

Universidad de El Salvador

Facultad de Ciencias Naturales y Matemática

Escuela de Física



Trabajo de Graduación

Determinación de compuestos de glicación avanzada (AGE) en tejido humano por método no invasivo de espectroscopia óptica”

Presentado Por:
Ricardo Amílcar Canjura Guzmán
Carnet CG06043

Para optar al grado de
Licenciado en física

Docente Director
Dr. Carlos Ernesto Rudamas Flores

Ciudad universitaria, 24 de noviembre de 2014

Aprobación de docente director:

Prof. Dr. Carlos Ernesto Rudamas Flores

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR:

Ing. Mario Roberto Nieto

SECRETARIA GENERAL:

Dra. Ana Leticia Zavaleta de Amaya

FISCAL GENERAL:

Lic. Francisco Cruz Letona

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y MATEMÁTICA:

M. Sc. Martín Enrique Guerra Cáceres

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE FÍSICA:

M. Sc. Victor Laureano Cortez Lara

Ciudad universitaria, 24 de noviembre de 2014

Agradecimientos

A todas aquellas personas , que me ayudaron y me siguen ayudando a desarrollarme como persona humana, en este pequeño lapso del tiempo, al cual pretendo llamar una larga vida

Índice general

Agradecimientos	I
Lista de figuras	IV
Lista de tablas	VII
1. Introducción	3
2. Fundamentación teórica	5
2.1. Conceptos básicos	5
2.2. Problemas asociados a la glucosa	6
2.2.1. Productos finales de glicación (AGE).	7
2.2.2. Métodos no invasivos	8
2.3. Interacción de la radiación con la materia	9
2.3.1. Ley de Beer Lambert	10
2.3.2. Absorción y emisión	10
2.4. Antecedentes de la investigación	11
3. Experimento	15
3.1. Equipo a utilizar	15
3.2. Construcción de equipo y montaje experimental.	18
3.3. Proceso para toma de datos	19
3.4. Eficiencia del detector y sensibilidad de la CCD	20
3.5. Población a medir	22
4. Resultados y discusión	23
4.1. Equipo construido	23
4.2. Área de obtención de la medida	24
4.3. Personas a medir	24

4.4. Comparación de resultados	27
4.5. Análisis del espectro	28
4.6. Resultados de los espectros de fluorescencia de tejido humano	34
4.7. Análisis de suero de sangre	39
5. Conclusiones y recomendaciones	43
5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	44
6. Anexos	51

Índice de figuras

2.1. Esquema de generacion de AGE [13]	8
2.2. Principales fenómenos de la interacción de la radiación con la materia.[16]	9
2.3. Diagrama de Perrin-Jablonski representado la absorción y emisión, S0; S1; S2: estados electrónicos singlete, IC: conversión interna [16].	11
2.4. Espectro de fluorescencia de piel medido en persona, que tiene diabetes mellitus e insuficiencia renal, diabetes mellitus , insuficiencia renal y en control, DM: diabetes mellitus, HD hemodiálisis [8].	12
2.5. Emisión de la piel,obtenida en diferentes partes del cuerpo [19].	13
2.6. Emisión de la piel con diferentes fuentes de excitación [20]. . .	14
3.1. sensibilidad de la rejilla de difraccion y la sensibilidad del detector del espectrógrafo USB4000[22]	16
3.2. Montaje para evitar la radiación dispersa.	17
3.3. Espectro de lámpara de mercurio (Laboratorio de Espectroscopía Óptica, Escuela de Física, UES)	17
3.4. Transmitancia de filtros	18
3.5. Esquema de excitación para la toma de datos	19
3.6. proceso para obtener medidas de fotoluminiscencia de AGE . .	20
3.7. Resultado de la de fluorescencia de piel al ser filtradas por la sensibilidad del detector y la eficiencia de la rejilla de difracción	21
4.1. Equipo construido para medir la fluorescencia de la piel	23
4.2. Medidas de fluorescencia obtenidas de diferentes partes del cuerpo	25

4.3.	Fluorescencia de la piel referente a personas de la tabla 4.2 . . .	26
4.4.	Fluorescencia de la piel referente a personas de la tabla 4.2 . . .	27
4.5.	comparación de medidas obtenidas con otros autores	28
4.6.	Resultado de un espectro de fluorescencia de la piel excitación 365nm	29
4.7.	Resultado de la deconvolución del espectro de fluorescencia de la piel	30
4.8.	Mapa de contorno de fluorescencia de la piel al variar el máxi- mo de excitación [26]	32
4.9.	compuestos determinados del espectro florescencia de tejido humano	33
4.10.	Espectros de fluorescencia de la piel en persona con problema renal y persona normal	34
4.11.	Comportamiento del colágeno cruzado extraído del espectro mostrado en figura 3.10(izquierda). Comparación de espectro de colágeno cruzado en personas con fallo renal,diabetes y sa- nos (derecha)	35
4.12.	Espectro de fluorescencia medidos en piel de personas trigueña sin complicaciones renales o padecimientos diabeticos	35
4.13.	Espectros medidos en piel trigueña en rojo femenino y en negro masculino	36
4.14.	Espectros medidos en piel trigueña con persona que fuma con posible diabetes en color rojo y persona que no fuma en color negro	37
4.15.	Espectros medidos en piel trigueña con persona que fuma con posible diabetes(negro), persona con diabetes(rojo) y persona que no fuma (azul)	38
4.16.	Fluorescencia de suero de sangre de personas sanas (excitación = 365nm)	39
4.17.	Fluorescencia de suero de sangre de personas que presentan problemas renales (excitación = 365nm)	40
4.18.	Comparación espectros de florescencia de suero de sangre de personas con fallos renal y personas sanas	41
4.19.	Fluorescencia de suero de sangre en en personas que presentan etapa cercana de cáncer ,etapa avanzada de cáncer, personas sanas [27]	41

4.20. Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores espectros en color negro IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milan Italia[28]. En azul espectro medido por nuestro montaje experimental 42

6.1. Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en palma por E. Borisova [20] 51

6.2. Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en brazo por E. Borisova [20] 52

6.3. Espectros de fluorescencia normalizados 52

6.4. Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en piel por H.Zeng [29] 53

6.5. Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en brazo por M. Koetsier [7] 53

6.6. Comparación de espectros de fluorescencia de suero persona sana y persona con fallo renal 54

6.7. Comportamiento del área bajo la curva de espectros de fluorescencia de personas sanas y personas con insuficiencia renal . 54

Índice de tablas

4.1. Principales datos de las personas, las cuales se realizaron la medida de fluorescencia de la piel Agosto 2013	25
4.2. Principales datos de las personas, las cuales se realizaron la medida de fluorescencia de la piel Agosto 2013	26
4.3. Datos de los máximos asociados al espectro de fluorescencia	31
4.4. Datos de principales fluoróforos de la piel [20]	31

Capítulo 1

Introducción

Poder determinar concentraciones de glucosa por métodos no invasivos en humanos es un objetivo de mucha importancia para grupos de investigación [1], anteriormente se desarrollaron métodos sin el éxito esperado, ya que estos no reproducían la exactitud como para poder diagnosticar una enfermedad en personas humanas [1].

Un método no invasivo de diagnóstico en medicina permite realizar la medida de un componente o parámetro físico, sin tener contacto con un fluido biológico representativo del cuerpo humano [1]. Diversos estudios han revelado una estrecha relación entre la autofluorescencia de la piel y complicaciones diabéticas y enfermedades renales [2]. Esta autofluorescencia esta vinculada con la acumulación de compuestos de glicación avanzada (AGE) [3]. Esto induce a poder determinar consecuencias relacionadas a dicha enfermedad, basándonos de manera menos invasiva y utilizar como método de diagnóstico la autofluorescencia de la piel. En el presente trabajo se pretende desarrollar un análisis de la fluorescencia de la piel en personas sanas y que presentan dichas enfermedades, para que pueda funcionar como marcador no invasivo en tejido humano, de las consecuencias de estas enfermedades a través de las técnica de espectroscopia óptica, esto será un avance muy importante ya que se podría predecir complicaciones relacionadas con la diabetes e insuficiencia renal [1]. El cuerpo de este trabajo está compuesto por cuatro secciones las cuales son: 1) fundamentación teórica es la base y los conceptos físicos que se emplean en el desarrollo de la investigación como base para poder poner en practica la teoría y aplicarla a un problema real, 2) el experimento en el cual los procesos de adquisición y toma de datos en la práctica lo cual implica el implementar la técnica específica para poder solucionar un

problema, 3) Resultados y discusión describimos de manera detallada la información que nuestros datos nos presentan , 4) planteamos las conclusiones de este con la finalidad de presentar ideas mas claras de esta investigación y brindar información específica para futuras investigaciones en esta. Al final presentamos la sección de anexos, estos brindan detalles mas específicos de esta investigación .

Capítulo 2

Fundamentación teórica

La diabetes es una afección crónica que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina, o cuando el organismo no consigue utilizar la insulina que produce [9]. En este capítulo se describe la relación de la glucosa con la diabetes y las consecuencias de esto. Además, se aborda el tema de la interacción de la radiación con la materia como soporte para la aplicación de la fluorescencia, como técnica espectroscópica, para un posible marcador indirecto de la determinación de compuestos de glicación avanzada y su relación con la diabetes mellitus.

2.1. Conceptos básicos

La relación que esta presenten entre las personas diabéticas y las concentraciones de glucosa es un estudio que es de mucha importancia para grupos de investigación [10], en especial diagnóstico no invasivos. Esto es de gran ayuda para esta investigación ,ya que da pautas para comprender el avance de estos diagnósticos. El páncreas es el órgano encargado de producir la insulina y otras sustancias de importancia para nuestro cuerpo, el problema de la diabetes se presenta cuando la insulina que produce el páncreas no es suficiente o está no realiza su función específica [10]. La función principal de la insulina es la de transformar la glucosa (azúcar muy representativo de esta amplia familia química) proveniente de los alimentos, principal fuente de energía que el organismo necesita para su funcionamiento o metabolismo [11]. La falta de insulina provoca un aumento de glucosa y esto a su vez produce hiperglucemia, lo que significa que los niveles de esta azúcar en la sangre son

más elevados que los normales [1]. La hemoglobina es la parte de los glóbulos rojos encargada de transportar el oxígeno a la células, en circunstancias esta hemoglobina se enlaza con la glucosa en el torrente sanguíneo produciendo la hemoglobina glicosilada [12], esto se convierte en un indicador de la cantidad de azúcar presente en la sangre. Los AGE son la vinculación de la glucosa con alguna proteína [12]. Para nuestro caso la relación más importante es con la hemoglobina, de ahí que la existencia de AGE en personas diabéticas es evidente en muchos estudios [8]. Además la medición de AGE puede dar diagnósticos más anticipados de la diabetes y contribuir a mantener un control glucémico [5]

2.2. Problemas asociados a la glucosa

Las complicaciones relacionadas con los niveles no adecuados de glucosa en el cuerpo humano son diversos, constituyendo un tema de mucha importancia en los servicios de salud, ya que se observa un aumento de casos relacionados a estos problemas en los últimos tiempos. Actualmente la principal enfermedad relacionada con niveles altos de glucosa en la sangre es la diabetes mellitus tipo 2 esta enfermedad afecta aproximadamente a 230 millones de personas en el mundo, en El Salvador se reportan 800,000 personas aproximadamente el 14 % de la población salvadoreña [4]. Se estima que para el 2030 esta cantidad se duplique, la causa de esto es que muchas personas aun no han sido diagnosticadas y esto implica no tener una dieta adecuada, para tales casos [9], cuyo padecimiento se tipifica como una enfermedad crónica que conlleva una serie de complicaciones, tales como: hipertensión arterial, accidentes cerebrovasculares (derrames cerebrales), insuficiencia renal, ceguera, entre otros..

Las enfermedades del corazón y derrame cerebral

En 2004, los certificados de defunción relacionados con la diabetes, en personas de 65 años o más, reportaron el 68 % a causa de enfermedades cardíacas; y 16 %, derrame cerebral [9].

Hipertensión. En el período 2005-2008, adultos de 20 años en adelante con percepción de diabetes, de estos el 67 % tenía la presión arterial mayor o igual a 140/90 mmHg, estos valores corresponden a los parámetros inferior de hipertensión) no usaron medicamentos para su control. [9] .

Ceguera. La diabetes es la causa de muchos casos de ceguera entre adultos de 20-74 años. En el período 2005-2008, 4,2 millones (28,5 % E.E.U.U.) personas diabéticas mayores de 40 años o más padecían retinopatía. [9].

Enfermedad de los riñones. La diabetes es la causa principal de insuficiencia renal, lo que representa el 44 % de los casos nuevos en 2008. En 2008, 48.374 personas con diabetes comenzaron tratamiento por esta enfermedad renal en estado terminal en los Estados Unidos [10] .

Enfermedad del sistema nervioso (neuropatía). Alrededor del 60 % al 70 % de las personas con diabetes tienen daños de leves a severos del sistema nervioso [9].

Amputación Más del 60 % de las amputaciones no traumáticas de miembros inferiores se producen en personas con diabetes. [9].

