



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**SISTEMA DE ELECTRO-ESTIMULACIÓN Y
ADQUISICIÓN DE IMÁGENES PARA
ESTUDIOS BIOMÉDICOS EN
NEUROCIENCIAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN COMPUTACIÓN**

P R E S E N T A:

CARLOS NOLLA SALTIEL

DIRECTOR DE TESIS:

**M. en I. ROBERTO GIOVANNI RAMÍREZ
CHAVARRÍA**



Ciudad Universitaria

2016

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. BORIS ESCALANTE RAMÍREZ
VOCAL: M.I. ROBERTO GIOVANNI RAMÍREZ CHAVARRÍA
SECRETARIO: ING. MOISES EUGENIO RUEDA GUTIÉRREZ
1ER. SUPLENTE: DRA. CELIA ANGELINA SÁNCHEZ PÉREZ
2DO. SUPLENTE: DR. HÉCTOR EDUARDO LÓPEZ VALDÉZ

Sitio donde se desarrolló el trabajo

**CENTRO DE CIENCIAS APLICADAS Y DESARROLLO
TECNOLÓGICO, UNAM**

LABORATORIO DE SENSORES ÓPTICOS

Asesor del tema:

M.I. Roberto Giovanni Ramírez Chavarría

Sustentante:

Carlos Nolla Saltiel

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Ingeniería por permitirme realizar mis estudios.

A mis padres, Gerardo y Ana, por apoyarme en este y todos mis proyectos, así como por enseñarme a comprender desde diferentes perspectivas. Por siempre estar ahí.

A Beto, por encabezar la lista de grandes seres humanos que sin darse cuenta siempre enseñan cosas valiosas a los demás. Por apoyarme, a veces también sin darse cuenta.

A mis abuelos Susana, Alberto, Ramón y Elena, por ser incondicionales y mantener las cosas unidas y en su balance justo. Por enseñarnos que en la vida siempre es más importante el dar que el recibir.

A mi familia sanguínea y a mi familia por elección. A Lalo, Andrea, Sergio, Alejandro, Anell, Rafa.

A Giovanni, mi director de tesis, y a la Doctora Celia, por demostrarme que la paciencia y perseverancia son valores que dejan frutos placenteros. Sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

A México, por enseñarme que en la vida siempre es necesario seguir creciendo y aprendiendo de todo lo que la vida tiene que ofrecer. Por mostrarme que las cosas se pueden hacer bien. Por ser una de las razones de ser.

A todos y cada uno de los trabajadores de la UNAM, quienes sin saberlo son parte del sustento y base que hace que nuestro país gire sus engranes.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, por el apoyo brindado a través del proyecto PAPIIT IT100515.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
PREFACIO	5
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Electro-estimulación en neurociencias	8
1.2. Sistemas de electro-estimulación	9
1.3. Planteamiento del problema	13
1.4. Sistema de electro-estimulación y monitoreo de la respuesta eléctrica propuesto..	14
Referencias del Capítulo 1	15
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	
2.1. Respuesta eléctrica en tejidos biológicos	16
2.2. Respuesta óptica en tejidos biológicos	18
2.3. Instrumentación para la electro-estimulación en tejidos biológicos	18
2.3.1. Electroodos	19
2.4. Adquisición de imágenes	20
2.4.1. Adquisición basada en CMOS (<i>Complementary Metal-Oxide Semiconductor</i>).....	21
2.4.2. Adquisición basada en CCD (<i>Charged-Coupled Device</i>)	21
2.5. Sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes	22
Referencias del Capítulo 2	24
CAPÍTULO 3. DISEÑO E INTEGRACIÓN DEL SISTEMA	
3.1. Unidad de control	25
3.2. Subsistema de electro-estimulación	28
3.2.1. Señales de excitación	28
3.2.2. Fuente de corriente controlada por voltaje	29
3.2.3. Obtención del menor tiempo de respuesta posible	30
3.2.4. Voltaje de complianza y aislamiento eléctrico	31
3.2.5. Interacción fuente de corriente-tejido biológico	32

3.2.6. Calibración del electro-estimulador	32
3.2.6.1. Voltaje en la carga vs ciclo de trabajo	33
3.2.6.2. Corriente constante en la carga	33
3.2.6.3. Carga variable y voltaje en la carga	37
3.2.6.4. Calibración del electro-estimulador empleando la corriente en la carga como parámetro	38
3.3. Subsistema de adquisición de imágenes	39
3.3.1. Cámara Mightex™ CCE-B013-U.....	39
3.3.2. Lente de la cámara	40
3.3.3. Sistema de posicionamiento mecánico	41
3.3.4. Calibración del sistema de visión	41
3.4. Banco de pruebas	44
3.5. Interfaz gráfica de control	46
 Referencias del Capítulo 3	 47
 CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	
4.1. Procedimiento de medición	48
4.2. Monitoreo de la respuesta cerebral por electro-estimulación en ratones.....	50
4.3. Procesamiento de las imágenes	52
 Referencias del Capítulo 4	 55
 CONCLUSIONES	 56
 ANEXOS	
ANEXO A. HOJAS DE ESPECIFICACIONES DE CIRCUITOS INTEGRADOS ...	58
ANEXO B. MICRO-CONTROLADORES	66

