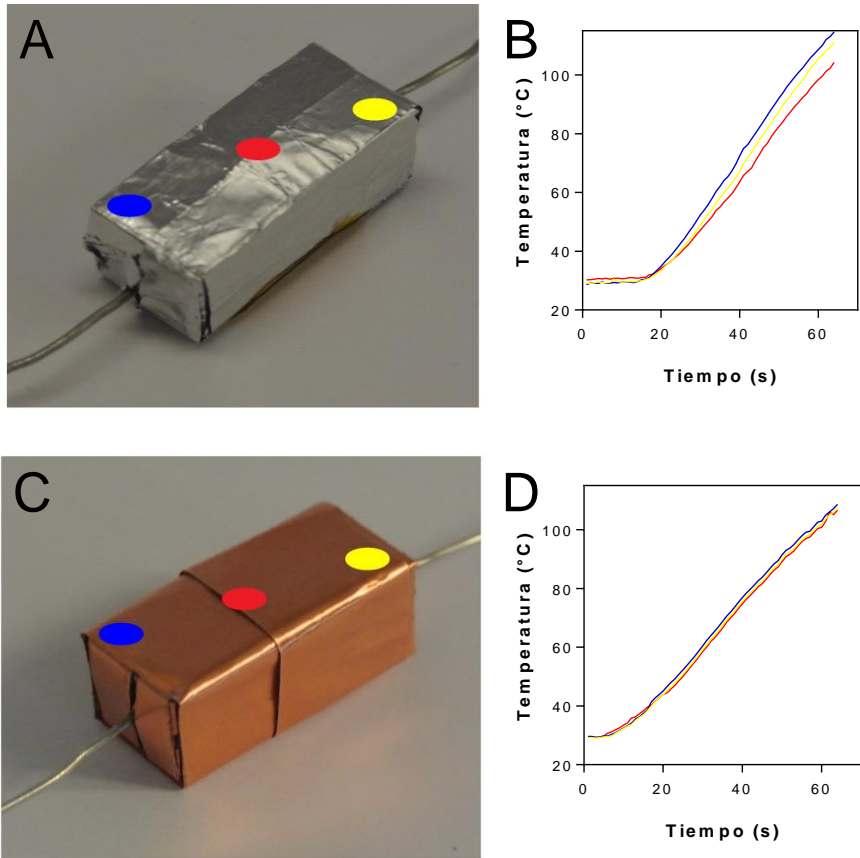


diferencia. Este efecto es atribuido a que por dentro, la resistencia fue soldada en sus extremos terminales, y genera más calor al haber mayor área conductora.



**Fig. 33:** A) Puntos de medición sobre la superficie de la resistencia. B) Gráfica de los tres puntos en la imagen A donde se observa un gradiente con las mayores temperaturas en los extremos debido a la estructura interna de la resistencia. C) Fotografía de la estructura interna de la resistencia.

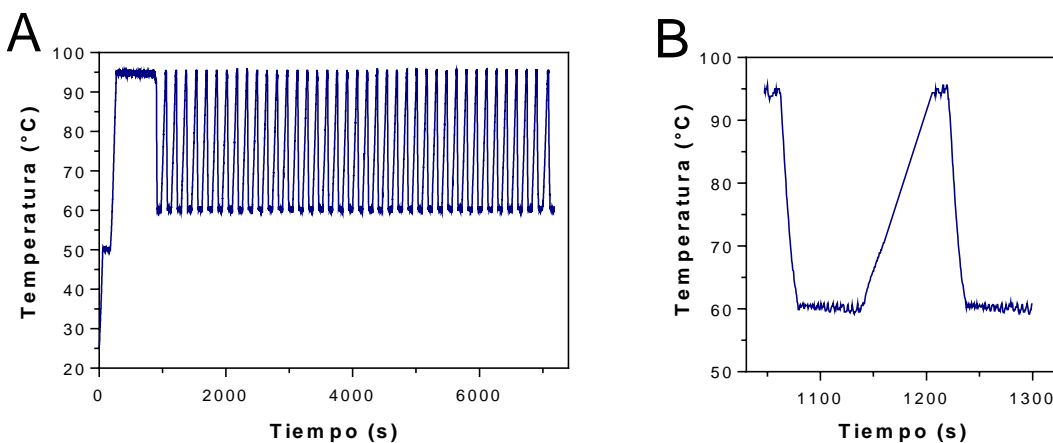
Se buscó disminuir el gradiente térmico cubriendo la resistencia con dos de los mejores y más económicos conductores térmicos conocidos: aluminio y cobre. Al cubrir la resistencia con aluminio se encontró que el gradiente térmico disminuyó hasta una temperatura de 4 °C (**Figura 34B**), sin embargo, con el cobre la diferencia se redujo a menos de 0.75 °C como se aprecia en la **Figura 34D**. Así, este método probó ser una solución simple para homogeneizar la temperatura sobre una resistencia de potencia.



**Fig. 34:** A) Fotografía de la resistencia cubierta con aluminio y los puntos de medición y B) gráfica de estos tres puntos. C) Fotografía de la resistencia cubierta con cobre y los puntos de medición y D) gráfica de estos puntos donde se observa como el calor se distribuye homogéneamente en la superficie.

Basados en estos resultados, se evaluó la capacidad del sistema de alcanzar y mantener las temperaturas necesarias para las reacciones de PCR dentro de chips de PDMS en cubreobjetos o dentro de chips de PMMA. Para realizar pruebas, se fabricaron chips de PDMS perforados con sacabocados de 2 mm para crear agujeros y se montaron sobre cubreobjetos o se usaron chips de PMMA con pozos de 2 mm. Los agujeros se llenaron con 2  $\mu\text{L}$  de agua y se cubrieron con aceite para evitar la evaporación. El termistor se posicionó dentro de la porción de agua, lo más cercano posible a la superficie inferior, sin hacer contacto, para medir la temperatura dentro del agua. Con este arreglo experimental, se desarrolló un algoritmo de control PID en Python para accionar el sistema de calentamiento y enfriamiento de acuerdo a pulsos de PWM y de esa manera, establecer la temperatura deseada.

Se evaluó la exactitud y precisión del sistema en el curso de tres experimentos de 35 ciclos de PCR tanto en los chips de PDMS como en los de PMMA, uno de los cuales se muestra en la **Figura 35**. La exactitud se definió como la diferencia entre la temperatura establecida y la temperatura promedio medida. La precisión se definió como la diferencia entre la temperatura establecida y la desviación estándar promedio [57].



**Fig. 35:** A) Una gráfica de los ciclos térmicos controlados en una solución acuosa dentro de un chip de acrílico. B) Acercamiento a dos de los ciclos para apreciar el control y la variación de la temperatura.

Para los chips de PDMS, la exactitud de las dos temperaturas establecidas (95 °C para desnaturalización y 60 °C para alineación/extensión) fue de 0.09 °C y 0.3, y la precisión fue de 0.45 °C y 0.26 °C, respectivamente. La máxima desviación para las dos temperaturas establecidas fue de casi 1.4 °C. La rampa de calentamiento promedio que se alcanzó fue de 0.42 °C/s y la rampa de enfriamiento promedio fue de 0.71 °C/s. Para los chips de PMMA, la exactitud para las tres temperaturas controladas (50, 60 y 95 °C) fue de 0.15, 0.18 y 0.5 °C. La precisión fue de 0.3, 0.42 y 0.55 °C, respectivamente. Se calculó la máxima variación definida como la máxima diferencia entre la temperatura medida y la temperatura establecida en cada instante de tiempo y esta fue de casi 1.4 °C. Cabe mencionar que el algoritmo PID programado no presentó sobretiro. Estos resultados indicaron que se podía controlar la temperatura en soluciones acuosas cubiertas con aceite para llevar a cabo reacciones de amplificación.