2.2.1. Productos finales de glicación (AGE).

Anteriormente se describió en que consiste el proceso de glicación, además de estos podemos describir, que la glicación de proteínas es una serie de complicados procesos y reacciones subsecuentes que en su colectivo es llamada **Reacción Maillard** [15], la reacción Maillard ocurre en el tejido y fluidos del cuerpo, inicialmente forma aductos de glicación temprana como fructosilisina posteriormente esta se degrada para formar los compuestos AGE véase figura 2.1. La autofluorescencia de la piel está relacionada con la fluorescencia de colágeno vinculado [8]. La reacción de glicación depende mucho de las concentraciones de glucosa que están presentes al inicio de esta [15], los compuestos AGE forman un rol patogenito en enfermedades como diabetes y problemas subsecuentes a estos como la insuficiencia renal. Los compuestos AGE al asociarse con proteínas realizan un proceso que es irreversible, estos al asociarse con proteínas de vida media corta son menos presente y al asociarse con proteínas de vida media larga como el colágenos, están más presentes en el cuerpo esto implica que es más factible localizarlos en la piel [8].

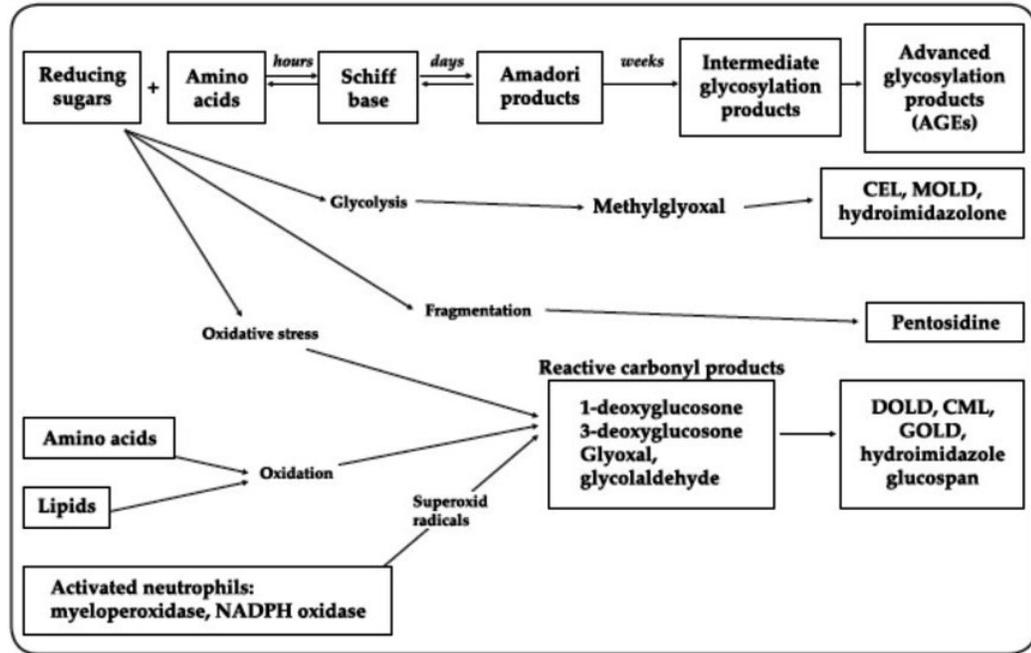


Figura 2.1: Esquema de generación de AGE [13]

2.2.2. Métodos no invasivos

Los métodos no invasivos para determinar concentraciones de glucosa, son un tema que va a revolucionar el área de diagnóstico, estos métodos surgieron al pretender establecer la relación entre la sudoración de la piel con personas diabéticas, pero esto no tuvo éxito ya que hay otras enfermedades que presentan esta característica [1]. Dentro del desarrollo de la técnica no invasiva para poder determinar concentraciones de glucosa existen dos enfoques los cuales son enfoques directos e indirectos, los enfoque directos estudian el comportamiento puro de la molécula de la glucosa, los indirectos se basan en las acciones que estas moléculas producen, al no poseer niveles adecuados en el cuerpo humano, en general cambios físicos en el cuerpo [1].

El método no invasivo consiste principalmente en medir concentraciones de glucosa en vivo, sin que el transductor tenga contacto con un fluido biológico representativo, en este caso una extracción de sangre o biopsia, la idea principal es realizar un estudio de la concentración de glucosa sin tener que utilizar reactivos ni separadores físicos [1],

2.3. Interacción de la radiación con la materia

Los efectos de la interacción de la radiación con la materia es el fenómeno principal que esta investigación utiliza para determinar concentraciones de glucosa, de manera no invasiva, en tejido humano.

Cuando las ondas electromagnéticas interactúan con un medio se ponen de manifiesto muchos fenómenos, tales como: fotoluminiscencia, absorción y dispersión. Estas interacciones dependen mucho de la energía que esta onda posea y también del medio con el que interactúan véase figura 2.2 ,estos fenómenos pueden ser analizados a través de la espectroscopia óptica.

Al incidir una onda electromagnética en un medio ,parte de la energía que

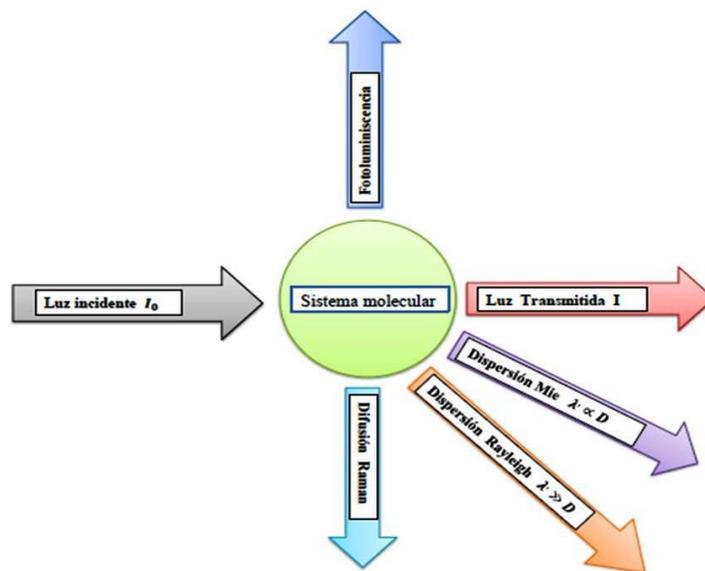


Figura 2.2: Principales fenómenos de la interacción de la radiación con la materia.[16]

posee esta onda es transferida al medio ,la emisión de luz o fotoluminiscencia es causa de esta energía depositada en el medio. Temas que serán abordados mas adelante. La dispersión Mie es un fenómeno de dispersión que se presenta cuando la longitud de onda dispersada es aproximadamente igual al diámetro de la molécula o partícula con la que interactúa. La dispersión Rayleigh se

presenta cuando la longitud de onda dispersada es mucho mayor al diámetro de la partícula o molécula con la que interactúa.

2.3.1. Ley de Beer Lambert

El fenómeno de absorción es representado por la ley de Lambert y Beer que expresa la probabilidad de que un fotón sea absorbido por una molécula, la cual se considera directamente proporcional a la concentración de las moléculas presentes y al espesor de la muestra esta ley podemos expresarla de la siguiente manera [18].

$$\frac{dI}{I} = -kcdx \quad (2.1)$$

Donde I es la intensidad de la luz inicial o incidente y dI es el cambio que sufre cuando la luz es absorbida, al atravesar un espesor dx. k representa el índice de absorción y una concentración c. analizando el comportamiento que sufre la ecuación 2 al atravesar b centímetros y el cambio que sufre I, integrando tenemos [18].

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -kc \int_0^b dx \quad (2.2)$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -kcb \quad (2.3)$$

A la cantidad (I/I_0) se le llama absorción, y como inicialmente describimos es proporcional a la concentración c y a la longitud de la trayectoria [18].

2.3.2. Absorción y emisión

La absorción es un fenómeno físico, en el cual una molécula de un medio absorbe un fotón de radiación electromagnética incidente, este logra excitar y elevar su nivel energético. Este fenómeno puede tratarse por un modelo semiclásico [17]. Esta absorción es observada como un cambio de intensidad de la radiación la transmitida, este proceso implica cambios de energía los cuales son expresados por:

$$h\nu = E' - E'' = \Delta E \quad (2.4)$$

Donde E' representa la energía del estado superior, E'' es la energía correspondiente al estado inferior, ν es la frecuencia de la onda electromagnética y h la constante de Planck. [18]. La fotoluminiscencia es parte de la energía absorbida por el átomo o molécula, esta se disipa en forma de luz para poder regresar a su estado de mínima energía, el esquema de absorción y emisión es ejemplificado en la imagen 2.3, esta emisión es representada matemáticamente por la ecuación 2.1, el cambio de energía entre el estado energético superior a un estado mas bajo

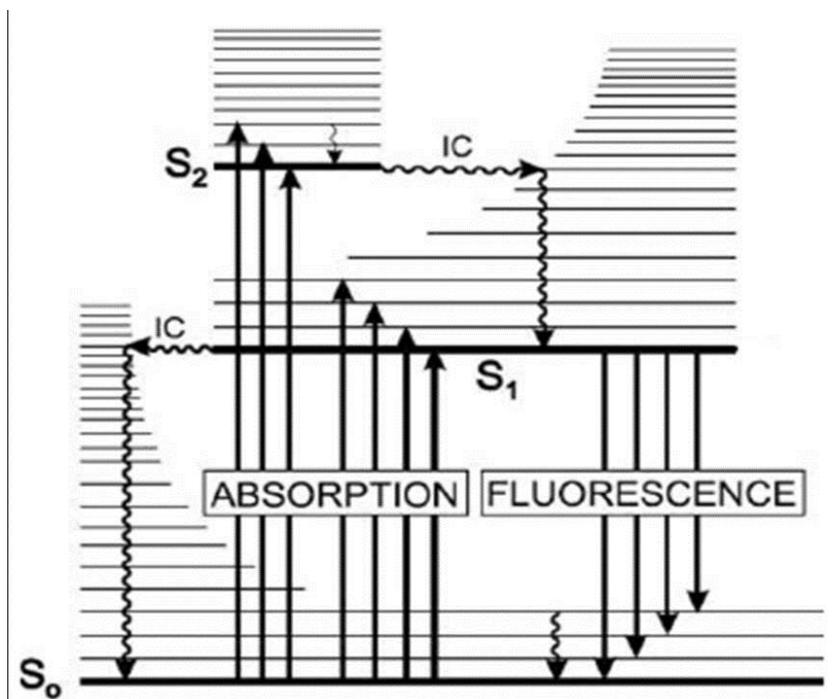


Figura 2.3: Diagrama de Perrin-Jablonski representado la absorción y emisión, S_0 ; S_1 ; S_2 : estados electrónicos singlete, IC: conversión interna [16].

2.4. Antecedentes de la investigación

Según muchos investigadores, determinar niveles de concentraciones de glucosa puede llegar a plantearse como una investigación con un futuro incierto, ya este ha sido objeto de estudio desde hace años de estudio, con

resultados pocos esperanzadores, muchos además plantean que este no puede tener un enfoque edisoniano, en el sentido que después de varios experimentos se lograra realizar [1]. El desarrollo de investigaciones en esta , ha tenido un avance enorme en el transcurso de los últimos años. La emisión de la fluorescencia de la piel atribuida a concentraciones de AGE, ha sido reportada con gran exactitud. [8]. La determinación de esta emisión (Véase figura 2.4), representa el cambio de intensidad de fluorescencia en la piel, al ser medidos en personas que presentan problemas asociados con altas concentraciones de glucosa, comparados con personas las cuales sus niveles de glucosa son normales.

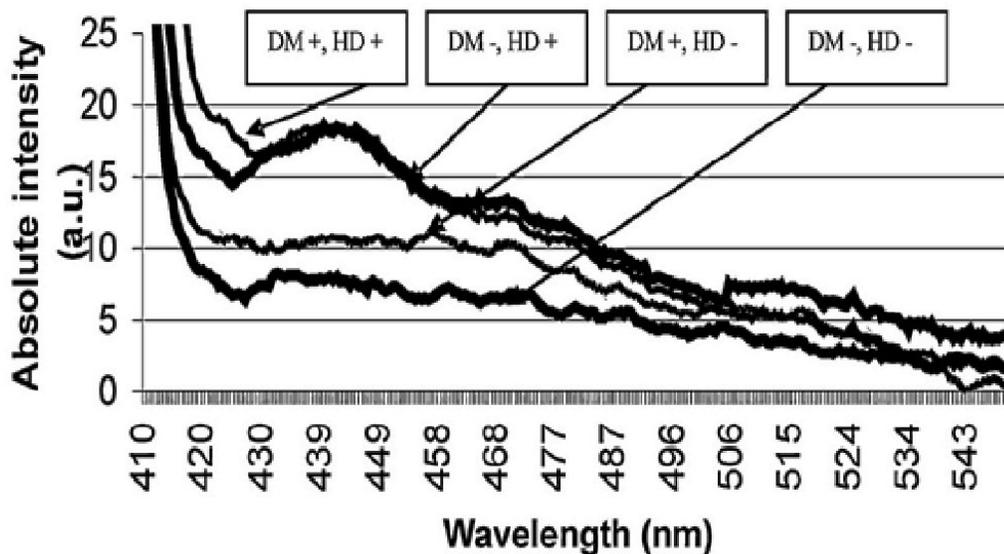


Figura 2.4: Espectro de fluorescencia de piel medido en persona, que tiene diabetes mellitus e insuficiencia renal, diabetes mellitus , insuficiencia renal y en control, DM: diabetes mellitus, HD hemodiálisis [8].

La fluorescencia de AGE tiene una relación estrecha con la fluorescencia del colágeno vinculado, fenómeno que ha sido determinado en otros estudios [8]. Esta información ha sido publicados en varias revistas. Estas mediciones por el momento han sido obtenidas de personas caucásicas [8]. Estudios realizados demuestran que en personas diabéticas la autofluorescencia de la piel es mayor en un 30 % [8].