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Electro-estimulador comercial A360LA de <i>World Precision Instruments Inc.</i> USA.	10
Figura 1.2. Modelo ISO-Flex de A.M.P.I.	11
Figura 1.3. Modelo NL800A de <i>Digitimer/Neurolog</i>	12
Figura 1.4. Comparación al aplicar voltaje y corriente	13

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Figura 2.1. Diagrama eléctrico general del tejido biológico	16
Figura 2.2. Diagrama eléctrico general del tejido biológico cuando $\omega \rightarrow \infty$	17
Figura 2.3. Diagrama eléctrico general del tejido biológico cuando $\omega = 0$	18
Figura 2.4. Electrodo sub-dérmico	20
Figura 2.5. Electrodo de parche	20
Figura 2.6. Chip CMOS	21
Figura 2.7. Chip CCD	22

CAPÍTULO 3. DISEÑO E INTEGRACIÓN DEL SISTEMA

Figura 3.1. Diagrama de bloques del sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes.	25
Figura 3.2. Diagrama de flujo del proceso de electro-estimulación y adquisición de imágenes..	26
Figura 3.3. Diagrama del sistema mínimo y comunicación	27
Figura 3.4. Diagrama del filtro paso bajas y construcción de señales SC1, SC2 y V_{pulso}	29
Figura 3.5. Diagrama general de una Fuente de Corriente Controlada por Voltaje (FCCV)	29
Figura 3.6. Tiempo de respuesta del FET IRF630 a 100[Hz]	30
Figura 3.7. Tiempo de respuesta del BJT 2N6515 a 100[Hz]	31
Figura 3.8. Construcción del voltaje de complianza	32
Figura 3.9. Ciclo de Trabajo Señal SC1 vs. Voltaje en la carga	33
Figura 3.10. Ciclo de Trabajo Señal SC1 vs. Voltaje en la carga	35
Figura 3.11. Ciclo de Trabajo Señal SC1 vs. Voltaje en la carga	36
Figura 3.12. Voltaje en la resistencia de carga, en función de la resistencia para diferentes ciclos de trabajo de SC1	37
Figura 3.13: Corriente de estimulación solicitada vs corriente de estimulación obtenida	38
Figura 3.14. Cámara Mightex™	40
Figura 3.15. Cámara Mightex™ con macroscopio	40
Figura 3.16. Base, micro-manipulador y la cámara sujetos en una sola estructura	41
Figura 3.17. Pruebas de calibración del sistema de visión empleando un LED	42
Figura 3.18. Imagen enfocada	43
Figura 3.19. Imagen desenfocada	43

Figura 3.20. Histograma que muestra la saturación del CCD durante la experimentación	43
Figura 3.21. Mesa de trabajo (1) con termómetro regulador de temperatura (2)	44
Figura 3.22. Mesa de trabajo con la mascarilla de anestesia y las piezas de sujeción del cráneo ...	45
Figura 3.23. Banco de pruebas funcionando con el sujeto de pruebas (1). Cráneo expuesto (2) ...	45
Figura 3.24. <i>Rig</i> de estimulación (1), adquisición de imágenes (2), posicionamiento (3), iluminación (4), anestesia (5) y control de temperatura (6)	46
Figura 3.25. Interfaz gráfica de usuario (<i>GUI</i>) en donde se aprecian los controles para "moldear" la señal de estimulación	46

CAPÍTULO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Figura 4.1. Diagrama de un protocolo de estimulación	49
Figura 4.2: Representación de la respuesta (irrigación sanguínea) que ocurre en el tejido cerebral del ratón, con respecto al tiempo	49
Figura 4.3. Cráneo del ratón expuesto e iluminado con luz verde-turquesa	50
Figura 4.4. Colocación de los electrodos en la pata del ratón	50
Figura 4.5. Sistema en funcionamiento	51
Figura 4.6. Señales de electro-estimulación	51
Figura 4.7. <i>Zoom in</i> al experimento efectuándose en el sujeto de pruebas. 1) Cámara. 2) Sujeto de pruebas	52
Figura 4.8. Imágenes del cráneo de un ratón estimulado e iluminado a 617[nm]. Efecto de la absorción por la hemoglobina oxigenada	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Variación del ciclo de trabajo SC1 empleando $R_L = 1000 \pm 50[\Omega]$	34
Tabla 3.2. Variación del ciclo de trabajo SC1 empleando $R_L = 50,000 \pm 500[\Omega]$	35
Tabla 3.3. Variación del ciclo de trabajo SC1 empleando $R_L = 100,000 \pm 500[\Omega]$	36
Tabla 3.4. V_{RL} en función del ciclo de trabajo y de la magnitud de la carga R_L	37
Tabla 3.5. Diferencia entre la corriente de estimulación obtenida y solicitada	38
Tabla 3.6. Especificaciones técnicas de la cámara Mightex TM CCE-B013-U	39
Tabla 4.1. Descripción del procesamiento de las imágenes	53

P R E F A C I O

En la actualidad, en las áreas de la neurología y neurociencias, existe la necesidad de realizar estudios cada vez más precisos y actualizados del cerebro humano y sus enfermedades. Según datos del INEGI en el período comprendido entre el 1 de enero y el 26 de mayo de 2016, en México han ocurrido 33,166 defunciones causadas por enfermedades cerebrovasculares.*