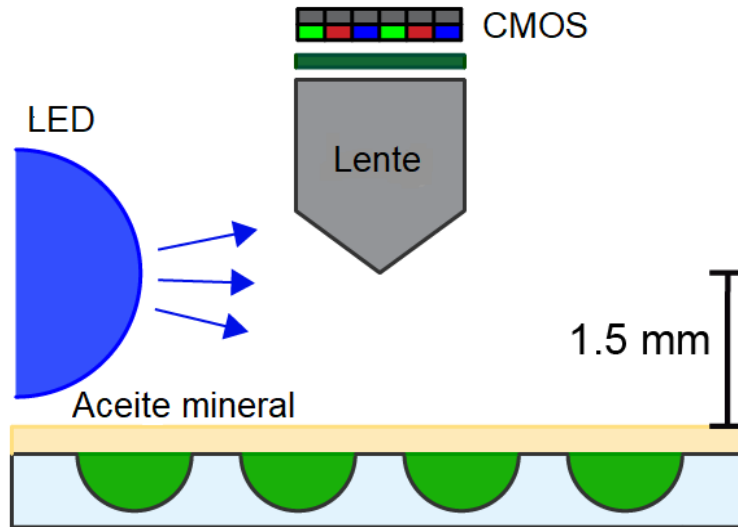
Debido a la naturaleza del método de enfriamiento, el cual depende de la transferencia de calor por convección del aire soplado del ventilador hacia el sistema del chip sobre la resistencia, se evaluó la capacidad del sistema para enfriar a diferentes temperaturas del aire en el ambiente. Se llevaron a cabo ciclos de PCR con el instrumento dentro de una incubadora a 21, 25, 30, 35 y 40 °C (**Tabla 11**). El control de la temperatura no mostró diferencias en esas temperaturas, comprobando que el termociclador no se ve afectado por las condiciones ambientales a estas temperaturas.

Temperatura ambiente (°C)	Rampa de calentamiento (°C/s)	Rampa de enfriamiento (°C/s)	Máxima variación con respecto a la temperatura establecida (°C)
21	0.35	0.7	1.2
25	0.4	0.7	1.4
30	0.4	0.7	1.4
35	0.4	0.7	1.4
40	0.4	0.7	1.4

**Tabla 11:** Caracterización del termociclador con diferentes temperaturas ambientales.

## 4.2 Medición de fluorescencia

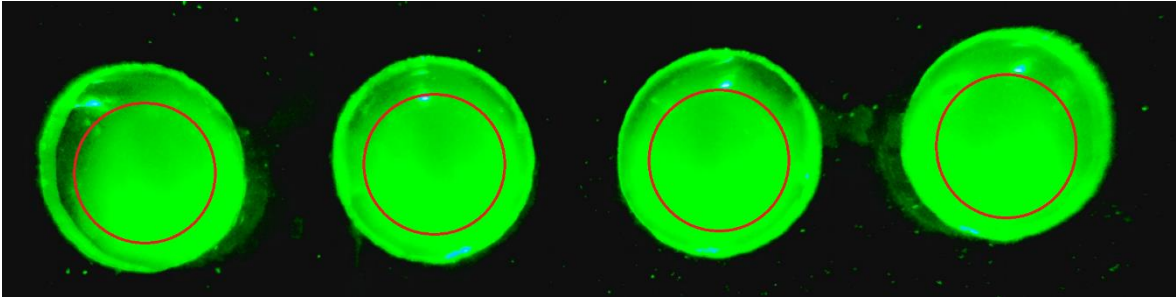
El sistema se diseñó para realizar mediciones de fluorescencia de manera portable y con elementos de bajo costo, por lo cual el arreglo que se utilizó se muestra en la **Figura 36** y consistió en un LED azul de potencia que iluminara las soluciones de costado, y el módulo de la cámara de la Raspberry Pi para adquirir imágenes de las soluciones a través de un filtro pasa-banda con características de transmisión para fluoróforo FAM.



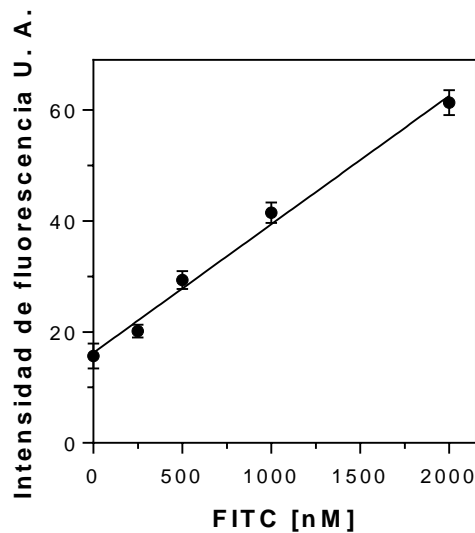
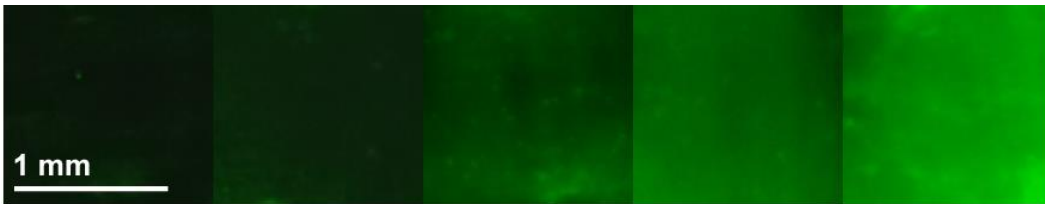
**Fig. 36:** Esquema del sistema óptico para medir fluorescencia. El LED excita las moléculas fluorescentes desde un ángulo de  $\sim 15^\circ$  y la emisión de fluorescencia es visualizada por el sensor CMOS con un filtro y un lente para enfocar a corta distancia.

Para demostrar la capacidad de medición de fluorescencia en la plataforma para qPCR, se realizó una curva de fluorescencia dependiente de la concentración del fluoróforo FITC, el cual tiene el mismo espectro que FAM (fluoresceína), colocado en los pozos del chip de PMMA. Se evaluó la respuesta de dicho sensor con salida digital de 8 bits como función de la concentración de la solución fluorescente de FITC, adquiriendo imágenes en formato crudo (sin procesamiento) con la máxima ganancia de señal para los píxeles, modo de exposición fijo y tiempo de exposición de 400 ms (**Figura 37**). Las imágenes se procesaron con una transformada gamma para decodificar la respuesta no lineal de la circuitería CMOS. Se encontró que la cámara presenta una respuesta lineal a la serie de diluciones del fluoróforo en el rango de concentraciones de 125 nM hasta 2  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.92$ ) (**Figura 38**). Se aplicó una regresión lineal a la curva y se obtuvo el límite de detección (LOD) con la concentración la cual supera 3 veces la desviación estándar de las mediciones a concentración 0 nM, y resultó ser de aproximadamente 300 nM o  $3.6 \times 10^{12}$  moléculas. La escala de medición de esta curva permitió establecer una analogía con la fluorescencia de las reacciones PCR, ya que hay instrumentos que especifican límites de detección de fluorescencia en el orden de nM (0.1 nM LightCycler® 480 y  $\sim 100$  nM ABI Prism® 7700), y además se comprobó

con soluciones ya amplificadas que era posible distinguirlas en el instrumento descrito en este proyecto.