Un antecedente importante es la factibilidad de comparar espectros de fluorescencia medidos en la piel, estudios realizados en el Instituto de Electrónica de la Academia de Ciencias de Bulgaria, presentan mediciones de la fluorescencia en la piel y observan cual es el cambio que sufre el espectro de emisión al variar áreas del cuerpo como el brazo, la palma (Véase figura 2.5).

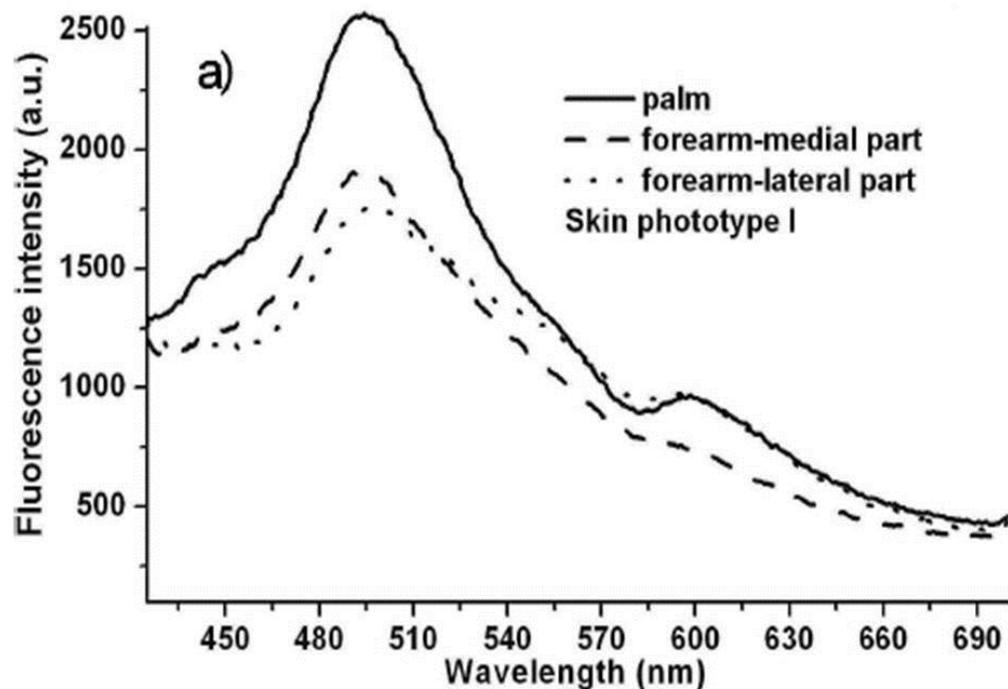


Figura 2.5: Emisión de la piel, obtenida en diferentes partes del cuerpo [19].

Estudios también realizados en el Instituto de Electrónica de la Academia de Ciencias de Bulgaria han encontrado la emisión de la piel al ser excitada con diferentes máximos (Véase figura 2.6), estos espectros se comportan de manera diferente, atribuyéndolo al aumento de penetración en la piel, esto implica aparición de bandas de fluorescencia de fluoróforos [20]. Por el momento muchas de estas investigaciones se basan en poder determinar la emisión de la piel, como herramienta de diagnóstico no invasiva para el cuerpo humano. Este tipo de estudio se ha realizado en enfermedades como el

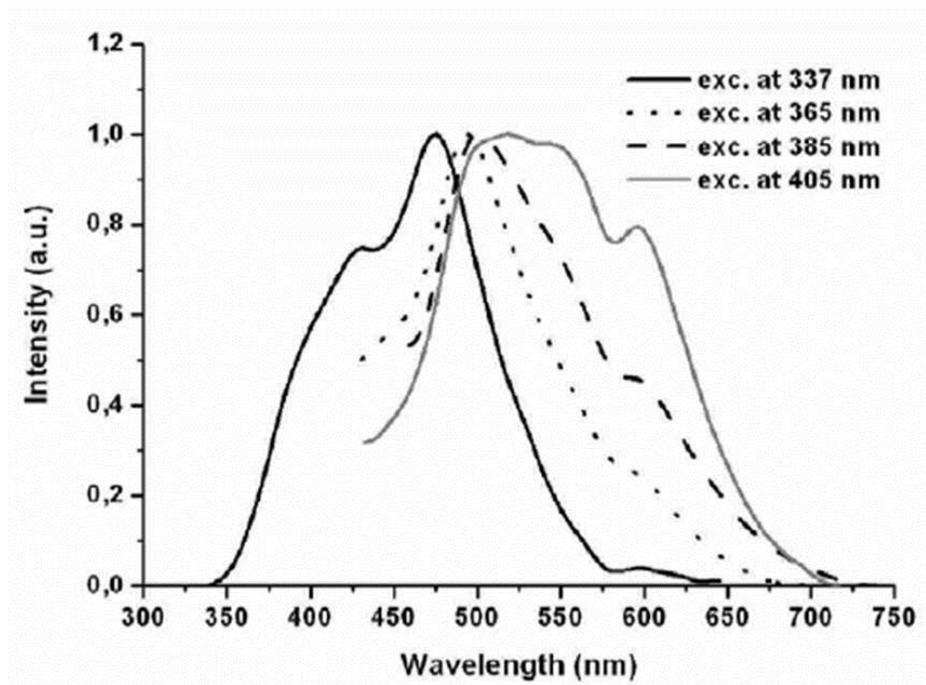


Figura 2.6: Emisión de la piel con diferentes fuentes de excitación [20].

cáncer y la diabetes [20], a pesar de esto se necesitan muchos mas estudios y pruebas para validar este método de diagnostico no invasivo

Capítulo 3

Experimento

La determinación de fluorescencia de la piel en personas con diabetes e insuficiencia renal ,ha sido atribuida a la acumulación de AGE en personas diabéticas [8],esta es la principal característica que se pretende utilizar para realizar esta investigación. Para determinar una relación entre la fluorescencia de AGE utilizaremos la técnica de espectroscopia óptica ,la cual consistirá en detectar con nuestro arreglo experimental la fluorescencia en tejido humano.

3.1. Equipo a utilizar

- **Fibra óptica.**

Diámetro 400 micras.

Rango 300-1100nm.

Trasmisión 83 % en el rango de 350-900 nm.

la fibra óptica nos permite coleccionar la mayor cantidad de luz posible y transmitirla de manera más eficaz por la cualidad que poseen de tener una reflexión interna total [17]

- **Espectrógrafo USB4000.**

Resolución 10 nm.

Rango 250 - 1100 nm.

Angulo Blaze 500 nm.

Este instrumento nos permite coleccionar la emisión de luz de manera

análoga y transformarla a digital, representándolo como un espectro en la computadora, esto es de gran ayuda para realizar diferentes análisis, la sensibilidad del espectrógrafo y la eficiencia de la rejilla de difracción son mostrados en la figura 3.1

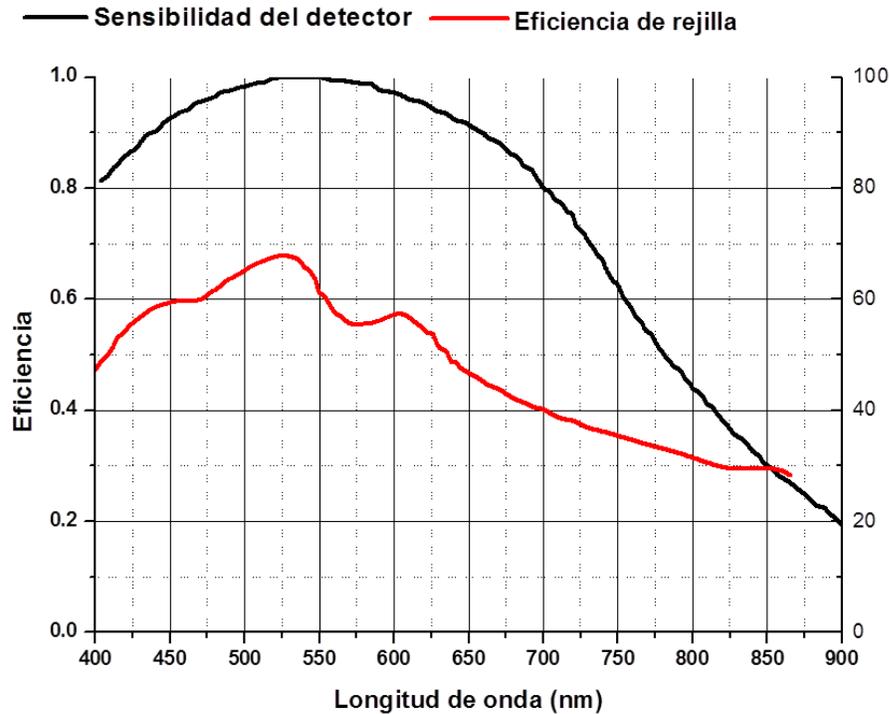


Figura 3.1: sensibilidad de la rejilla de difracción y la sensibilidad del detector del espectrógrafo USB4000[22]

- **Estructura** para evitar radiación de fondo que afecta la toma de datos y además que sirva para realizar la medida de una manera más rápida y delimitando un área de piel específica véase figura 3.2
- **Fuente de excitación.**

En nuestro caso podremos utilizar como fuente de excitación la lámpara de mercurio (Véase figura 3.3), ya que esta posee una banda de excitación similar a la banda utilizada por otros investigadores, como por



Figura 3.2: Montaje para evitar la radiación dispersa.

ejemplo una banda de excitación de 300 a 420nm con un máximo en 350nm utilizada en el Centro Medico de la Universidad de Groningen, Los Países Bajos [8].

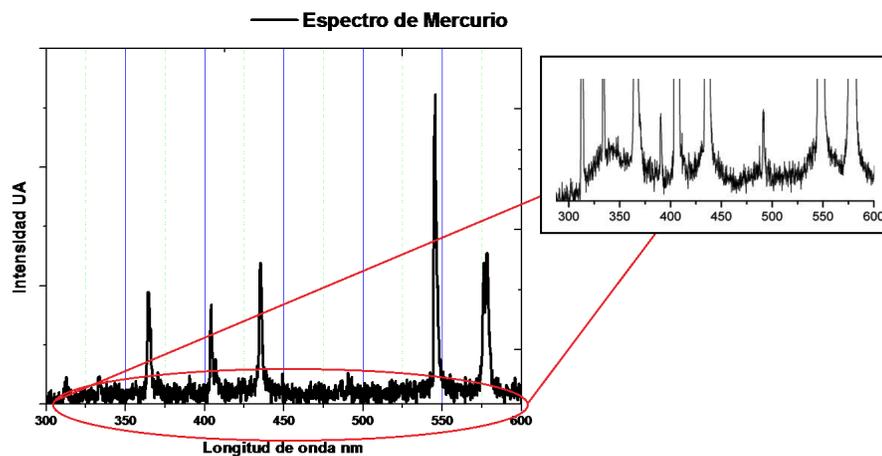


Figura 3.3: Espectro de lámpara de mercurio (Laboratorio de Espectroscopía Óptica, Escuela de Física, UES)

- **Filtros pasa banda y paso alto.** Los filtros serán utilizados para poder delimitar el espectro de excitación y para coleccionar la fotoluminiscencia, estos filtros son de gran importancia, ya que ayudan a coleccionar fluorescencia de la piel, disminuyendo la intensidad de haz de radiación.

ción electromagnética con el cual excitamos para estos mostramos la transmitancia de estos filtros(Véase figura 3.4).

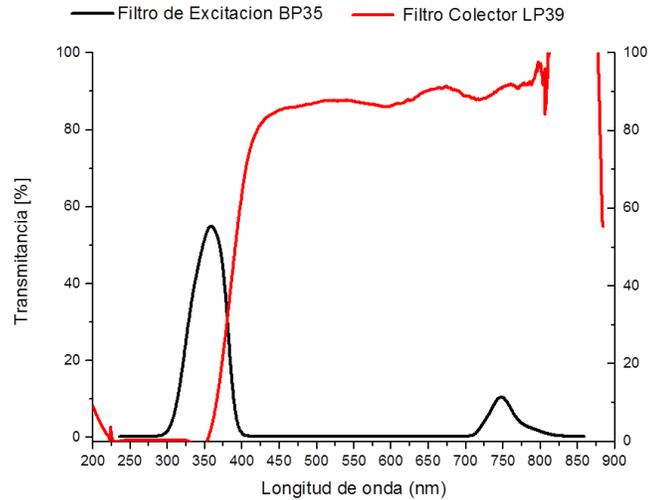


Figura 3.4: Transmitancia de filtros

- Lentes para poder enfocar el área de a excitar.
- Computadora
- Programas: Spectra Suite.

3.2. Construcción de equipo y montaje experimental.

El equipo para la medición de fluorescencia en tejido humano es un acople de diversos instrumentos. En primer lugar se necesita utilizar un arreglo de filtros el cual delimite el haz de radiación electromagnética de excitación en la piel, un dispositivo que restrinja la luz de fondo del ambiente donde se realizaran las mediciones y lentes para enfocar nuestro haz de excitación. Estos instrumentos acoplados son mostrados en la figura 3.5 .