En la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), existe un grupo de investigación en neurociencias que crea e implementa protocolos de investigación con el objetivo de desarrollar fármacos capaces de tratar enfermedades cerebrovasculares y trastornos neurológicos como el infarto cerebral en humanos. Debido a ello, este grupo de investigación tiene la necesidad de mejorar y adaptar técnicas para el desarrollo de dichos fármacos. Uno de los métodos empleados es la obtención de imágenes, con el objetivo de construir los denominados mapas cerebrales. Este tipo de mapas se obtienen al aplicar un estímulo en el cuerpo de un sujeto de pruebas para que, de manera simultánea, por medio de técnicas de adquisición de imágenes basadas en la reflexión de la luz en el cerebro, se detecten las respuestas biológicas en dicho órgano dada la estimulación. Estos mapas cerebrales permiten al neurocientífico conocer a qué sección del cerebro corresponden las diferentes extremidades y áreas sensoriales de los individuos y por lo habitual se realizan en ratones debido a las semejanzas estructurales que tienen sus cerebros en comparación con los cerebros humanos.

Una vez que se realiza el proceso de obtención de los mapas cerebrales de un ratón y con ello se conoce con certeza qué área cerebral corresponde con las diferentes regiones de su cuerpo, se procede a realizar un daño en el cerebro utilizando un láser. El daño realizado en el tejido después de aplicar el láser tiene las mismas características que presenta el tejido cuando ocurre un infarto cerebral y es bajo estas circunstancias que se puede someter a tratamiento para recuperarlo.

Se sabe que esta condición cerebral se puede dar por diversos motivos en un punto concreto de la vida de un ser humano y es por ello que es importante realizar estudios que permitan desarrollar fármacos u otras alternativas para permitir que el individuo, una vez que ha sufrido dicho problema, se pueda recuperar en la mayor medida posible.

El presente trabajo comprende la investigación, el desarrollo y las pruebas realizadas en un sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes que permitan al neurocientífico desarrollar las pruebas necesarias en ratones y que, gracias a ello, posteriormente se puedan probar y desarrollar fármacos adecuados para tratar dichos problemas de salud en humanos. Este sistema consta de dos módulos fundamentales: un electro-estimulador que es el encargado de proporcionar por medio de electrodos estimulación al cuerpo del ratón sin dañarlo, cuya señal de electro-estimulación es controlada desde una computadora central; y una cámara que permite adquirir imágenes suficientes, con buena calidad y que estén sincronizadas con el proceso de electro-estimulación. El proceso posterior que involucra dañar el tejido cerebral del ratón por medio de un láser no se realiza con este sistema, sino que se hace una vez que se han adquirido los mapas cerebrales.

[*] <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c> (consultado el 17 de octubre, 2016)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta una introducción con el fin de entender en qué consiste un sistema de electro-estimulación, su uso y la importancia que tiene este tipo de tecnología para diversas áreas de la ciencia como la biología, la medicina y las neurociencias.

1.1. Electro-estimulación en neurociencias

Desde la época de la Ilustración se sabe que todas las actividades motrices que son capaces de realizar los seres vivos, en la gran mayoría de los casos, se deben gracias a que sus cuerpos se encuentran *conectados* directamente a una unidad de control. Dicha unidad de control, como bien sabemos, es el cerebro. En cuanto a los seres humanos se refiere, el cerebro controla todas las actividades conscientes e inconscientes que ocurren en todos los sistemas y subsistemas anatómicos/biológicos, sin embargo, a pesar de conocer la función de dicho órgano, no siempre han sido claros los mecanismos mediante los cuales el cerebro controla al cuerpo.

Debido a que se sabe que cualquier actividad motriz y sensorial en el cuerpo de un individuo sucede gracias a la conexión que existe entre este y su cerebro, surgió la idea de buscar alternativas para conocer claramente cuáles son las diferentes áreas cerebrales y cuáles de estas controlan directa e indirectamente determinado tejido biológico, órgano y/o extremidad del cuerpo. Es durante principios del siglo XX que, en áreas de la salud como la neurología y las neurociencias, se presentó la necesidad de contar con instrumentos capaces de realizar algún tipo de registro sobre este hecho. A este tipo de registro, por la cuestión de tratarse de la relación directa entre el cuerpo y el cerebro, se le conoce como mapa cerebral.

Estos mapas cerebrales se realizan aplicando algún tipo de estimulación en la extremidad o tejido de un individuo y registrando mediante cierto mecanismo la respuesta cerebral. Dicha estimulación se puede realizar de diversas maneras como colocando en la extremidad pequeños motores que la muevan o aplicando, mediante la utilización de electrodos, un voltaje o una corriente.

Por otro lado, pensando en la complejidad que este tipo de instrumentos representarían tanto en desarrollo como en implementación, fue que se pensó que la mejor forma de realizar los denominados mapas cerebrales sería mediante el uso de animales de prueba. En este caso particular fue necesario utilizar animales que presentaran suficientes similitudes cerebrales con los seres humanos. De esta manera sería posible realizar una aproximación lo suficientemente precisa y conocer, de manera indirecta, el funcionamiento del cerebro humano.