**Fig. 37:** Imagen capturada con el sistema óptico diseñado donde se observan soluciones fluorescentes de FITC con concentración de 10 μM. Los pixeles que se midieron fueron los que se encontraban dentro de los círculos.

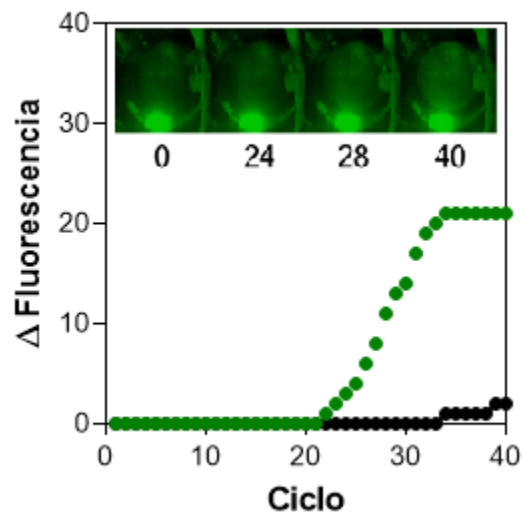


**Fig. 38:** Arriba se observan imágenes representativas de cada solución medida. Abajo, se muestra la curva de concentración de FITC contra intensidad de fluorescencia medida con el sistema óptico diseñado.

### 4.3 PCR en tiempo real

Para demostrar el funcionamiento del instrumento, se realizaron experimentos con soluciones que contenían reactivos para realizar qPCR y controles negativos tanto en un termociclador comercial, como en el instrumento impreso en 3D.

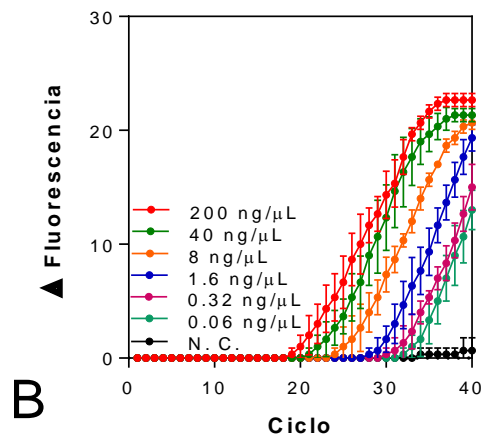
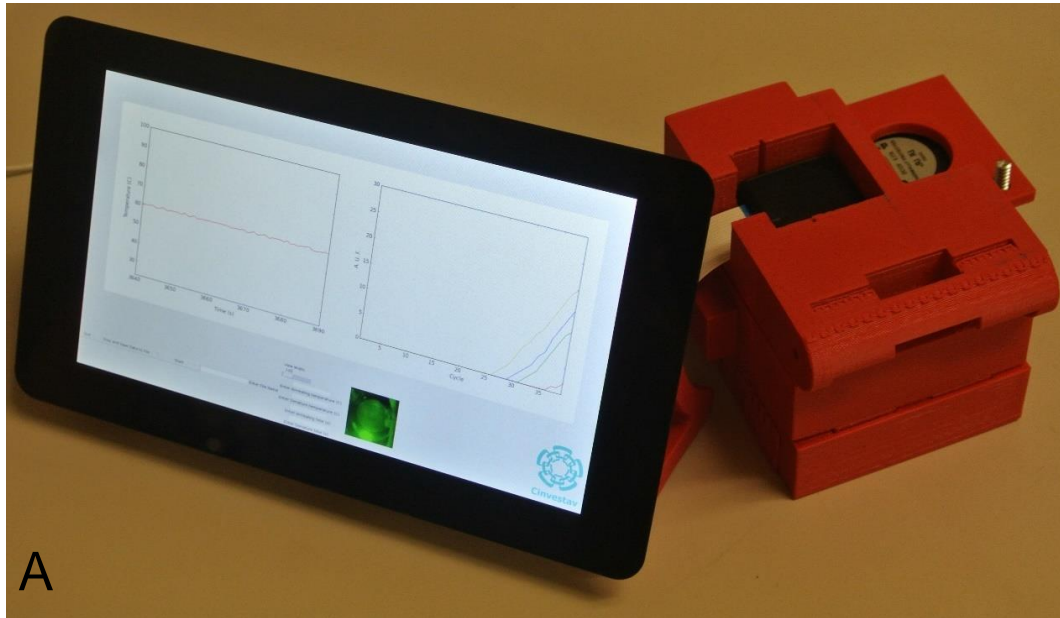
En la **Figura 39** se muestra la diferencia en la emisión de fluorescencia durante cada ciclo térmico para una solución sin ADN (control negativo) y con 40 ng/ $\mu$ L de ADN del gen 18S murino, mostrando el proceso de amplificación en el termociclador diseñado. Se observa que la intensidad de fluorescencia del control negativo se mantiene prácticamente en cero hasta los últimos ciclos, lo cual pudo deberse a contaminación de la muestra y/o amplificación inespecífica. En presencia del gen, la intensidad de fluorescencia se incrementa desde la línea base hasta un nivel de saturación conforme avanzan los ciclos.



**Fig. 39:** PCR en tiempo real de una solución con una concentración inicial de 40 ng/ $\mu$ L de ADN. Se muestran imágenes de la solución en ciclos específicos.

Como se muestra en la **Figura 40A**, se programó la GUI para procesar hasta 4 muestras por chip y se realizaron más experimentos con diferentes concentraciones de ADN y, se apreció que conforme se incrementaba la concentración, el ciclo en el cual se comienza a detectar un cambio en la fluorescencia ocurría más rápido (**Figura 40B**). Para determinar el ciclo umbral a partir del cual cuantificar la fluorescencia se

incrementaba, se determinó el punto de inflexión donde comienza a aumentar la fluorescencia y estos ciclos umbral se graficaron como función del  $\log_{10}$  de la concentración de ADN (curva estándar de PCR).



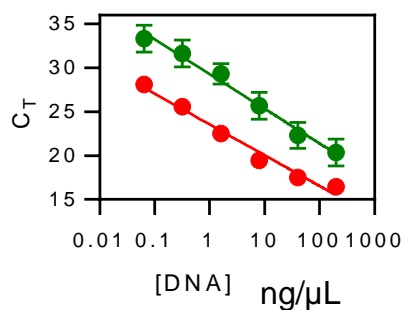
**Fig. 40:** A) Fotografía del termociclador mostrando amplificación de ADN en tiempo real y el monitoreo de la temperatura en la interfaz gráfica en la tablet. B) Curvas de amplificación de PCR para diferentes concentraciones iniciales de ADN.

Los resultados indicaron que la concentración más baja detectable fue de 0.064 ng/μL del gen 18S. Para la qPCR en el chip, los valores de  $C_T$  promedio para las



concentraciones de 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40 y 200 ng/ $\mu$ L de ADN fueron 33.34, 31.67, 29.33, 25.67, 22.33 y 20.33 respectivamente. Los datos experimentales fueron reproducibles (las barras de error representan las desviaciones estándar de 3 repeticiones de cada concentración), y el solapamiento entre barras de error se puede atribuir a la variabilidad del control térmico debido a la colocación manual del sensor de temperatura, a la modesta exactitud del sistema diseñado, a errores de pipeteo así como a posibles contaminaciones en los experimentos.