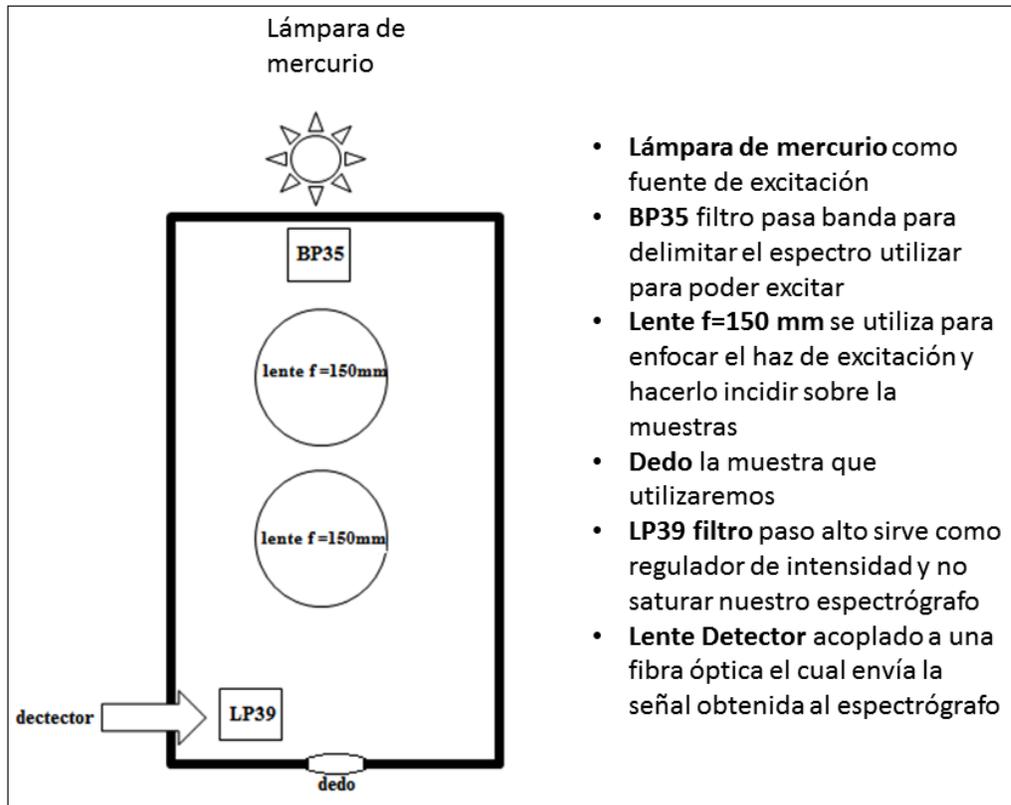


Figura 3.5: Esquema de excitación para la toma de datos

3.3. Proceso para toma de datos

La metodología para la toma de fluorescencia de la piel, consiste en excitar la piel con una banda de 300 a 400nm con un máximo en 365nm, esto logra producir una banda de fluorescencia a 400-700 [8]. Las mediciones se realizaron en el dedo pulgar, se necesita tener un tipo de área del cuerpo el cual no sufra de irregularidades como cicatrices o demasiados vasos capilares [8]. Un paso importante para la toma de datos, es tomar una corrección por la corriente oscura que se puede presentar en la CCD de nuestro espectrógrafo. Posteriormente procedemos a coleccionar nuestra fotoluminiscencia teniendo en cuenta que parte de esta luz que coleccionemos puede ser luz que es reflejada por la piel por lo tanto tenemos que analizar nuestra banda de excitación, para delimitarla de la fotoluminiscencia que se genera por la piel. Esto nos

Proceso para medir

Figura 3.6: proceso para obtener medidas de fotoluminiscencia de AGE

da un valor el cual nos representa el comportamiento de la fluorescencia de la piel en personas con posibles acumulaciones de AGE y personas sanas.

3.4. Eficiencia del detector y sensibilidad de la CCD

Una parte importante de toda medición es determinar lo afectado que se puede verse nuestra medida, por el equipo que se utiliza para obtenerla, en nuestro caso la parte más importante de nuestro equipo que utilizamos para la metodología, el espectrógrafo USB4000, este posee dos instrumentos que pueden afectar nuestras medidas. La eficiencia de la rejilla de difracción y la sensibilidad del detector, son mostrados en la figura 3.1 ; este tipo de espectros nos servirán para determinar que tanto nuestra medida se ve afectada por estas dos variables, para determinar esto procedemos utilizar una medida cualquiera de nuestros espectro de fluorescencia y realizar tres procesos, con el fin de identificar la variación que sufre nuestra medida.

Como primer paso realizamos una división de la medida de fluorescencia de la piel entre la eficiencia de la rejilla de difracción, posteriormente dividimos nuevamente la medida de la fluorescencia de la piel entre la sensibilidad de nuestro detector y finalmente realizamos una división del espectro de fluorescencia de la piel entre la multiplicación de la sensibilidad de la rejilla de difracción por la sensibilidad del detector. El resultado de estos tres pasos me generan tres espectros (Véase figura 3.7). El espectro en color rojo no genera ninguna cambio evidente con la medida real de la fluorescencia de la piel, mientras que el espectro de color verde se observa que, se ve afectado por un cambios en cuanto a la intensidad en la banda de 400nm-900nm. Esto implica que la sensibilidad de la rejilla de difracción si es un factor que afecta las medidas, a pesar de esto una ventaja que es evidente en los espectros ,es que los máximos que son observados en el espectro se mantienen, esto es de mucha importancia ya que como mas adelante se discute estos máximos corresponden diferentes sistemas moleculares y el hecho que no sufran ninguna cambio,es muestra para que las medidas se puedan trabajar sin realizar esta corrección.

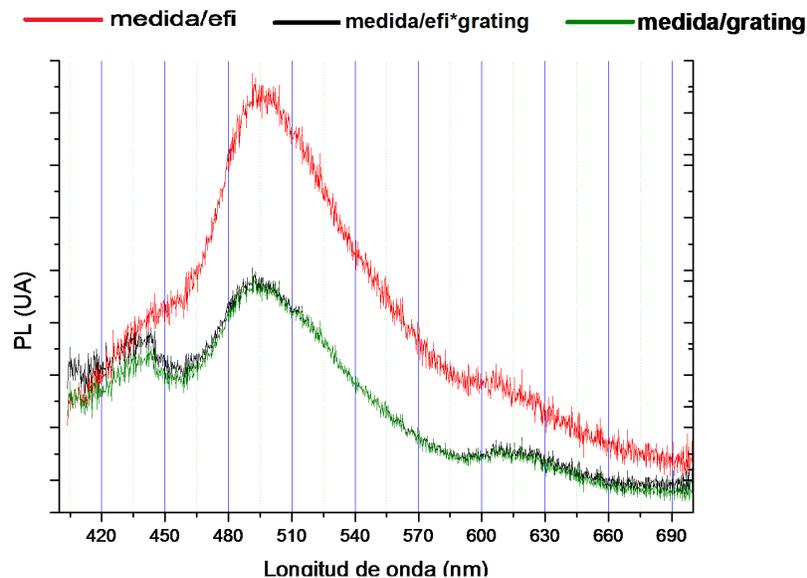


Figura 3.7: Resultado de la de fluorescencia de piel al ser filtradas por la sensibilidad del detector y la eficiencia de la rejilla de difracción

3.5. Población a medir

Diversos estudios realizados en esta área, han tenido una estrecha relación con organizaciones que involucran a persona que sufren la enfermedad de la diabetes, tal es el caso de la investigación realizada en Los Países Bajos, donde se gestiona con el proyecto Zwolle Outpatient Diabetes project Integrating Available Care (ZODIAC) [24, 25]. El cual brinda la facilidad de poder realizar mediciones en sujetos que son de interés para esta investigación, en El Salvador existe dos Organizaciones que son de interés para este estudio las cuales son ASADI y ANAHES además otros estudios como por ejemplo en el país de Bulgaria [19] donde han sido tomadas mediciones de la auto-fluorescencia de la piel en personas que se prestaron voluntariamente para este estudio. En esta investigación se pretende realizar medidas en cuatro tipos de personas para poder establecer una mejor cantidad de muestra en nuestro estudio.

- Personas que mantienen controlada su diabetes
- Personas que no controlan su diabetes
- Personas que sufren con enfermedad de insuficiencia renal.
- Personas sanas.

Los voluntarios para realizar estas mediciones fueron obtenidas de estudiantes de la Universidad de El Salvador, estos datos son presentados más adelante.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Equipo construido

En el desarrollo de esta se realizo un prototipo que funcionara para medir la fluorescencia de la piel de manera mas cómoda para las personas, es por esto que después de diversas pruebas y configuraciones de lentes y filtros, fue elaborado. Este equipo es mostrado en la figura 4.1, es importante mencionar que este equipo fue posible construirlo , después de poseer los conocimientos adquirido en la materia de espectroscopia óptica las cuales fueron de gran ayuda para la de este prototipo.



Figura 4.1: Equipo construido para medir la fluorescencia de la piel

4.2. Área de obtención de la medida

Lo principal de esta investigación es, poder obtener la medida de fluorescencia de la piel, de una manera mas rápida y mas cómoda. Este trabajo lo iniciamos realizando una comparación del área del cuerpo en el cual obtenemos la medida, que nos de una mejor señal de fluorescencia. Las investigaciones reportan que mediciones similares a está, se han realizado en el antebrazo, parte lateral del antebrazo y la palma ,nuestra medidas como se observa (Véase figura 4.2); presenta las mediciones que fueron obtenidas en diferentes partes del cuerpo con el fin de poder determinar, cual nos brinda mas información, como se observa en las gráficas se tomaron medidas en tres partes de fácil acceso al cuerpo humano. La palma de la mano , el ante brazo y el dedo , a pesar que otros estudios realizados en Los Países Bajos, la medida de la fluorescencia de la piel fue obtenida de la parte del ante brazo [8] ,nuestras medidas obtenidas muestran una intensidad menor al comparar con las otras partes del cuerpo, en las que se realizo' la prueba, otro lugar de medición es la palma de la mano con el fin de corroborar medidas de fluorescencia de la piel realizadas en Bulgaria [20], resultando con una intensidad de la señal de fluorescencia significativa, pero al comparar la emisión obtenida en el dedo se observa que la intensidad de la emisión es la que mejor valor nos proporciona. Luego de haber verificado, que la señal obtenida de mayor intensidad es obtenida de la parte del dedo, las medidas obtenidas en esta trabajo de investigación en cuanto a la fluorescencia de la piel humana ,se realizaron en la parte del dedo, para ser mas preciso en el dedo pulgar.

4.3. Personas a medir

En el desarrollo de estas investigación la medición de fluorescencia en tejido humano se realiza con el fin de obtener una relación atribuida al colágeno vinculado, las mediciones fueron realizadas en diferentes personas, las medidas se realizaron en personas voluntarias fueron tomadas en las instalaciones de la Universidad de El Salvador en la mayoría estudiantes los cuales ayudaron a que esta toma de datos se llevara a cabo en las tablas mostradas (Véase tabla 4.2 y 4.1). Las personas fueron denominadas con la letra "M", seguidas de un numero, con el objetivo de presentar de mejor manera los resultados de los espectros, de aquí en adelante cundo nos refiramos a un espectro se hará referencia a este tipo de nombre, como por ejemplo M1,M2,M3...etc.

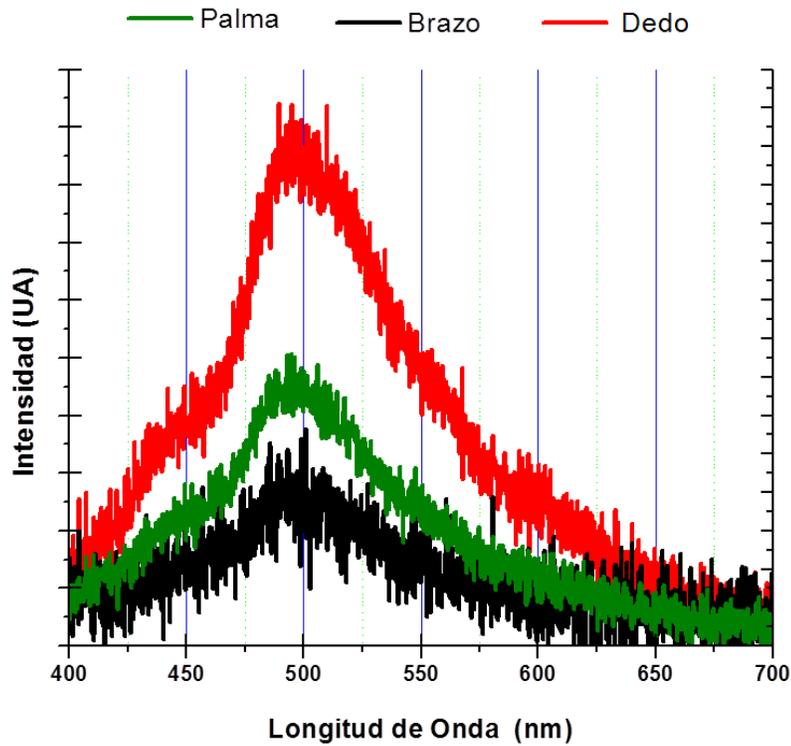


Figura 4.2: Medidas de fluorescencia obtenidas de diferentes partes del cuerpo

Como ya se explico en la sección anterior la parte del cuerpo que se utilizó para realizar la medida fue el dedo pulgar, con el fin de verificar que tan factible es reproducir las mediciones y analizar la información que el espectro de fluorescencia nos presenta. Espectros mostrados en la figura 4.4.