1.2. Sistemas de electro-estimulación

Debido a la aplicación tan específica que este tipo de instrumentación tiene actualmente, los electro-estimuladores son de suma importancia para diversas áreas de la ciencia como la electro-fisiología, la biología y la neurología.

Un electro-estimulador internamente consta de ciertos componentes fundamentales como circuitos para generación de pulsos, fuentes de corriente y/o de voltaje, elementos para aislar al sujeto bajo estimulación como transformadores, circuitos acopladores de impedancias, en algunos casos baterías, perillas y salidas en donde se conectan electrodos. Sin embargo, la cantidad y tipo de elementos que los componen son completamente dependientes de la aplicación final para el que quiera ser utilizado, como por ejemplo aplicaciones en tejidos biológicos *in vitro*, *in vivo*, seres humanos o animales.

Para poder desarrollar un electro-estimulador es importante tener clara su aplicación final debido a las diferencias sutiles e importantes que existen en su diseño y construcción. Los electro-estimuladores, como su nombre lo indica, hacen uso de alguna variable eléctrica para realizar estimulación en alguna extremidad o tejido de un individuo. Como se sabe, las variables eléctricas de las cuales podemos echar mano son la intensidad de corriente (I) y la diferencia de potencial o voltaje (V). Algunos electro-estimuladores interactúan controlando una sola variable eléctrica pero existen modelos que, por medio de una perilla, tienen la posibilidad de elegir entre cualquiera de las mencionadas magnitudes eléctricas para realizar la estimulación. Es importante hacer énfasis en que la electro-estimulación nunca se realiza sobre el tejido cerebral, sino que esta se hace sobre una extremidad o sección de tejido del cuerpo de un individuo para el que se desean realizar los mapas cerebrales mencionados, y que, ya sea la I o el V la variable eléctrica utilizada, únicamente se utiliza una de las dos a la vez y no ambas durante el proceso de electro-estimulación.

En términos eléctricos los electro-estimuladores cuentan con ciertos parámetros, algunos variables y otros constantes, que permiten moldear la señal de estimulación (1) y asegurar que las magnitudes eléctricas a la salida serán como se esperan (2). Además es importante notar que, eléctricamente hablando, cualquier individuo o sección de tejido que sea conectado entre los electrodos del aparato, representa para este último una carga (R_L).

Algunos parámetros que pueden ser modificables para moldear la señal de estimulación (1) son: la magnitud de la señal de I o de V y el rango de esta, frecuencia, ciclo de trabajo, período y si esta será unipolar o bipolar. En cuanto a asegurar que las magnitudes eléctricas a la salida son las que se esperan (2), tenemos que hablar de cualidades como el tiempo de levantamiento (T_L) que es el tiempo que tarda el aparato en proporcionar a su salida la señal solicitada; la mínima y la máxima carga que se puede conectar entre los electrodos, así como el voltaje de complianza (V_{comp}) que, a medida que este sea mayor, se puede asegurar casi inmediatamente que la magnitud de las cargas conectadas (R_L) pueda ser mayor.

A continuación se presentan algunos modelos de electro-estimuladores comerciales y prototipos hallados en los artículos consultados para la realización de este trabajo.

En la FIGURA 1.1 se puede observar un electro-estimulador comercial construido por la empresa *World Precision Instruments Inc.*¹ cuyo modelo es el *A360LA* y que cuenta con las

siguientes características. Este modelo comercial es empleado principalmente en aplicaciones biológicas.



Figura 4.1. Electro-estimulador comercial A360LA de *World Precision Instruments Inc.* USA.

Este modelo incluye:

- Voltaje de complianza (V_{comp}) de hasta 130[V]
- Rango de corriente de salida 10[mA], 1.0[mA] y 100[uA]
- Emplea baterías recargables
- Máxima resistencia de carga (R_L): 12[k Ω] a 10[mA], 120[k Ω] a 1[mA] y 1.2[M Ω] a 100[uA]
- Tiempo de levantamiento de corriente: 2[us] con una carga de 1[k Ω] y 5[us] con una carga de 10[k Ω]¹

En la FIGURA 1.2 se aprecia otro electro-estimulador comercial construido por la empresa A.M.P.I.² cuyo modelo es el *ISO-Flex* y que cuenta con las siguientes características eléctricas y de estimulación:



Figura 1.5. Modelo ISO-Flex de A.M.P.I.²

Este modelo incluye:

- Voltaje de complianza (V_{comp}) de hasta 90[V]
- Rango de corriente de salida 0[mA] a 10[mA]
- Funciona mediante baterías recargables
- Máxima resistencia de carga de 9[k Ω]
- Es posible seleccionar por medio de una perilla la variable de estimulación

En la FIGURA 1.3 es posible ver la carátula frontal de un electro-estimulador comercial construido por la empresa *Digitimer/Neurolog*³ cuyo modelo es el *NL800A* y que cuenta con las siguientes características eléctricas y de estimulación:



Figura 1.6. Modelo NL800A de *Digitimer/Neurolog*.³

Características:

- Tiene una entrada a través de la cual se alimenta una señal pequeña que el aparato posteriormente acondiciona para realizar la electro-estimulación
- Voltaje de complianza (V_{comp}) de hasta 44[V]³
- Rango de corriente de salida seleccionable por medio de una perilla de 10[μ A], 100[μ A], 1[mA] y 10[mA]
- Máxima resistencia de carga de 4.4 [k Ω]
- Funciona mediante baterías recargables

Como se pudo observar los electro-estimuladores anteriormente descritos presentan características semejantes entre sí pero no todos tienen la limitante de sólo estimular con corriente o con voltaje, sino que en ocasiones cuentan con una perilla para realizar la selección del tipo de estimulación.