Para comprobar la eficiencia de este diseño de termociclador, se compararon los ciclos umbral obtenidos con los de un termociclador comercial intentando que las condiciones experimentales (concentraciones y protocolos térmicos) fueran lo más parecido posibles (**Figura 41**). Los valores de  $C_T$  correspondientes al termociclador comercial fueron 28.12, 25.58, 22.53, 19.45, 17.50 y 16.46. Evidentemente, las reacciones en el chip de PMMA tuvieron un mucho mayor valor de  $C_T$  con respecto al termociclador comercial, sugiriendo tanto una detección de fluorescencia menos sensible como un rendimiento menor de la reacción. Adicionalmente, un parámetro importante en las reacciones de PCR es la eficiencia de amplificación, definida como  $(10^{-1/k} - 1) \times 100\%$  donde  $k$  es la pendiente de la curva del  $C_T$  como función del logaritmo de la concentración de ADN.



**Fig. 41:** Comparación entre el instrumento diseñado y un termociclador comercial. Cada concentración se colocó en triplicado y se muestra el  $C_T$  promedio de ellas. Se obtuvo una pendiente dentro del rango deseado, así como un ajuste lineal adecuado.

Esta eficiencia en el chip resultó ser de 79.10%, la cual fue considerablemente menor que la de 93.11% del termociclador comercial. Esta limitada eficiencia para el termociclador diseñado es atribuible a que el control de temperatura no fue tan estable en comparación con el del termociclador comercial, a la modesta exactitud del sistema diseñado, a errores de pipeteo así como a posibles contaminaciones en los experimentos.

## 5. Discusión

El objetivo de este proyecto fue desarrollar un instrumento para qPCR con portabilidad, fabricación simple y de bajo costo. Esto se logró con componentes electrónicos de estantería, partes impresas en 3D y un ordenador popular usado en las universidades para enseñar a los estudiantes. Este instrumento debe ser capaz de ser construido por un estudiante de ingeniería de primer año con mínima instrucción.

El calentador que se utilizó fue una resistencia de potencia de 5W que transforma la corriente eléctrica en calor por el efecto Joule y el enfriador fue un ventilador de computadora. Estos elementos no son los óptimos para realizar un control de temperatura en procesos finos como la PCR donde se requieren tiempos de reacción cortos y temperaturas homogéneas, ya que no son tan rápidos para calentar y enfriar como los ubicuos elementos Peltier. Sin embargo, al haber reportes de rampas de calentamiento y enfriamiento por debajo de las tasas de los elementos Peltier, se decidieron utilizar y adaptar estos actuadores para construir un termociclador accesible pero que en comparación con un termociclador comercial resultó menos preciso.

Para medir la intensidad de fluorescencia generada en las reacciones de PCR, se diseñó un sistema óptico el cual pudiera detectar señales en el rango de los instrumentos comerciales (nM de fluoresceína) manteniendo la simplicidad y accesibilidad de los componentes y su ensamblaje. Con este diseño se obtuvieron mediciones de soluciones fluorescentes con una respuesta lineal respecto a la concentración y aunque el coeficiente de correlación lineal no fue perfecto ( $R^2 = 0.92$ ) la variabilidad en las mediciones pudo deberse a la naturaleza manual del instrumento, ya que el chip se coloca manualmente y el espacio para colocar el LED deja un margen de variación en la posición que es colocado, por lo que podía cambiar ligeramente de posición entre experimentos. Además, por supuesto, los componentes no son los de mayor calidad para un sistema de medición de fluorescencia, ya que un sensor CMOS no tiene mucha sensibilidad, un filtro óptico polimérico no tiene 100% de transmitancia y un LED de potencia no tiene la misma intensidad y ancho de banda que un láser. Sin embargo, con las limitaciones de espacio y precio, se lograron conjuntar y obtener mediciones suficientes para monitorear reacciones de PCR.

Como prueba de concepto del funcionamiento del termociclador, se realizaron experimentos de amplificación de ADN los cuales indicaron que, con este instrumento, y debido a que las barras de error se solapan, es posible aproximar un cálculo para la concentración inicial de la solución amplificada. Este margen de cálculo no es apto para aplicaciones como estudios de expresión de genes, debido a la exactitud requerida, pero si para otras tareas igual de importantes como la detección de patógenos donde se detecta la presencia o ausencia de material genético de microorganismos.

## 6. Conclusiones

Se desarrolló un instrumento para qPCR con componentes de estantería, electrónica simple, partes impresas en 3D y un ordenador de una sola tarjeta, que según los resultados permitió realizar amplificación de ADN y obtener mediciones cuantitativas de la cantidad inicial del material genético en las muestras. El sistema termociclador diseñado fue caracterizado y optimizado para alcanzar y controlar las temperaturas necesarias en un chip con micropozos para qPCR, obteniendo una precisión y exactitud en este control dentro del rango del estado del arte. Además, el instrumento fue construido con la capacidad de medir la intensidad de fluorescencia en micropozos usando un sensor de imagen, un filtro de emisión y una fuente de iluminación. Las imágenes de fluorescencia caracterizadas mostraron que el límite de detección permite obtener curvas de amplificación de PCR en tiempo real, aunque este sistema óptico no resultara ser tan sensible como el de un termociclador comercial debido a la calidad de sus componentes. Se realizaron experimentos de amplificación de PCR en tiempo real y se obtuvieron curvas de amplificación en concentraciones desde 0.064 (LOD) hasta 200 ng/ $\mu$ L y en base a estas curvas se concluyó que el sistema tiene la capacidad para cuantificar la concentración inicial de ADN presente en las muestras, lo que prueba su funcionalidad. El rendimiento y la eficiencia del instrumento resultaron ser menores que el de un termociclador comercial, aunque con la capacidad de ser portable, replicable y prácticamente sin costo.

## 7. Perspectivas

El instrumento permitió adquirir imágenes de pequeños volúmenes de soluciones fluorescentes bloqueando la luz de excitación de la fuente de iluminación y dejando pasar las señales fluorescentes de las moléculas en la solución. A pesar de que fue posible diferenciar entre distintas intensidades de fluorescencia, el sistema se encuentra lejos de bloquear totalmente la luz del LED y dejar pasar solamente la señal fluorescente. Sin embargo, es posible que con componentes ópticos de mayor calidad se pueda reducir el ruido de fondo y permitir límites de detección por debajo del obtenido.

Para finalizar los estudios aquí realizados sobre qPCR y tener un instrumento con impacto en la salud de las personas, es necesario realizar experimentos con muestras biológicas y genes patógenos, con lo cual este proyecto tendría un potencial de aplicación mayor.

Por otra parte, se puede incorporar el diseño de un dispositivo microfluídico para procesar muestras biológicas como pueden ser sangre completa, saliva o esputo, para hacer la plataforma más fácil de usar e incluso llevarla a un nivel de aplicación POC, ya que el sistema es totalmente escalable.

Las ventajas de este termociclador es que su precio está órdenes de magnitud por debajo de los termocicladores para dispositivos microfluídicos, con lo cual también se pueden probar otros dispositivos no sólo para PCR de muestras biológica sino para transcripción reversa de RNA, amplificaciones isotérmicas como LAMP o NASBA, incubación de células o incluso operaciones más complejas como PCR de células individuales.

El control de la temperatura podría resultar más preciso si se identificara una manera de no medir la temperatura directamente en la solución sino solamente en la superficie de la resistencia o incluso solo controlando la corriente que pasa a través de ella. Podría realizarse un modelado del sistema para ver la dinámica de transferencia de calor entre elementos.