Tabla 4.1: Principales datos de las personas, las cuales se realizaron la medida de fluorescencia de la piel Agosto 2013

Nomenclatura	Edad	Genero	Fallo renal	Tabaquismo
M1_2	25	Masculino	si	si
M2_2	26	Masculino	No	si
M3_2	29	Masculino	No	No

Tabla 4.2: Principales datos de las personas, las cuales se realizaron la medida de fluorescencia de la piel Agosto 2013

Nomenclatura	Edad	Sexo	diabetes	Tabaquismo	Pigmentación
M1	26	Femenino	No	No	Trigueña
M2	33	Masculino	Padres	Regular	Clara
M3	23	Femenino	Mamá	No	Blanca
M4	23	Femenino	Papá	No	Trigueña
M5	23	Masculino	Papá	Todos los días	Trigueña
M6	19	Femenino	Mamá	No	Morena
M7	24	Femenino	No	No	Morena
M8	24	Femenino	No	No	Trigueña
M9	24	Masculino	No	No	Trigueña
M10	25	Femenino	No	No	Trigueña
M11	23	Masculino	No	No	Morena
M12	22	Masculino	No	Si	Trigueña
M13	20	Femenino	No	No	Blanca
M14	19	Femenino	Padres	No	Trigueña
M15	17	Masculino	No	No	Trigueña
M16	19	Masculino	No	hace un año	Trigueña

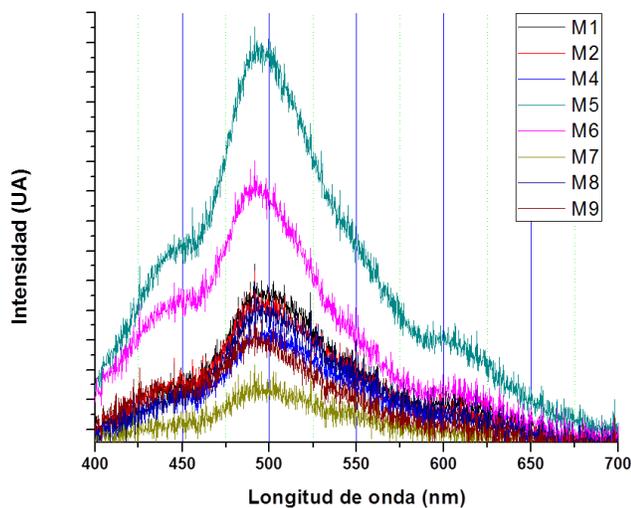


Figura 4.3: Fluorescencia de la piel referente a personas de la tabla 4.2

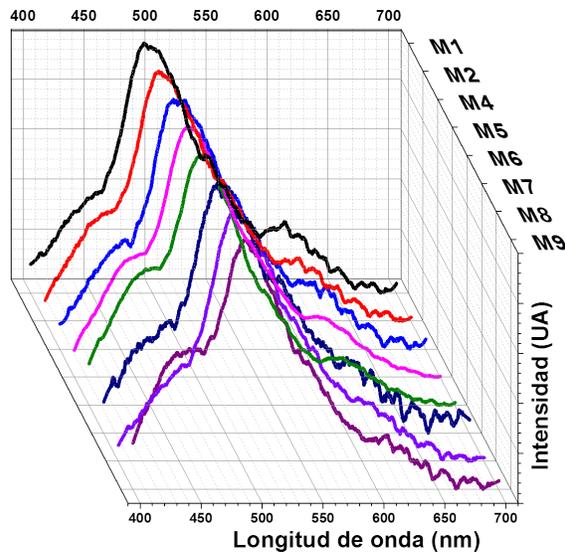


Figura 4.4: Fluorescencia de la piel referente a personas de la tabla 4.2

Estas mediciones se realizaron en dos campañas realizadas en Septiembre y Agosto de 2013 , es necesario mencionar que la medida M3 no esta presente ya que se obtuvo problemas en el momento de guardar la medida.

4.4. Comparación de resultados

Los resultados comparados en la sección de antecedentes de este documento nos presenta de manera muy clara, la validación de nuestra medida ademas al realizar una comparación con estudios realizados en Los Países Bajos, Bulgaria y Canadá(Véase figura 4.5) .La finalidad de estas comparaciones es poder determinar una relación directa de nuestro resultados con los resultados obtenidos en otras partes del mundo. Comparando nuestro resultado de la fluorescencia de tejido humano, nos brinda una idea mas clara de la validación de nuestro espectro,

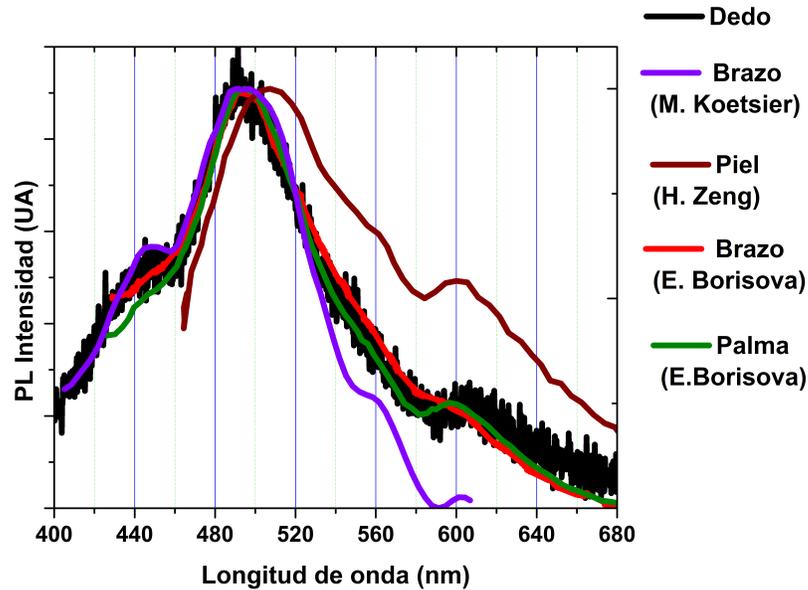


Figura 4.5: comparación de medidas obtenidas con otros autores

4.5. Análisis del espectro

Previamente se compararon los espectro de fluorescencia en tejido humano, para profundizar mas en la información que este nos presenta, escogemos un espectro de la tabla 4.2 por ejemplo M5, para determinar cuales son los compuestos que están presentes debido a las bandas de fluorescencia que podemos atribuirle a este espectro, para esto identificamos cuatro máximos que son evidenciados en el espectro de fluorescencia de tejido humano en la figura 4.6; señalamos de manera mas directa cuales son estos máximos a los cuales nos estamos refiriendo. es importante señalar que estos máximos que señalamos son seleccionados al investigar bibliograficamente los componentes del tejido humano y la energía que estamos utilizando para excitar, en nuestros caso 365nm.

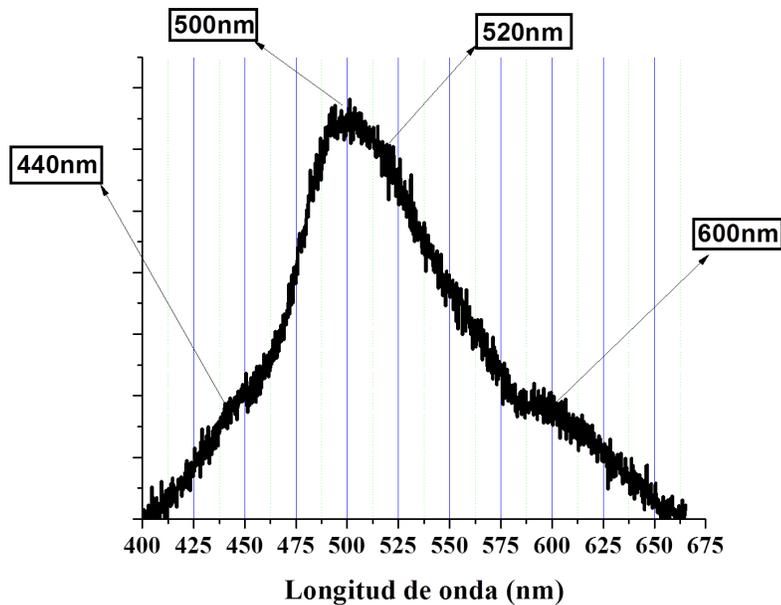


Figura 4.6: Resultado de un espectro de fluorescencia de la piel excitación 365nm

El análisis de los espectros para identificar los máximos asociados ellos, lo realizamos mediante un método de deconvolución gaussiana, este permite separar un espectro y poder determinar las contribuciones de otras emisiones. Este proceso se basa en determinar los máximos asociados a cualquier espectro, máximos asociados a un espectro se refiere a máximos, que son presentes en el espectro a simple vistas, o aquellos en los cuales se observa que el comportamiento del espectro cambia, y deja de comportarse como una línea suave. Es importante recalcar el estudio del comportamiento de la fluorescencia que presenta la piel en nuestra investigación, para poder seleccionar máximos, que tienen sentido físico que estén presentes. El resultado de una deconvolución realizada a un espectro de fluorescencia de la piel es mostrado en la figura 4.7; el espectro negro mostrado es la medida real, los espectros de color verde claro representan los máximos asociados al mediada real y el espectro rojo representa la convolución de las bandas asociadas al espectro real.

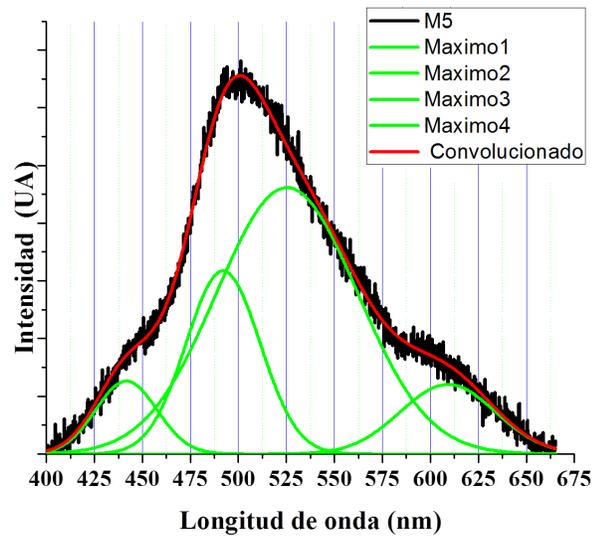


Figura 4.7: Resultado de la deconvolución del espectro de fluorescencia de la piel

Lo anterior mostrado, permite observar la deconvolución del espectro de fluorescencia de la piel tomada del dedo pulgar, éste posee cuatro máximos y al realizar el proceso de deconvolución permiten reconstruir la medida real con una gran exactitud, esto es evidente al observar el ajuste casi perfecto que poseen el espectro negro y el espectro de color rojo (Véase 4.7). Posterior a la deconvolución, es necesario determinar a que compuesto se relacionan las bandas mostradas en color verde (Véase figura 4.7); La tabla 4.3; muestra los resultados de las bandas atribuidas al espectros de fluorescencia de la piel, cabe mencionar que el r^2 obtenido de esta deconvolución nos da un valor iguala 0.99; esto implica una correlación muy similar entre nuestro espectro medido y nuestro espectro convolucionado. con ayuda de la tabla 4.4; podemos determinar la relación que nuestro espectro de fluorescencia presenta con los principales fluoroforos de la piel

Tabla 4.3: Datos de los máximos asociados al espectro de fluorescencia

	Área	Centro	Anchura	Altura
Máximo 1	25538.07	441.68	32.17	633.38
Máximo 2	76855.76	492.03	38.59	1589.00
Máximo 3	212714.90	525.36	73.43	2311.10
Máximo 4	37725.56	609.14	49.83	603.97

Tabla 4.4: Datos de principales fluoroforos de la piel [20]

<i>Structural proteins</i>	Excitation max, nm	Emission max, nm
Collagen	320-350	400-440
Elastin	290-325	340, 400
Collagen cross-links	380-420	440-500
Elastin cross-links	320-360, 400	480-520

Establecer una relación de los máximos que nos presentan la deconvolución y las bandas atribuidas a compuestos que podemos encontrar en la piel es de mucha importancia, es por esto que necesitamos analizar el comportamiento de la fluorescencia de la piel y comprender el resultado de la del espectro de fluorescencia. Para esto iniciamos nuestro análisis con una mapas de contorno de fluorescencia en la piel (Véase figura 4.8); En esta podemos apreciar como varían los componentes que podemos determinar al variar la longitud de onda de excitación, el mapa de fluorescencia identifica los tres componentes principales que podemos determinar al variar la longitud de onda en un margen de 300nm - 450nm; los cuales son colágeno, Nicotinamida Adenina Dinucleótido en su forma reducida (NADH) y dinucleótido de flavina-adenina (FAD) esto implica que nuestra medida tiene que corresponder a estos compuestos, al realizar un análisis del mapa de contorno de fluorescencia y compararla con nuestros espectros resultantes (mostrados anteriormente y con ayuda de la tabla 4.4) y tomando en cuenta que nuestro máximo de excitación está alrededor de 365nm; podemos concluir que el compuesto que mayor intensidad de fluorescencia presente para una longitud de onda con máximo de excitación alrededor de 365nm, es el NADH y esta emisión de NADH tendrá un máximo de fluorescencia entre

480nm - 500nm. Nuestro objetivo primordial es poder determinar la emisión del compuesto colágeno vinculado con el objetivo de establecer un marcador indirectos de complicaciones renales y diabetes como se expuso en el marco teórico, diversas investigaciones han demostrado que la emisión del colágeno vinculado posee un máximo de emisión en 440nm, esto implica que nuestro espectro el cual esta compuestos por diversos máximos, tiene que tener un máximo en 440nm, este máximo sera el indicador que estamos determinando el colágeno vinculado,es evidente ,según los resultados de nuestra deconvolución (Vease tabla 4.3),nuestro espectro presenta un máximo el cual esta localizado en 440nm.