Hay varias razones importantes a partir de las cuales un electro-estimulador realizará su labor por medio de corriente o por voltaje. La primera razón radica en el hecho de que, al construir un electro-estimulador basado en corriente, el diseño de este se facilita desde el punto de vista de la instrumentación involucrada. La segunda razón, que es sumamente importante se debe a que, como bien se sabe, el exceso de corriente puede ocasionar daños en el tejido bajo pruebas y/o en el circuito involucrado. De esta manera es claro entender que, al ser la corriente la que puede dañar, existe una necesidad considerable de tener control sobre ella.⁴

En la FIGURA 1.4 es posible observar una comparación de los resultados que se deben medir al aplicar voltaje o corriente respectivamente en una carga.

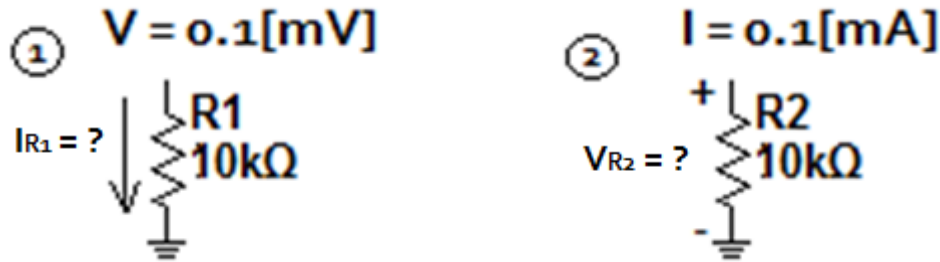


Figura 1.4. Comparación al aplicar voltaje y corriente.

De la FIGURA 1.4, podemos observar que

$$I_{R1} = \frac{V}{R_1} \quad (1.1)$$

por lo que $I_{R1} = 0.01[\mu A]$, mientras que

$$V_{R2} = R_2 I \quad (1.2)$$

entonces $V_{R2} = 1[V]$

Es importante notar que, si se aplica corriente (caso 2), la variable a medir será un voltaje cuya magnitud es considerablemente mayor a que si se aplicara voltaje (caso 1). En el caso 1 la corriente a medir se encontraría en el orden de 10^{-6} Amperes, con lo cual, al realizar una medición, la relación señal a ruido (*SNR* por sus siglas en inglés) sería considerablemente más grande que en el caso 2 y por ello la instrumentación necesaria para realizar las mediciones sería más complicada y costosa.

1.3 Planteamiento del problema

Algunos electro-estimuladores generan pulsos eléctricos de voltaje controlados, de corriente y/o ambos para poder manipular tejido biológico y con ello obtener reflejos a dichos impulsos en determinadas regiones cerebrales.

Al estimular fisiológicamente diferentes áreas en las extremidades de un sujeto de pruebas, es posible determinar y generar un mapa cerebral de las zonas del cerebro en donde la mencionada extremidad se encuentra conectada. Para ello, se recurre a técnicas de monitoreo cerebral como la que se basa en la detección de la reflexión de luz que es absorbida por la sangre en el cerebro, siendo esta la que se utilizó en el presente trabajo.^{5,6}

Posteriormente a la localización exacta de la conexión extremidad-cerebro, se hace uso de una técnica para dañar parte del tejido en el cerebro, simulando con ello un infarto cerebral.⁵ Esta técnica llamada foto-trombosis consiste en hacer incidir durante pocos segundos luz láser de baja potencia de alrededor de 100[mW] directamente sobre el área elegida del tejido cerebral. El efecto obtenido con este laser es que el tejido en dicha área se daña y, con ello, los procesos comunes del cerebro se ven mermados y casi carentes de función. Mediante esta técnica se logra *emular* la situación del cerebro en el caso de que exista un infarto cerebral, en donde, al tener dañada cierta zona del tejido cerebral, dejan de existir reflejos fisiológicos para las extremidades que se encuentran directamente ligadas con dicha área dañada.

1.4 Sistema de electro-estimulación y monitoreo de la respuesta eléctrica propuesto

El sistema que se presenta en este trabajo fue desarrollado para el grupo de investigación en neurociencias de la Facultad de Medicina de la UNAM en el que se realizan investigaciones para tratar enfermedades neurológicas como el infarto cerebral y el Alzheimer, apoyando al desarrollo de fármacos capaces de tratar dichos padecimientos.

La realización de este trabajo comprende el hecho de que, aunque actualmente existen gran cantidad de alternativas en cuanto a equipo se refiere para realizar electro-estimulación así como para construir mapas cerebrales suficientemente ricos en información para el neurocientífico, se presentan importantes inconvenientes ya que la gran mayoría de los equipos médicos existentes usualmente representan una carga económica importante para las instituciones médicas y para los científicos que laboran realizando experimentación enfocada a las neurociencias aunado al hecho de que este tipo de equipo no es suficientemente versátil ni fácil de instalar y utilizar.