## 8. Referencias

1. Wilton, S. and D. Cousins, *Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube*. Genome Research, 1992. **1**(4): p. 269-273.
2. Hartley, J.L., G.F. Temple, and M.A. Brasch, *DNA cloning using in vitro site-specific recombination*. Genome research, 2000. **10**(11): p. 1788-1795.
3. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method*. methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
4. Benecke, M., *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice*. Forensic Science International, 1998. **98**(3): p. 157-168.
5. Schönian, G., et al., *PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2003. **47**(1): p. 349-358.
6. Innis, M.A., et al., *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 2012: Academic press.
7. Saiki, R., et al., *Polymerase chain reaction*. Science, 1985. **230**: p. 1350-1354.
8. Nitsche, A., et al., *Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA*. Clinical Chemistry, 1999. **45**(11): p. 1932-1937.
9. Huang, M.-M., N. Arnheim, and M.F. Goodman, *Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR*. Nucleic acids research, 1992. **20**(17): p. 4567-4573.
10. Kellogg, D., et al., *TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase*. BioTechniques, 1994. **16**(6): p. 1134-1137.
11. Kermekchiev, M.B., A. Tzekov, and W.M. Barnes, *Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR*. Nucleic acids research, 2003. **31**(21): p. 6139-6147.
12. Lane, S., et al., *Amplicon secondary structure prevents target hybridization to oligonucleotide microarrays*. Biosensors and Bioelectronics, 2004. **20**(4): p. 728-735.
13. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome research, 1996. **6**(10): p. 986-994.
14. [ipc.nxgenomics.org](http://ipc.nxgenomics.org)

15. Viljoen, G.J., L.H. Nel, and J.R. Crowther, *Molecular diagnostic PCR handbook*. 2005: Springer Science & Business Media.
16. Valeur, B. and M.N. Berberan-Santos, *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2012: John Wiley & Sons.
17. Wolf, D.E., *Fundamentals of fluorescence and fluorescence microscopy*. Methods in cell biology, 2007. **81**: p. 63-91.
18. [https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes\\_shift](https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift).
19. Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster, *Current protocols: essential laboratory techniques*. 2008, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
20. Reichman, Jay., *Handbook of optical filters for fluorescence microscopy*. 2000: Chroma Technology Corporation.
21. Young, Ian T., *LEDs for fluorescence microscopy*. 2004: Proceedings of SPIE, vol. 5324.
22. Lee, T.H., *The design of CMOS radio-frequency integrated circuits*. 2003: Cambridge university press.
23. Sze, S.M., *Semiconductor sensors*. Vol. 55. 1994: Wiley New York.
24. [advancedlab.physics.gatech.edu/labs/photoelectric](http://advancedlab.physics.gatech.edu/labs/photoelectric).
25. Beiderman, Marianna., *A low-light CMOS contact imager with an emission filter for biosensing applications*. 2008: IEEE transactions on biomedical circuits and systems 2.3: 193-203.
26. <https://www.photonics.com/Article.aspx?PID=5&VID=19&IID=120&AID=22471>
27. Singh, Ritu Raj., *A CMOS/thin-film fluorescence contact imaging microsystem for DNA analysis*. 2016: IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers 57.5: 1029-1038.
28. Bayer, B.E., *Color imaging array*. 1976, Google Patents
29. [https://en.wikipedia.org/wiki/Bayer\\_filter](https://en.wikipedia.org/wiki/Bayer_filter)
30. Shaw, K.J., et al., *Rapid PCR amplification using a microfluidic device with integrated microwave heating and air impingement cooling*. Lab on a Chip, 2010. **10**(13): p. 1725-1728.
31. Oda, R., et al., *Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA*. Analytical chemistry, 1998. **70**(20): p. 4361-4368.
32. Roper, M.G., et al., *Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips*. Analytical chemistry, 2007. **79**(4): p. 1294-1300.
33. Almassian., *Portable nucleic acid thermocyclers*. Chemical Society Reviews 42.22, 2013: 8769-8798.



34. Wittwer, C., G.C. Fillmore, and D. Hillyard, *Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air*. *Nucleic acids research*, 1989. **17**(11): p. 4353-4357.
35. Bowlus, R.D. and S.C. Grether, *A Practical Polymerase Chain Reaction Laboratory for Introductory Biology Classes*. *American Biology Teacher*, 1996. **58**(3): p. 172-74.
36. Garrison, S.J. and C. dePamphilis, *Polymerase chain reaction for educational settings*. *The American Biology Teacher*, 1994: p. 476-481.
37. Khandurina, J., et al., *Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(13): p. 2995-3000.
38. Marcus, J.S., W.F. Anderson, and S.R. Quake, *Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics*. *Analytical chemistry*, 2006. **78**(3): p. 956-958.
39. Zou, Q. and U. Sridhar, *Miniaturized multi-chamber thermal cyclers for independent thermal multiplexing*. 2004, Google Patents
40. Sanders, Rebecca., *Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification*. *PLoS One*, 2013. 8:9: e75296.
41. Lien, Kang-Yi, et al., *Integrated reverse transcription polymerase chain reaction systems for virus detection*. *Biosensors and Bioelectronics* 22.8, 2007. p. 1739-1748.
42. Jiang, L., et al., *Solar thermal polymerase chain reaction for smartphone-assisted molecular diagnostics*. *Scientific reports*, 2014. **4**: p. 4137.
43. Ahrberg, C.D., A. Manz, and B.G. Chung, *Polymerase chain reaction in microfluidic devices*. *Lab on a Chip*, 2016. **16**(20): p. 3866-3884.
44. Ahrberg, C.D., et al., *Handheld real-time PCR device*. *Lab on a Chip*, 2016. **16**(3): p. 586-592.
45. Priye, A., et al., *Lab-on-a-drone: toward pinpoint deployment of smartphone-enabled nucleic acid-based diagnostics for mobile health care*. *Analytical chemistry*, 2016. **88**(9): p. 4651-4660.
46. Gross, B.C., et al., *Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences*. 2014, ACS Publications.
47. Dhankani, K.C. and J.M. Pearce, *Open source laboratory sample rotator mixer and shaker*. *HardwareX*, 2017. **1**: p. 1-12.
48. Wijnen, B., et al., *Free and open-source automated 3-D microscope*. *Journal of microscopy*, 2016. **264**(2): p. 238-246.
49. Pearce, J.M., N. Anzalone, and C. Heldt, *Open-source wax RepRap 3-D printer for rapid prototyping paper-based microfluidics*. *Journal of laboratory automation*, 2016. **21**(4): p. 510-516.
50. Dryden, M.D., et al., *Upon the Shoulders of Giants: Open-Source Hardware and Software in Analytical Chemistry*. *Analytical Chemistry*, 2017. **89**(8): p. 4330-4338.

51. Dosemagen, S., M. Liboiron, and J. Molloy, *Gathering for Open Science Hardware 2016*. Journal of Open Hardware, 2017. 1(1).
52. Pearce, J.M., *Building research equipment with free, open-source hardware*. Science, 2012. 337(6100): p. 1303-1304.
53. Reddy, P., *The Legal Dimension of 3D Printing: Analyzing Secondary Liability in Additive Layer Manufacture*. 2014: Colum. Sci. & Tech. L. Rev., 16, 222.
54. <https://traverseda.wordpress.com>
55. Marlin, Thomas E. *Process control*. New York: McGraw-Hill, 2000
56. Skandarajah, A., et al., *Quantitative imaging with a mobile phone microscope*. PloS one, 2014. 9(5): p. e96906.
57. Steinhart, J.S. and S.R. Hart. *Calibration curves for thermistors*. in *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*. 1968. Elsevier.
58. Sun, Hao.; *A multi-layer microchip for high-throughput single-cell gene expression profiling*. Analytical biochemistry 508, 2016: 1-8.
59. Larionov, A., A. Krause, and W. Miller, *A standard curve based method for relative real time PCR data processing*. BMC bioinformatics, 2005. 6(1): p. 62.