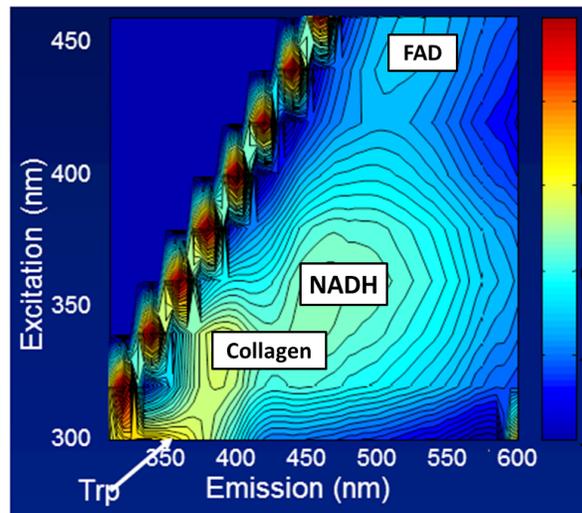


Figura 4.8: Mapa de contorno de fluorescencia de la piel al variar el máximo de excitación [26]

Por medio lo anterior descrito, con nuestros resultados hemos logrado determinar el colágeno cruzado atribuyendole el máximo de 440nm, otro resultado que hace fiable nuestra medida es que según el mapa de contornos de fluorescencia (vease fig:4.8, al excitar con un máximo de 365nm la fluorescencia de mayor intensidad sera la del NADH , esto es evidente en el espectro. Es por medio de esta investigación hemos logrado caracterizar la fluorescencia de la piel de personas de El Salvador y a la vez hemos determinado que los máximos asociados al espectro de fluorescencia corresponden con los resultados presentados por otros autores [2, 7, 8]. En particular hemos logrado

determinar el máximo de 440nm asociado a colágeno vinculado el cual es el indicador que pretendíamos determinar y que en un futuro se pueda utilizar como marcador indirecto de los productos de glicación avanzada. lo que hemos logrado determinar por los espectros de fluorescencia de tejido humano son las pretinas Colágeno cruzado, NADH, FAD y Porfirinas las cuales corresponden el espectro experimental y con el simulado, haciendo énfasis en la información investigada .

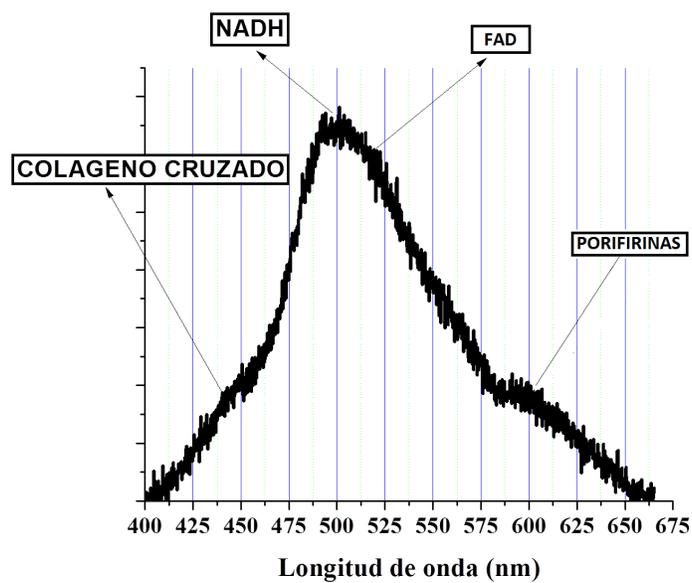


Figura 4.9: compuestos determinados del espectro fluorescencia de tejido humano

4.6. Resultados de los espectros de fluorescencia de tejido humano

Iniciamos los resultados de esta investigación observando los espectros mostrados en la figura 3.10 ; podemos evidenciar un cambio en cuanto a la intensidad de los espectros en tejido humano, este cambio que se observa en el espectro de mayor intensidad fue medida en una persona que presentaba fallo renal, al deconvolucionar y poder obtener la banda atribuida al colágeno vinculados, da como resultado como que está banda presenta mayor intensidad de fluorescencia, lo cual al comparar este resultado otro obtenido en Los Pises Bajos, podemos observar que el el resultados que obtenemos es similar

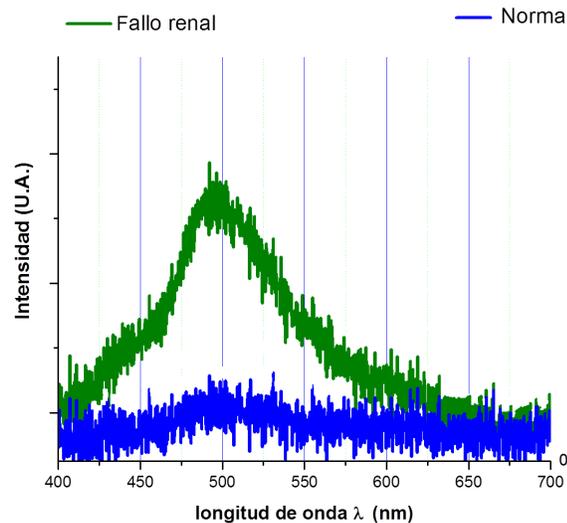


Figura 4.10: Espectros de fluorescencia de la piel en persona con problema renal y persona normal

4.6. Resultados de los espectros de fluorescencia de tejido humano³⁵

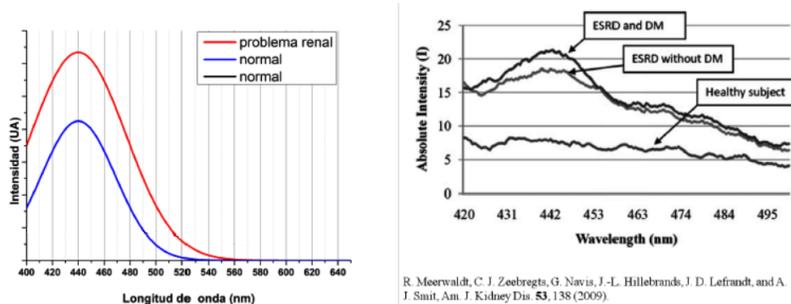


Figura 4.11: Comportamiento del colágeno cruzado extraído del espectro mostrado en figura 3.10(izquierda). Comparación de espectro de colágeno cruzado en personas con fallo renal,diabetes y sanos (derecha)

Un resultado importante es comparar la fluorescencia por el tipo de piel que presentaron los voluntarios en la figura 4.12, presentamos estos espectros, se observa que la relación que presentan estos espectros es muy similar, es importante señalar que ninguna de estas personas presentaba algún tipo de enfermedad relacionada con la diabetes o fallo renal , estas medidas corresponden al genero femenino.

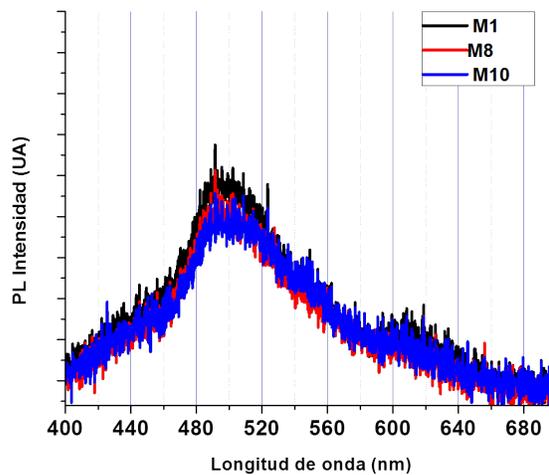


Figura 4.12: Espectro de fluorescencia medidos en piel de personas trigueña sin complicaciones renales o padecimientos diabeticos

Al comparar espectros de fluorescencia de personas trigueña por genero (Vease figura 4.13), femenino en rojo y masculino en negro, se observa que la intensidad correspondiente al espectro de fluorescencia de genero femenino presenta un intensidad levemente mayor. Este dato es reportado en investigaciones [7]. Y es por esto que se necesita investigar mas este factor debido al genero, el cual puede afectar levemente los resultados.

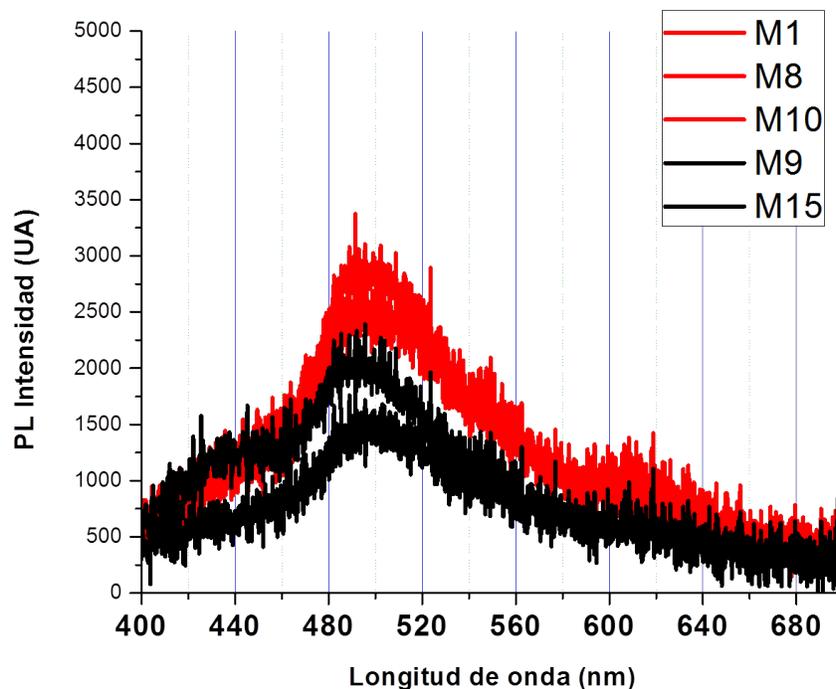


Figura 4.13: Espectros medidos en piel trigueña en rojo femenino y en negro masculino

La relación de espectros que presentan las personas que fuman y con posible padecimiento de diabetes con una persona que no fuma, podemos evidenciarlo el cambio de intensidad que estos sufren en la gráfica 4.14. Es otra variable que es de mucha importancia en este tipo de investigaciones y ha sido reportada en investigaciones [7], es importante realizar mas estudio con estas variables , que deben ser tomadas en cuenta.

4.6. Resultados de los espectros de fluorescencia de tejido humano³⁷

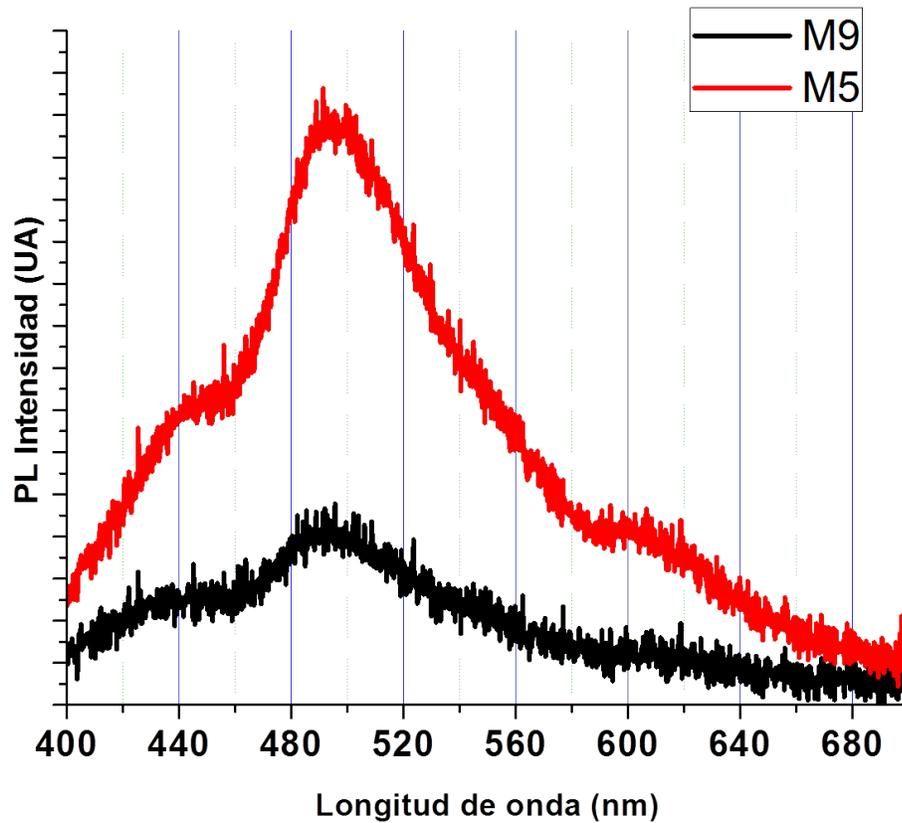


Figura 4.14: Espectros medidos en piel trigueña con persona que fuma con posible diabetes en color rojo y persona que no fuma en color negro

Al realizar una comparación, de una personas que fuma con otra persona que no fuma pero posible padecimiento de diabetes , con una persona que no presenta ninguna de estas variables, se presenta una variación de intensidad , esta puede ser observada en la figura 4.15, con esto se puede lograr determinar el cambio observado debido a la intensidad de fluorescencia, todos estas variables de datos que fueron registrada de las personas fueron presentadas , con la finalidad de brindar información adicional a tener en cuenta en estas investigaciones.