Este trabajo busca disminuir las dificultades técnicas que al neurocientífico le puede ocasionar utilizar equipo construido por las empresas mencionadas, pero, además de ello, el sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes construido no se trata únicamente de un electro-estimulador, sino de un instrumento que permite realizar electro-estimulación y adquisición de imágenes de manera simultánea, por lo que fue necesario desarrollar mecanismos de comunicación entre ambos dispositivos.

Se buscó que el sistema cumpliera con las siguientes características:

1. Empleo de corriente como variable de electro-estimulación
2. Corriente de la señal de electro-estimulación configurable entre 0[uA] y 580[uA], con pasos unitarios controlados digitalmente
3. Frecuencia de la señal de electro-estimulación configurable entre 0[Hz] y 500[Hz], con pasos unitarios controlados digitalmente
4. Ciclo de trabajo de la señal de electro-estimulación configurable entre 0% y 100%, con pasos unitarios controlados digitalmente
5. Voltaje de complianza de 180[V]
6. Máxima resistencia de carga de hasta 300[k Ω]
7. Aislamiento galvánico entre el electro-estimulador, el sujeto de pruebas y el circuito de potencia
8. Aislamiento óptico entre el electro-estimulador y la computadora central
9. Control y configuración de los parámetros de electro-estimulación realizado desde una interfaz de usuario en la computadora central
10. Interfaz de usuario corriendo en una computadora personal
11. Software de control para una cámara de 12 bits y para ordenar imágenes proporcionados por esta
12. Bajo costo
13. Portable

En este capítulo se explicó qué son los electro-estimuladores, por qué son importantes en diversas áreas de la ciencia y cuáles son algunos de los que existen actualmente en el mercado. Por otro lado, se explicó de forma general el funcionamiento del sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes, pensando en la versatilidad técnica que este sistema debería tener. En el siguiente capítulo se abordan los aspectos teóricos sobre los cuales un sistema de este tipo está fundamentado, así como los bloques tecnológicos que permiten el correcto funcionamiento del sistema.

Referencias del Capítulo 1

[1] <https://www.wpiinc.com/> (consultado el 10/09/2016)

[2] <http://www.ampi.co.il/isoflex.html> (consultado el 10/09/2016)

[3] <https://digitimer.com/> (consultado el 10/09/2016)

[4] Stimulators: <https://www.wpiinc.com/productindexpages/electrophysiology-research-animal-physiology-equipment/>

[5] López-Valdés Héctor E., et.al (2013). *Memantine Enhances Recovery from Stroke*. *Stroke, Journal of the American Heart Association*, p.9, EUA.

[6] C. Harrison Thomas, et.al (2009). *Simple and cost-effective hardware and software for functional brain mapping using intrinsic optical signal imaging*. Elsevier, *Journal of Neuroscience Methods*, p.9, Canadá.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

Para poder describir al sistema construido en el presente trabajo es necesario mencionar todos los bloques tecnológicos involucrados en este, de esta manera la comprensión de todos los términos que se utilizarán tendrán una base teórica fundamentada.

2.1. Respuesta eléctrica en tejidos biológicos

En términos eléctricos se puede decir que el tejido biológico posee una impedancia, la cual, para este caso, se denomina bio-impedancia. Dicha impedancia es una propiedad física de los tejidos que representa la resistencia de estos con respecto a la frecuencia angular (ω) y es por lo tanto cuantificable en términos de una magnitud y una fase:

$$\omega = 2\pi f \text{ [Hz]} \quad (2.1)$$

Desde el punto de vista electrostático, un tejido biológico puede ser modelado como un circuito eléctrico de parámetros concentrados, de tal forma que un circuito equivalente (FIGURA 2.1) se considera un elemento resistivo asociado a la conductividad (σ) del tejido y un elemento capacitivo (ϵ) asociado a la permitividad eléctrica de éste.

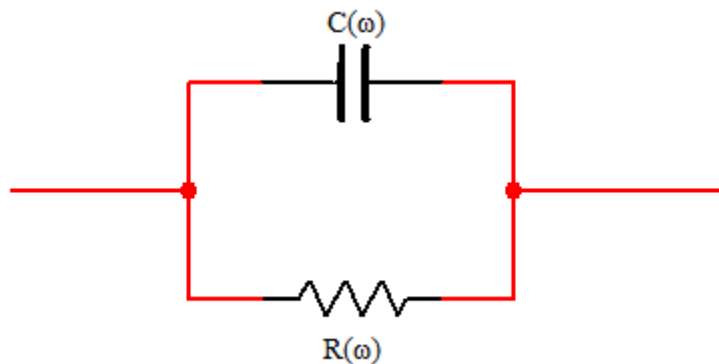


Figura 2.1. Diagrama eléctrico general del tejido biológico.

Es importante recordar que, debido a que este circuito será excitado por una corriente alterna a una frecuencia ω , ambos elementos se pueden modelar empleando las ecuaciones de la impedancia, de donde se desprende que la impedancia eléctrica del circuito mostrado en la FIGURA 2.1 es:

$$Z = R + \frac{1}{j\omega C} \quad (2.2)$$

$$X_C = \frac{1}{j\omega C} \quad (2.3)$$

De las ecuaciones 2.1 y 2.2 podemos observar que la parte real corresponde a la resistencia y que la parte imaginaria corresponde únicamente al capacitor que es dependiente de la frecuencia de excitación ω .