# 9. Apéndices

## Apéndice A: Script en Python para el control de temperatura

Programa que permite controlar la temperatura.

```
#All the necessary functions related to temperature
import Adafruit_MCP3008
from math import log

#ADC's SPI pins
CLK          = 18
#Initialize adc software SPI configuration:
MISO         = 23
MOSI        = 24
CS           = 25
mcp          = Adafruit_MCP3008.MCP3008(clk=CLK, cs=CS, miso=MISO, mosi=MOSI)

#5K thermistor parameters ("the third thermistor calibrated")
ACOEFFICIENT = 0.00096286
BCOEFFICIENT = 0.0002751
CCOEFFICIENT = 0.000000078795
NUMSAMPLES   = 5
SERIESRESISTOR = 9880.0
samples      = [NUMSAMPLES]

def ReadTemperature():
    #Read the thermistor and convert to celsius
    for x in range(0,NUMSAMPLES):
        samples[x] = mcp.read_adc(0)
    sample = mcp.read_adc(0)
    average = 1023.0 / sample - 1
    average = SERIESRESISTOR / average
    steinhart = pow(log(average), 3)                #(ln(R))3
    steinhart = CCOEFFICIENT*steinhart             #C * (ln(R))3
    steinhart = BCOEFFICIENT*log(average) + steinhart #B * ln(R) + C * (ln(R))3
    steinhart = ACOEFFICIENT + steinhart           #A + B * ln(R) + C * (ln(R))3
    steinhart = 1.0 / steinhart                    #Invert
    steinhart = steinhart - 273.15                 #convert to C
    return Steinhart

#####
#                               Definiciones                               #
#                               #                                           #
#####
DENATURE_TEMP          = 95.0 #Celsius
ANNEALING_TEMP        = 60.0
UNG_INCUBATION_TEMP   = 50.0
DENATURE_TIME         = 18;
#Duración de las fases en s. 3 - 5 s más para dar tiempo a que se estabilice
ANNEALING_TIME        = 64;
POLYMERASE_ACTIVATION_TIME = 605;
```

```

UNG_INCUBATION_TIME          = 125;

NUM_CYCLES                   = 10
current_cycle                 = 1
#####
#                               Pines para comunicación con periféricos      #
#                               #                                             #
#####
GPIO.setmode(GPIO.BCM)
GPIO.setwarnings(False)
heatPin                       = 21
GPIO.setup(heatPin, GPIO.OUT)
GPIO.output(heatPin, GPIO.HIGH) #Lógica negativa en todos los pines debido a la
configuración de los transistores
fanPin                        = 20
GPIO.setup(fanPin, GPIO.OUT)
GPIO.output(fanPin, GPIO.HIGH)

#####
#                               Hilo para el control de la temperatura y los ciclos      #
class PCRThread(threading.Thread):
    def __init__(self):
        threading.Thread.__init__(self)
        self._stop = threading.Event()

    def run(self):
        global Temp
        global heatPin
        global fanPin
        global breakFlag
        global current_cycle
        global take_fluorescence

        while ((not self._stop.isSet()) and (current_cycle < (NUM_CYCLES+1))):

            if(current_cycle == 1):
                #Calentar
                Temp = ReadTemperature() #Lee la temperatura actual
                while((Temp<(UNG_INCUBATION_TEMP)) and (not breakFlag)):
                    Setpoint = UNG_INCUBATION_TEMP
                    myPID.Compute(); #Bucle PID
                    heatPin.ChangeDutyCycle(Output1)
                #Escribe la salida del PWM a la resistencia
                    fanPin.ChangeDutyCycle(0)
                #Mantén apagado el ventilador

                #Mantener la temperatura de incubación de la UNG
                startTime = time.time()
                timeElapsed = 0
                while((timeElapsed < UNG_INCUBATION_TIME) and (not breakFlag)):
                    myPID.Compute();
                    heatPin.ChangeDutyCycle(Output1)
                    fanPin.ChangeDutyCycle(Output2)

```

```

        timeElapsed = time.time() - startTime

        #Calentar
        Temp = ReadTemperature() #Lee la temperatura actual
        while((Temp<(DENATURE_TEMP)) and (not breakFlag)):
            Setpoint = DENATURE_TEMP
            myPID.Compute(); #Bucle PID
            heatPin.ChangeDutyCycle(Output1)
#Escribe la salida del PWM a la resistencia
            fanPin.ChangeDutyCycle(0)
#Mantén apagado el ventilador

        #Mantener la temperatura de incubación de la polimerasa
        startTime = time.time()
        timeElapsed = 0
        while((timeElapsed < POLYMERASE_ACTIVATION_TIME) and (not breakFlag)):
            myPID.Compute();
            heatPin.ChangeDutyCycle(Output1)
            fanPin.ChangeDutyCycle(Output2)
            timeElapsed = time.time() - startTime

        #Mantener la temperatura de desnaturalización
        startTime = time.time()
        timeElapsed = 0
        while((timeElapsed < DENATURE_TIME) and (not breakFlag)):
            myPID.Compute();
            heatPin.ChangeDutyCycle(Output1)
            fanPin.ChangeDutyCycle(Output2)
            timeElapsed = time.time() - startTime

        #Enfriar a la temperatura de alineación
        while ((Temp > (ANNEALING_TEMP+3)) and (not breakFlag)): #Turn off the
fan a bit before
            myPID.Compute();
            heatPin.ChangeDutyCycle(0)
            fanPin.ChangeDutyCycle(Output2)

        #Mantener la temperatura de alineación
        startTime = time.time()
        timeElapsed = 0
        while((timeElapsed < ANNEALING_TIME) and (not breakFlag)):
            if((ANNEALING_TIME-3)<timeElapsed<(ANNEALING_TIME-2)): #Hay un
retraso de 2 s en el hilo de la cámara
                take_fluorescence = 1 #por lo
que la bandera se lama 3 s antes del fin
            myPID.Compute();
            heatPin.ChangeDutyCycle(Output1)
            fanPin.ChangeDutyCycle(Output2)
            timeElapsed = time.time() - startTime

        current_cycle = current_cycle+1