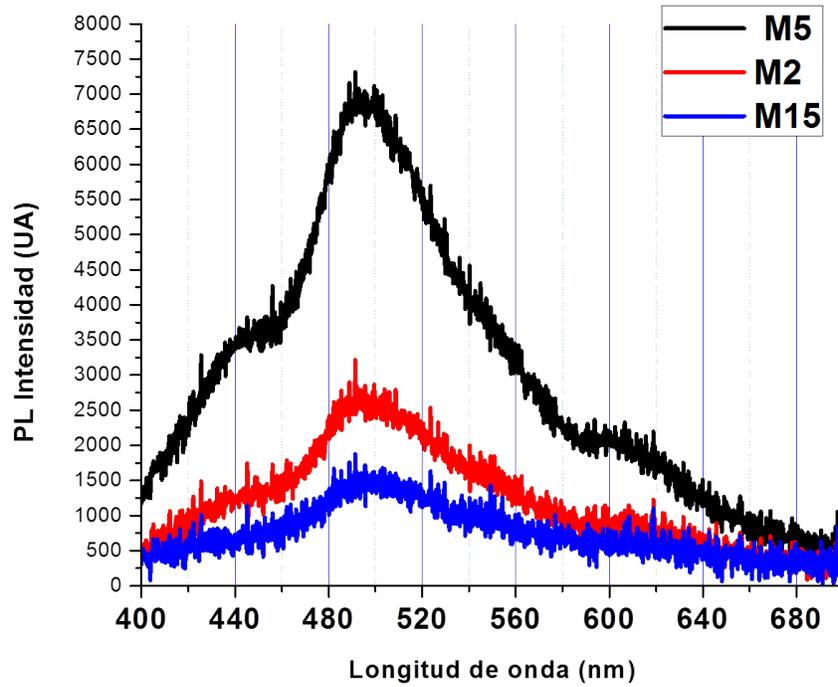


Figura 4.15: Espectros medidos en piel trigueña con persona que fuma con posible diabetes(negro), persona con diabetes(rojo) y persona que no fuma (azul)

4.7. Análisis de suero de sangre

Esta investigación fue complementada con medidas de fluorescencia de suero de sangre en personas sanas y personas que presentan fallo renal, con esto se determino el comportamiento que sufren los espectros de fluorescencia en personas con fallo renal y personas sanas , utilizando el mismo montaje experimental para medir la fluorescencia en piel se procedió a medir el de las muestras de suero. Fueron proporcionadas 10 muestras de sueros con fallo renal y diez muestras de suero de personas sanas. En la figura 4.16 se presentan el comportamiento de la fluorescencia en suero de sangre de personas sanas, e todos presentan un igual comportamiento, en la figura 4.17, se presentan los espectros de fluorescencia en suero de sangre de personas que presentan problemas renales

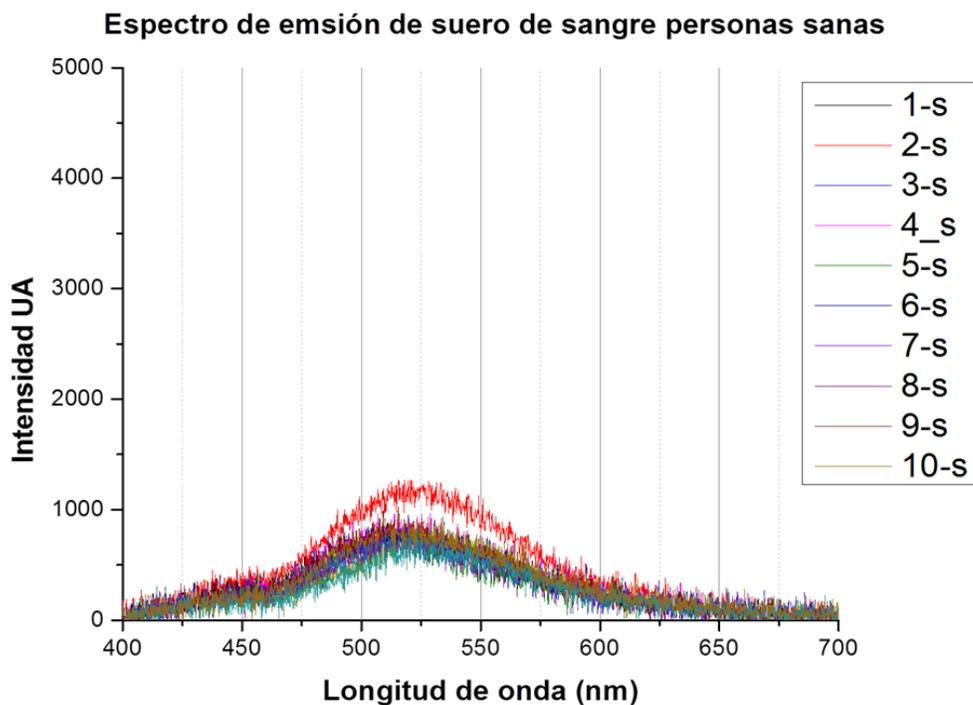


Figura 4.16: Fluorescencia de suero de sangre de personas sanas (excitación = 365nm)

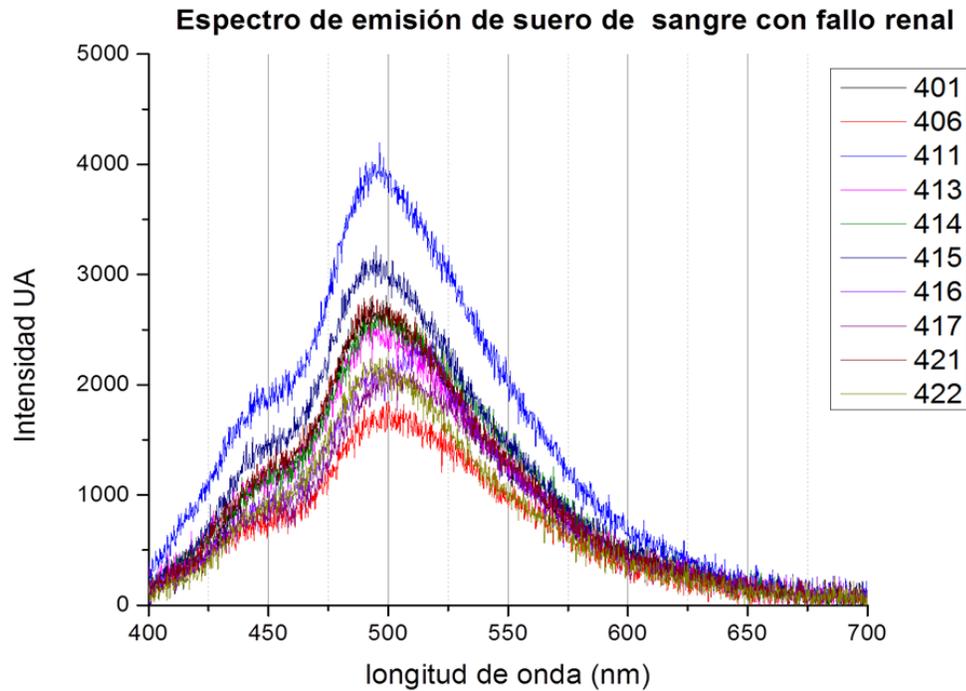


Figura 4.17: Fluorescencia de suero de sangre de personas que presentan problemas renales (excitación = 365nm)

Se puede determinar después de observar el comportamiento de fluorescencia de suero de personas sanas y personas que presentan problemas renales, es que estos últimos presentan mayor intensidad en cuanto al espectro de fluorescencia, esto es más evidente si unimos ambos espectros en una misma imagen (Véase figura 4.18). La forma de los espectros de personas sanas y personas que sufren fallo renal presentan igual comportamiento puede observarse como es el comportamiento de los espectros de fluorescencia de suero de sangre en personas sanas y personas que presentan cáncer

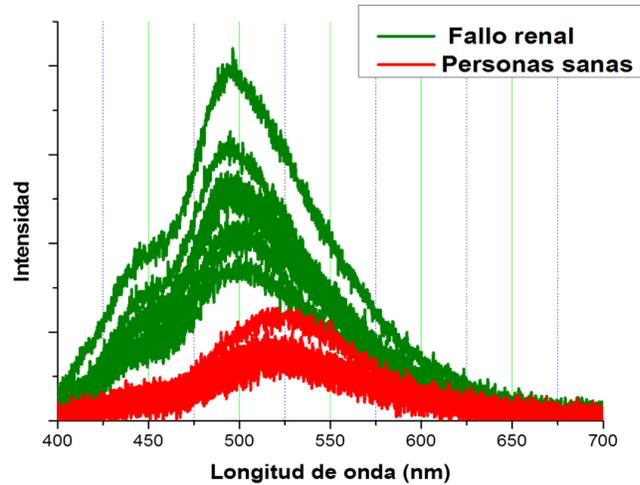
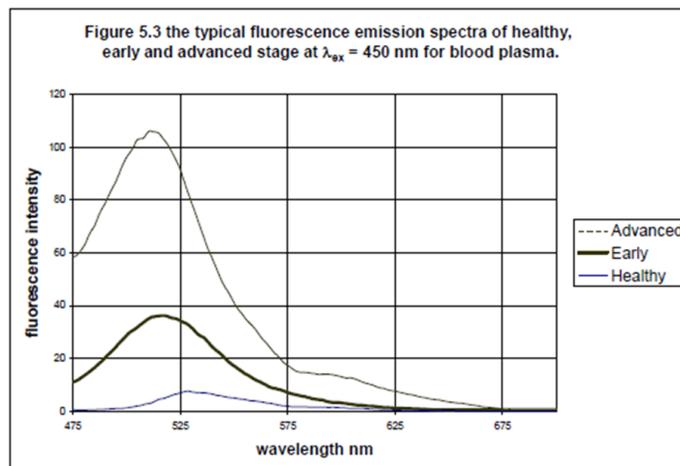


Figura 4.18: Comparación espectros de fluorescencia de suero de sangre de personas con fallos renal y personas sanas



[1] M. A. Al-thunayan, (n.d.).

Figura 4.19: Fluorescencia de suero de sangre en en personas que presentan etapa cercana de cáncer ,etapa avanzada de cáncer, personas sanas [27]

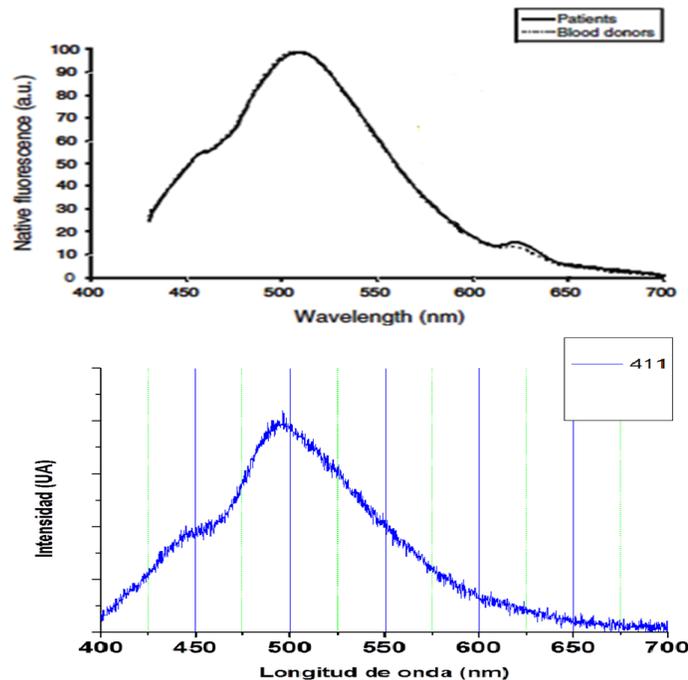


Figura 4.20: Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores espectros en color negro IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milan Italia[28]. En azul espectro medido por nuestro montaje experimental

Con los espectros anteriormente mostrados de diferentes autores hemos demostrado que nuestros espectros de fluorescencia de sangre se comportan de forma muy similar, presentando similar forma y bandas atribuibles. Esto hace fiable que nuestras medidas obtenidas puedan ser reproducibles. Las significativas variaciones en cuanto a intensidad de espectros de fluorescencia en suero de sangre en personas que presentan fallo renal y personas sanas, nos presenta una idea más clara que las personas que presentan fallo renal tienden a presentar espectros de fluorescencia con mayor intensidad, es importante aclarar que la variación que se presenta el espectro (color negro) de la figura 4.20, alrededor de 600 nm a 650 nm, es debido a que la excitación con la cual fueron tomadas estas medidas fueron con un máximo de excitación de 450 nm. Mientras que la de excitación para nuestro estudio fue de 365 nm. La variación relacionada al área bajo las curvas de los espectros de fluorescencia de personas que presentan fallo renal y personas sanas presentan una diferencia significativa esta puede ser vista en los anexos figura 6.7

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

El avance de los métodos no invasivos en medicina, para la detección de enfermedades, es una herramienta que con el tiempo tendrá un gran desarrollo en este campo, por la facilidad que estos pueden presentar para sus usuarios, en el momento de realizar un diagnóstico, como fue evidenciado en esta investigación.

En este trabajo se ha logrado contribuir de manera específica a la determinación de compuestos de glicación avanzada en estos sentidos:

- Brindar una propuesta alternativa para la toma de la medida de fluorescencia en tejido humano, los espectros de fluorescencia en tejido humano fueron obtenidos de la palma, el brazo y el dedo, brindando mayor intensidad los espectros obtenidos del dedo véase figura 4.2. Es importante mencionar que investigaciones de este tipo, realizadas en Los Países Bajos y en Bulgaria utilizaron para las medidas, la parte del antebrazo y la parte de la palma de la mano.
- Obtuvimos espectros de fluorescencia medidos en personas salvadoreñas, que hasta el momento no habían sido reportadas.
- En esta investigación observamos un pequeño cambio de intensidad de fluorescencia relacionada con personas que presentan posibles padecimientos de diabetes y personas que tienen el hábito de fumar.