Si utilizamos la ecuación 2.2 podemos tomar en consideración dos posibles casos:

1. La frecuencia ω es muy grande, es decir

$$\omega \rightarrow \infty \quad (2.4)$$

2. La frecuencia ω no existe, es decir, el ciclo de trabajo de la señal de excitación es del 100%, por lo tanto

$$\omega = 0 \quad (2.5)$$

Por lo tanto podemos observar del caso 1 que $X_C \rightarrow 0$, por lo que el circuito es meramente capacitivo, ya que toda la corriente (i) pasará únicamente por el capacitor, como se puede apreciar en la FIGURA 2.2.

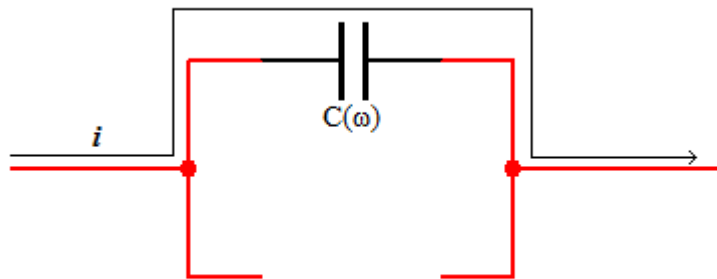


Figura 2.2. Diagrama eléctrico general del tejido biológico cuando $\omega \rightarrow \infty$.

Por otro lado podemos observar del caso 2 que $X_C = \frac{1}{\omega} \rightarrow \infty$, por lo que el circuito es meramente resistivo, ya que toda la corriente (i) pasará únicamente por la resistencia, como es apreciable en la FIGURA 2.3.

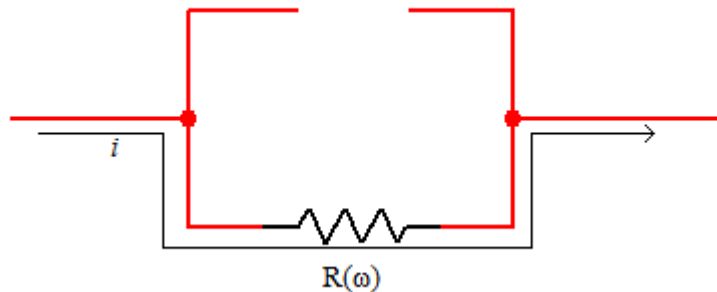


Figura 2.3. Diagrama eléctrico general del tejido biológico cuando $\omega = 0$.

Debido a lo anterior es que a partir de este punto se nombrará al tejido biológico estimulado como resistencia de carga, considerando que la reactancia capacitiva se encuentra implícita en dicha carga.

2.2. Respuesta óptica en tejidos biológicos

Existen muchos mecanismos para conocer ópticamente la respuesta del tejido biológico a determinados estímulos. Para el caso particular de este trabajo es importante poder detectar ópticamente el momento en el que el electro-estimulador proporciona corriente eléctrica al sujeto de pruebas, así como el momento en que este deja de proporcionar el estímulo eléctrico y el momento en el que se permite que el tejido tenga un momento de reposo de dicha estimulación. Esta última parte podría considerarse que es tan importante como la estimulación en sí, debido a que los tejidos biológicos deben pasar por una denominada *etapa basal*, la cual sólo ocurre posteriormente a la estimulación y se refiere a los instantes de tiempo en los que sucede el menor reflejo cerebral a nivel anatómico dada la estimulación.¹

El principio de monitoreo del tejido cerebral que se utiliza en este sistema se basa en el mismo fundamento que utilizan otros sistemas médicos como los oxímetros. Estos aparatos permiten conocer la saturación de oxígeno en la sangre y algunos funcionan haciendo pasar luz a través de tejido del individuo para posteriormente cuantificar la cantidad de luz que logró atravesar dicho tejido.

Se sabe que la sangre tiene muchas propiedades. Una de las más importantes, al menos para esta aplicación, es la concentración de oxígeno (O_2) que esta tiene en determinado momento. Se dice que la sangre oxigenada es la denominada *oxi-hemoglobina*, mientras que la sangre carente de oxígeno o con poca concentración de oxígeno es la denominada *de-oxi-hemoglobina*.

Por otra parte, se sabe que la luz es absorbida y reflejada de forma diferente en distintos materiales. Para el caso de la sangre oxigenada (Oxihemoglobina), conocemos el hecho de que esta absorbe más luz infrarroja (800 a 1400[nm]) que luz roja (700 a 635[nm]), pero como lo que nos interesa medir en este sistema es la cantidad de luz reflejada, podemos aplicar el concepto a la inversa e iluminar con luz roja a nuestro sujeto de pruebas para detectar la cantidad de luz reflejada. En este experimento se utilizó luz a 617[nm] emitida por un LED (*Light Emitting Diode*), la cual es considerada como una luz rojo-naranja.