```

## Apéndice B: Script en Python para medición de fluorescencia en tiempo real

Programa que permite capturar imágenes, analizarlas y desplegar los valores en una interfaz gráfica en tiempo real.

```
# Esta función obtiene las coordenadas en la imagen del punto donde el usuario
# da click para elegir cada ROI
#####
def click_center(event, x, y, flags, param):
    global x_center, y_center, refPt
    if event == cv2.EVENT_LBUTTONDOWN:
        refPt = [(x, y)]
        x_center = refPt[0][0]
        y_center = refPt[0][1]

        #dibuja un círculo
        cv2.namedWindow("image", cv2.WINDOW_NORMAL)
        cv2.imshow("image", img)

# Esta función realiza una transformada gamma sobre la imagen
#####
def gamma_correction(image, gamma):
    table = np.array([((i / 255.0) ** gamma) * 255
                      for i in np.arange(0, 256)]).astype("uint8")
    return cv2.LUT(image, table)

# Esta función verifica si un pixel se encuentra dentro del círculo de la ROI #
#####
def in_circle(center_x, center_y, r, x, y):
    square_dist = (center_x - x) ** 2 + (center_y - y) ** 2
    if (square_dist <= r ** 2):
        return True
    else:
        return False

#####
Hilo para la adquisición de imágenes de fluorescencia y su procesamiento
#####

class FluorescenceThread(threading.Thread):
    def __init__(self):
        threading.Thread.__init__(self)
        self._stop = threading.Event()

    def run(self):
```

```

while not self._stop.isSet():
    global camera
    global intensities
    global take_fluorescence
    global buffer_fluorescence

    if(take_fluorescence):
        counter = 0
        camera.iso = 800
        time.sleep(2)
        camera.shutter_speed = 400000 #400 ms
        camera.exposure_mode = "off"
        camera.awb_mode = "off"
        cap = picamera.array.PiRGBArray(camera, size = (2560, 1920))
        GPIO.output(LedPin, GPIO.HIGH)
        camera.capture(cap, format = "bgr", resize = (2560, 1920))
        GPIO.output(LedPin, GPIO.LOW)
        img = cap.array
        img = gamma_correction(img, 2.4)
        b, g, r = cv2.split(img)

        g1 = g[(Circles[0][1]-100):(Circles[0][1]+100),(Circles[0][0]-
100):(Circles[0][0]+100)]
        g2 = g[Circles[1][1]-100:Circles[1][1]+100,Circles[1][0]-
100:Circles[1][0]+100]
        g3 = g[Circles[2][1]-100:Circles[2][1]+100,Circles[2][0]-
100:Circles[2][0]+100]
        g4 = g[Circles[3][1]-100:Circles[3][1]+100,Circles[3][0]-
100:Circles[3][0]+100]

        for h in range (g1.shape[0]):
            for w in range (g1.shape[1]):
                condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
                if (condition):
                    intensities[0] =
intensities[0] + g1[h][w]
                    counter = counter + 1

        for h in range (g2.shape[0]):
            for w in range (g2.shape[1]):
                condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
                if (condition):
                    intensities[1] =
intensities[1] + g2[h][w]

        for h in range (g3.shape[0]):
            for w in range (g3.shape[1]):
                condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
                if (condition):
                    intensities[2] =
intensities[2] + g3[h][w]

        for h in range (g4.shape[0]):
            for w in range (g4.shape[1]):

```

```

        condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
        if (condition):
            intensities[3] = intensities[3] + g4[h][w]

    intensities[0] = (intensities[0]/counter) - background[0]
    intensities[1] = (intensities[1]/counter) - background[1]
    intensities[2] = (intensities[2]/counter) - background[2]
    intensities[3] = (intensities[3]/counter) - background[3]
    print intensities

    #Despliega la imagen de la 1er ROI en la GUI
    img2 = cv2.resize(g1, (320,240))
    img2FromArray = Image.fromarray(img2)
    imgtk = ImageTk.PhotoImage(image =img2FromArray)
    cam_canvas.itemconfig(image_on_canvas, imag = imgtk)
    cam_canvas.imgtk = imgtk

    take_fluorescence = 0
    buffer_fluorescence = 1

    time.sleep(2)

# Hilo para llenar el buffer de cada gráfica
class BufferThread(threading.Thread):
    def __init__(self):
        threading.Thread.__init__(self)
        self._stop = threading.Event()

    def run(self):
        while not self._stop.isSet():
            global values
            global samples
            global Temp
            global samples_fluo
            global values_fluo
            global intensities
            global buffer_fluorescence
            global plot_fluorescence

            self.LastSample = Temp
            self.sample = np.array([self.LastSample, round(time.time()-StartTime,2)])
            samples = np.append(samples, [self.sample], 0) #Arreglo a escribir en
el archivo
            values.append(self.LastSample) #Arreglo a graficar
            if(buffer_fluorescence): #Agrega valores
sólo cuando haya datos de fluorescencia
                self.LastSampleFluo0 = intensities[0]
                self.LastSampleFluo1 = intensities[1]
                self.LastSampleFluo2 = intensities[2]
                self.LastSampleFluo3 = intensities[3]
                self.sampleFluo = np.array([self.LastSampleFluo0,
self.LastSampleFluo1, self.LastSampleFluo2, self.LastSampleFluo3, current_cycle])
                samples_fluo = np.append(samples_fluo, [self.sampleFluo], 0)

```



```

        values_fluo.append(intensities[0])
        buffer_fluorescence = 0
        plot_fluorescence = 1
    time.sleep(0.5)

# Hilo para graficar los datos en buffer
class RealtimePloterThread(threading.Thread):
    def __init__(self):
        threading.Thread.__init__(self)
        self._stop = threading.Event()

    def run(self):
        while not self._stop.isSet():
            global plot_fluorescence
            NumberSamples=min(len(values),wScale.get())
            CurrentXAxis=pylab.arange(len(values)-NumberSamples,len(values),1)
            line1[0].set_data(CurrentXAxis,pylab.array(values[-NumberSamples:]))
            ax.axis([CurrentXAxis.min(),CurrentXAxis.max(),23,100])
            if(plot_fluorescence):
                NumberSamplesFluo=min(len(values_fluo),NUM_CYCLES)
                CurrentXAxisFluo=pylab.arange(len(values_fluo)-NumberSamplesFluo,
len(values_fluo),1)
                line1_two[0].set_data(CurrentXAxisFluo,pylab.array(values_fluo[-
NumberSamplesFluo:]))
                ax2.axis([CurrentXAxisFluo.min(),CurrentXAxisFluo.max(),0,40])
                plot_fluorescence = 0
            canvas.draw() #Graficar
            time.sleep(0.02)

```

## Apéndice C: Script en Python para la interfaz gráfica de usuario

Programa que permite iniciar el termociclador, observar resultados en tiempo real, detener el programa, guardar datos y seleccionar valores de temperaturas y duración de ciclos.

```
#####
#                               Librerías que se importan                               #
#                                                                           #
import pylab                    #para las gráficas
from pylab import *
import numpy as np             #para operaciones vectoriales
import Tkinter                #para la interfaz gráfica
import tkMessageBox
import time                    #para funciones de tiempo
import RPi.GPIO as GPIO       #entradas y salidas
import threading              #para la programación multihilos
from PIL import Image         #para mostrar imágenes en la
interfaz gráfica
import cv2                    #para procesamiento de imágenes
#####

# Cuando se oprime el botón de inicio se inician los hilos paralelos y se miden
# las intensidades de fondo de cada ROI
#####
def start_pressed():
    global StartTime
    global thread1
    global thread2
    global thread3
    global thread4
    global camera
    global Circles
    global LedPin
    global background
    global img

    counter = 0
    camera.iso = 800
    time.sleep(2)
    camera.shutter_speed = 400000 #400 ms
    camera.exposure_mode = "off"
    camera.awb_mode = "off"
    cap = picamera.array.PiRGBArray(camera, size = (2560, 1920))
    GPIO.output(LedPin, GPIO.HIGH) #Enciende el LED
    camera.capture(cap, format = "bgr", resize = (2560, 1920)) #Adquiere una
imagen del sensor
    GPIO.output(LedPin, GPIO.LOW) #Apaga el LED
    img = cap.array
```

```

img = gamma_correction(img, 2.4) #Aplica transformada gamma
b, g, r = cv2.split(img)

#selecciona las ROIs
for click in range(0,4):
    cv2.namedWindow("image", cv2.WINDOW_NORMAL)
    cv2.setMouseCallback("image", click_center)

while True:

    cv2.imshow("image", img)
    key = cv2.waitKey(1) & 0xFF

    if key == ord("r"):
        print "circle captured, you pressed r"
        break

    if len(refPt) == 1:
        Circles[click][0] = x_center
        Circles[click][1] = y_center

cv2.destroyAllWindows()
cv2.waitKey(1)
cv2.waitKey(1)
cv2.waitKey(1)
cv2.waitKey(1)

#Corta cada ROI en un arreglo por separado
g1 = g[Circles[0][1]-100:Circles[0][1]+100,Circles[0][0]-100:Circles[0][0]+100]
g2 = g[Circles[1][1]-100:Circles[1][1]+100,Circles[1][0]-100:Circles[1][0]+100]
g3 = g[Circles[2][1]-100:Circles[2][1]+100,Circles[2][0]-100:Circles[2][0]+100]
g4 = g[Circles[3][1]-100:Circles[3][1]+100,Circles[3][0]-100:Circles[3][0]+100]

#Mide el promedio de la intensidad en cada ROI
for h in range (g1.shape[0]):
    for w in range (g1.shape[1]):
        condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
        if (condition):
            background[0] = background[0] + g1[h][w]
            counter = counter + 1

for h in range (g2.shape[0]):
    for w in range (g2.shape[1]):
        condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
        if (condition):
            background[1] = background[1] + g2[h][w]

for h in range (g3.shape[0]):
    for w in range (g3.shape[1]):
        condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
        if (condition):
            background[2] = background[2] + g3[h][w]