- En los resultados al realizar una deconvolución gaussiana, podemos tomar el máximo a 440nm, atribuido al máximo de emisión de la banda del colágeno vinculado, un marcador para la acumulación de compuestos de glicación avanzada.
- Se logró evidenciar el cambio de la fluorescencia de tejido humano, en persona con fallo renal y personas sanas (Véase figura 4.10). Para personas con fallo renal estos resultados brindan mayor intensidad de fluorescencia con respecto a las personas sanas.

En lo relacionado con los espectros de fluorescencia en suero de sangre, estos brindan la siguiente información:

- Las muestras de suero de fallo renal presentan mayor emisión, que los espectros de personas sanas.
- Las muestras de fallo renal presentan una máximo de fluorescencia en 590nm, las muestras de suero de personas sanas presentan un máximo a 520nm (Véase en anexo figura 6.6).
- Las bandas más predominantes en la fluorescencia de fallo de están en 440nm, 490nm y 520nm.

5.2. Recomendaciones

- Para futuras investigaciones es importante realizar mediciones con una mayor muestra y de manera más sistematizada.
- Es importante para estos estudios la vinculación con profesionales de salud comprometidos con la investigación científica, esto conlleva, a realizar un estudio más detallado.
- En lo concerniente al experimento es importante la adquisición de más lámparas o fuentes de excitación como láseres, ya que esto brindaría más información para validar y para caracterizar el comportamiento de la fluorescencia de la piel de personas de nuestra región.
- La importancia de realizar medidas con filtros de interferencia, con el fin de excitar con longitudes de ondas específicas o bandas de excitación más estrechas logrará obtener una mejor señal de emisión y poder detectar específicamente la señal de emisión.

- Establecer una medida de la diferencia que puede ocasionar el fototipo de piel, la edad y el genero, ayudara a establecer un marcador más preciso para la determinación de compuestos de glicación avanzada.
- Realizar medidas de fluorescencia en tejido humano en personas que presentan problemas relacionados con la acumulación de compuestos de glicación avanzada.

Bibliografía

- [1] A. Arnold and Gary W. Small, Analytical Chemistry **77**, 5429(2005).
- [2] Esther G. Gerrits et al,Diabetes ,Care **31**,517(2008).
- [3] Hiroki Ueno et al,Metabolism Clinical and Experimental **57**, 1452 (2008).
- [4] Asociación Salvadoreña de Diabetes (ASADI).
- [5] International Diabetes Federation (IDF).
- [6] E. Hull, M. Ediger et al,.Optics Express**12**,4496(2004)
- [7] M.Koetsier, H.L.Lutgers et al,DIABETES TECHNOLOGY THERAPEUTICS,**125**(2010)
- [8] Douwe J. Mulder, Tara Van De Water et al,DIABETES TECHNOLOGY THERAPEUTICS**8**, Number 5,(2006).
- [9] Organización Mundial de la Salud (OMS). OMS
- [10] American Diabetes Association (ADS).
- [11] American Diabetes Association (ADS). “Todo sobre la resistencia a la insulina”, **5**2005.
- [12] Kathryn C.B. Tan et al,Diabetes Care **25**,1055(2002).
- [13] Alejandro Gugliucci,Rev Med. **16**,58 (2000).
- [14] R. Meerwaldt , T. P. Links ,et al,Diabetologia **48**,1637(2005).

- [15] R. Meerwaldt, T. Links, C. Zeebregts, R. Tio, J.-L. Hillebrands, and A. Smit, *Cardiovascular Diabetology* **7**, 29 (2008).
- [16] A. Pérez Ventura, Lic. Tesis, Universidad de El Salvador, 2013.
- [17] Young Freedman, Sears Zemansky, "Física Universitaria con Física Moderna", 12ed, PEARSON EDUCACIÓN, México, 2009.
- [18] Farrington Daniels and Robert A. Alberty, "Fisicoquímica", 2ed, CONTINENTAL, Mexico, 1973.
- [19] . Bliznakova, E. Borisova and L. Avramov, *ACTA PHYSICA POLONICA A.112*, (2007).
- [20] E. Borisova, P. Pavlova, and E. Pavlova, **16**, 53 (2012)
- [21] Demtröder W. "Laser Spectroscopy", 3ed., Springer, Berlin, Alemania (2003).
- [22] Ocean Optics, USB Optical Bench Options [en línea]. Febrero de 2011 [citado 20 de febrero de 2011]. Disponible en <http://www.oceanoptics.com/technical/detectortoshibatcd1304ap.pdf>.
- [23] Los datos extraídos de los gráficos de sensibilidad del detector y eficiencia de rejilla de difracción fueron proporcionados por R. Nolasco estudiante de lic en Física (2012)
- [24] E. G. Gerrits, H. L. Lutgers, N. Kleefstra, K. H. Groenier, A. J. Smit, R. O. B. Gans, and H. J. G. Bilo, *Journal of Diabetes Science and Technology* **2**, 572 (2008).
- [25] E. G. Gerrits, A. J. Smit, and H. J. G. Bilo, *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **24**, 710 (2009).
- [26] Courtesy of Nimmi Ramanujam, University of Wisconsin, Madison
- [27] Montaha Ahmad Al-Thunayan, M.Sc. Tesis, Universidad Rey Saud, 2006
- [28] M. Lualdi, A. Colombo, E. Leo, D. Morelli, A. Vannelli, L. Battaglia, E. Poiasina, and R. Marchesini **93**, 567 (2007).

- [29] H. Zeng, C. MacAulay, D. I. McLean, and B. Palcic, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **38**, 234 (1997).

Capítulo 6

Anexos

Con la finalidad de realizar una mejor de nuestras medidas obtenidas presentamos los espectros obtenidos en nuestra y los datos obtenidos en otras investigaciones después de haber sido extraídos con un programa el cual nos permitió extraer los datos de las imágenes de los espectros.

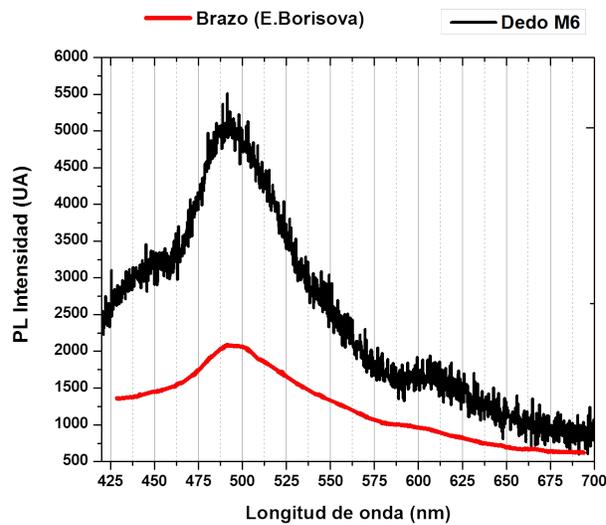


Figura 6.1: Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en palma por E. Borisova [20]

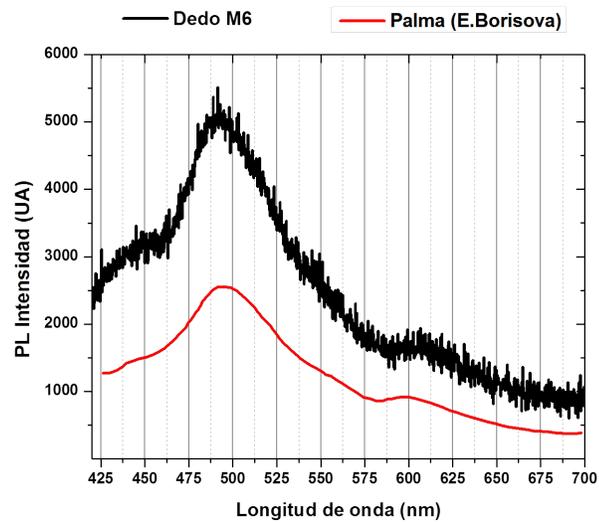


Figura 6.2: Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores. Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en brazo por E. Borisova [20]

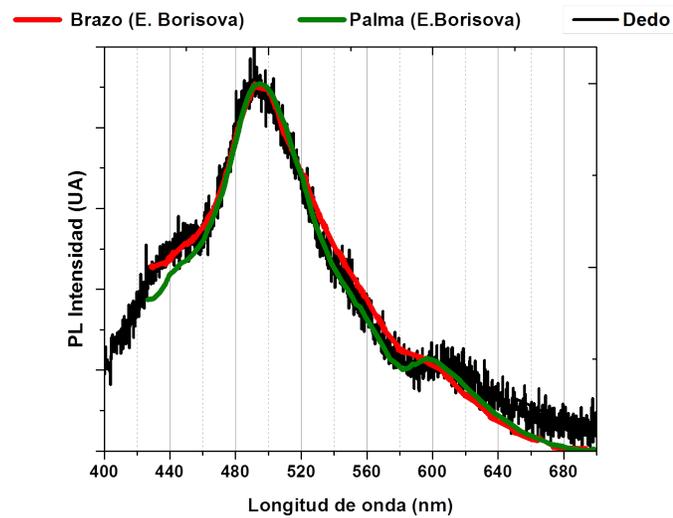


Figura 6.3: Espectros de fluorescencia normalizados

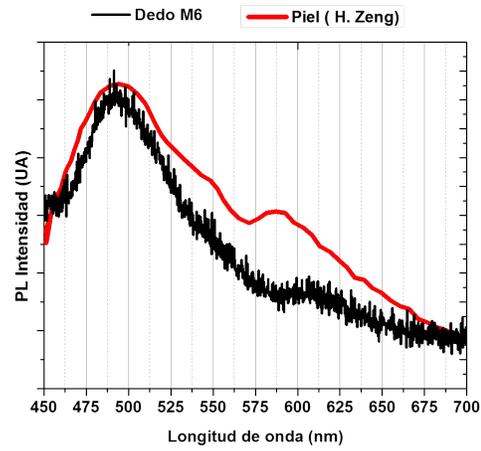


Figura 6.4: Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en piel por H.Zeng [29]

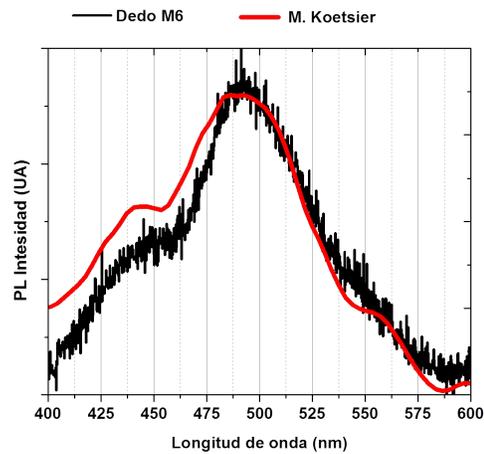


Figura 6.5: Comparación de espectros de fluorescencia obtenidos con otros autores .Espectros en color negro medido por nuestro montaje experimental en dedo. En rojo medido en brazo por M. Koetsier [7]

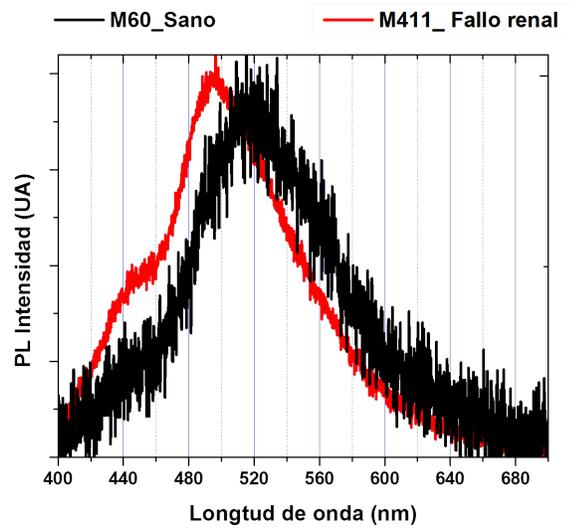


Figura 6.6: Comparación de espectros de fluorescencia de suero persona sana y persona con fallo renal

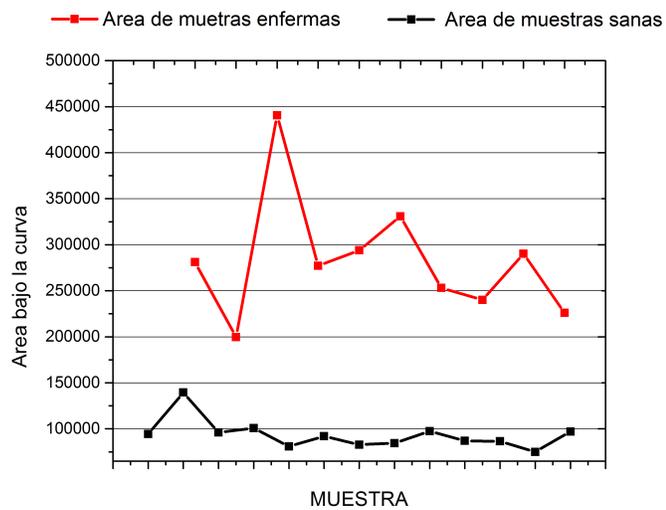


Figura 6.7: Comportamiento del área bajo la curva de espectros de fluorescencia de personas sanas y personas con insuficiencia renal