```

```

for h in range (g4.shape[0]):
    for w in range (g4.shape[1]):
        condition = in_circle(100, 100, radius, w, h)
        if (condition):
            background[3] = background[3] + g4[h][w]

background[0] = background[0]/counter
background[1] = background[1]/counter
background[2] = background[2]/counter
background[3] = background[3]/counter
print background

#Inician hilos paralelos
StartTime = time.time()
thread1 = PCRThread()
thread1.start()
thread2 = FluorescenceThread()
thread2.start()
thread3 = BufferThread()
thread3.start()
thread4 = RealtimePloterThread()
thread4.start()

# Cuando se oprime el botón de detener PCR, se detienen los hilos y se guardan los
datos #
def stop_pressed():
    global thread1
    global thread2
    global thread3
    global thread4
    global heatPin, fanPin, LedPin
    global breakFlag

    if tkMessageBox.askokcancel('Stop Sampling?', 'Are you sure you want to Stop
Sampling? '):
        dataFile = fileName.get()
        if (len(dataFile) == 0):
            dataFile = "dataFile"

            dataFile=''.join(["/home/pi/Documents",dataFile, ".txt"])

        try:
            np.savetxt(dataFile, samples, fmt='%.1f', delimiter=' , ')

np.savetxt("/home/pi/Documents/PruebasOscar/DataFile_Fluo_Saved.txt", samples_fluo,
fmt='%.1f', delimiter=' , ')

        except:
            np.savetxt("/home/pi/Documents/DataFile_Saved.txt", samples,
fmt='%.1f', delimiter=' , ')
            np.savetxt("/home/pi/Documents/DataFile_Fluo_Saved.txt",
samples_fluo, fmt='%.1f', delimiter=' , ')

```

```

    if thread1.isAlive():
        breakFlag = 1
        thread1._stop.set()
    if thread2.isAlive():
        thread2._stop.set()
    if thread3.isAlive():
        thread3._stop.set()
    if thread4.isAlive():
        thread4._stop.set()
    GPIO.output(heatPin, GPIO.HIGH)
    GPIO.output(fanPin, GPIO.HIGH)
    GPIO.output(LedPin, GPIO.HIGH)

# Cuando se oprime el botón de quitar, se detienen los hilos y el programa de la GUI
#
#####
def _quit():
    global thread1
    global thread2
    global thread3
    global thread4
    global breakFlag
    global heatPin, fanPin, LedPin

    if tkMessageBox.askokcancel('Quit?', 'Are you sure you want to quit?'):
        if thread1.isAlive():
            breakFlag = 1
            thread1._stop.set()
        if thread2.isAlive():
            thread2._stop.set()
        if thread3.isAlive():
            thread3._stop.set()
        if thread4.isAlive():
            thread4._stop.set()
        GPIO.output(heatPin, GPIO.HIGH)
        GPIO.output(fanPin, GPIO.HIGH)
        GPIO.output(LedPin, GPIO.HIGH)
        camera.close()
        root.quit()

        root.destroy()

#####
#          Graphical User Interface GUI                                     #
#####
root = Tkinter.Tk()
root.wm_title("BioARTS PCR")
root.geometry('1005x605')

#Canvas de la gráfica de temperatura
xAchse=pylab.arange(0,100,1)
yAchse=pylab.array([0]*100)

```

```

fig = pylab.figure(figsize=(3,3))      #pulgadas
ax = fig.add_subplot(121)
ax.grid(True)
ax.set_title("Temperature Plot")
ax.set_xlabel("Time (s)")
ax.set_ylabel("Temperature (C)")
ax.axis([0,100,23,100])
line1=ax.plot(xAchse,yAchse, '- ')

canvas = FigureCanvasTkAgg(fig, master=root)
canvas.show()
canvas.get_tk_widget().pack(side=Tkinter.TOP, fill=Tkinter.BOTH, expand=1)

#Canvas de la gráfica de fluorescencia
xAchse2=pylab.arange(0,NUM_CYCLES,1)
yAchse2=pylab.array([0]*NUM_CYCLES)

ax2 = fig.add_subplot(122)
ax2.grid(True)
ax2.set_title("Amplification Plot")
ax2.set_xlabel("Cycle")
ax2.set_ylabel("Delta fluorescence")
ax2.axis([0,NUM_CYCLES,0,NUM_CYCLES])
line1_two=ax2.plot(xAchse2,yAchse2, '- ')

toolbar = NavigationToolbar2TkAgg( canvas, root )
toolbar.update()
canvas._tkcanvas.pack(side=Tkinter.TOP, fill=Tkinter.BOTH, expand=1)
#Canvas del segmento de la imagen
default_photo
ImageTk.PhotoImage(Image.open("/home/pi/Documents/PruebasOscar/Cinvestav.png"))
cam_canvas = Tkinter.Canvas(root, width = 152, height = 181)
cam_canvas.pack(side=Tkinter.RIGHT, fill=Tkinter.BOTH, expand=1)
image_on_canvas = cam_canvas.create_image(100,100, image = default_photo)

#Botones
quit_button = Tkinter.Button(master=root, text='Quit', command=_quit)
quit_button.pack(side=Tkinter.LEFT)

stop_button = Tkinter.Button(master=root, width=25, height = 1, text='Stop Sampling
and Save Data to File', command=stop_pressed)
stop_button.pack(side=Tkinter.LEFT)

start_button = Tkinter.Button(master=root, width=25, height=1, text='Start',
command=start_pressed)
start_button.pack(side=Tkinter.LEFT)

#Entrada para poner el nombre del archivo a guardar
fileName = Tkinter.StringVar()
Tkinter.Entry(master=root, width = 20, textvariable =
fileName).pack(side=Tkinter.LEFT)
fileNameLabel = Tkinter.Label(master=root, bg = 'light grey', text='Enter File Name')
fileNameLabel.pack(side=Tkinter.LEFT)

```

```
wScale = Tkinter.Scale(master=root,label="View Width:", from_=3,
to=1000,sliderlength=30, #Longitud de la escala de la gráfica de temperatura
length=ax.patch.get_window_extent().width,
orient=Tkinter.HORIZONTAL)
wScale.pack(side=Tkinter.LEFT)

wScale.set(100)

root.protocol("WM_DELETE_WINDOW", _quit)
Tkinter.mainloop() #Hilo principal de la GUI
```