Además de utilizar luz rojo-naranja en algunas pruebas se recurre a la utilización de luz verde (550[nm]), debido a que esta resalta los vasos sanguíneos del cerebro y permite obtener una imagen mucho más clara de la reflexión de luz buscada. Debido a ello, este tipo de luz se emplea para realizar imágenes de control o referencia durante las primeras repeticiones de experimentación para posteriormente cambiar a luz rojo-naranja.^{1,2}

2.3. Instrumentación para electro-estimulación en tejidos biológicos

Como se ha mencionado existen diferentes formas de realizar electro-estimulación a un tejido biológico. Para cualquiera que sea la variable eléctrica elegida al realizar la electro-estimulación, es muy importante que el electro-estimulador presente aislamiento eléctrico con el sujeto a estudiar y una buena relación señal a ruido (*SNR*).

Normalmente los electro-estimuladores comerciales se utilizan para trabajar con rebanadas de tejido cerebral, es decir, se trata de muestras de tejido *in vitro*. En este tipo de aplicaciones es fundamental que el electro-estimulador sea lo más inmune al ruido electromagnético debido a que

las señales que se miden en este tipo de experimentación son sumamente pequeñas, en el orden de 10^{-12} [A] y 10^{-12} [V].

Una de las propuestas que los fabricantes de electro-estimuladores proporcionan para disminuir lo más posible el ruido eléctrico/magnético es la utilización de baterías para el circuito de salida del electro-estimulador. Es por esta razón que no es habitual encontrar este tipo de aparatos con un cable para conectarlos a una toma de corriente eléctrica común, sino que funcionan independientes gracias a su batería recargable. La propuesta de utilizar baterías es bastante ventajosa en términos de ruido debido a que de esta manera se cuenta con una tierra flotante completamente independiente de circuitos externos al electro-estimulador, confiando en que cualquier señal externa añadida que se pudiera llegar a detectar no será eléctrico; sin embargo, una desventaja importante del modelo basado en baterías es que incrementa el costo final del equipo debido a que este tipo de baterías son difíciles de adquirir y aumentan el tamaño y el peso del aparato considerablemente, al mismo tiempo que añade la necesidad de recargar las baterías con cierta regularidad.³

Por otra parte, los electro-estimuladores comerciales también pueden ser utilizados con tejido *in vivo*. El principio de funcionamiento de este tipo de propuesta se basa en el hecho de colocar los electrodos (salida del electro-estimulador) en determinada extremidad del sujeto de pruebas sin perder de vista que, para que el experimento funcione, es necesario conocer de antemano el área cerebral en donde ocurrirá una respuesta en caso de que dicha extremidad sea estimulada.

Cuando se realiza el diseño de un electro-estimulador es importante decidir qué variable eléctrica, ya sea V o I , será la que se utilice para realizar la estimulación. Al elemento clave en esta decisión se le conoce con el nombre de fuente eléctrica, y esta es la encargada de proporcionar ya sea una señal de voltaje o una señal de corriente al circuito de salida del electro-estimulador. Debido a ello podemos recordar que existen las fuentes independientes y las fuentes dependientes, es decir, aquellas cuya salida no está controlada por otra variable eléctrica y aquellas cuya salida está controlada por otra variable eléctrica, respectivamente. A continuación se hablará acerca de ambos tipos de estimulación y las implicaciones que existen en ambos casos.

2.3.1. Electroodos

Los electrodos son dispositivos importantes debido a que son los encargados de llevar los pulsos eléctricos de estimulación desde la salida del electro-estimulador hacia el sujeto bajo pruebas. Consisten en un par de cables terminados por un lado con algún tipo de conector banana o BNC (*Bayonett Neill-Concelman*) y por el otro por un par de puntas o parches.

A los electrodos que terminan en puntas se les conoce como electrodos sub-dérmicos debido a que dichas puntas se insertan en la piel del individuo, consiguiendo con ello que la electro-estimulación ocurra por debajo de esta. En la FIGURA 2.4 se aprecia un modelo de electrodos de punta.⁵

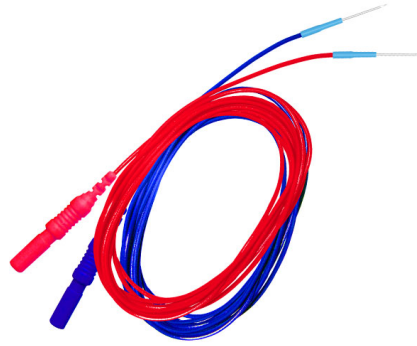


Figura 2.4. Electrodo sub-dérmicos.

Por otro lado, los electrodos que terminan en parches son utilizados cuando se trabaja con un individuo cuya piel es sensible o simplemente cuando no se busca electro-estimular directamente la parte inferior de la piel. Consisten en una parte eléctrica que es la encargada de servir como conductor del estímulo desde el electro-estimulador hasta el parche, y en una parte mecánica que realiza la conexión entre la punta del electrodo y el parche en cuestión. En la FIGURA 2.5 se puede apreciar un ejemplo de este tipo de electrodos.



Figura 2.5. Electrodo de parche.⁵

2.4. Adquisición de imágenes

La adquisición de imágenes necesita basarse en una o varias técnicas que permitan convertir la luz en algún tipo de señal que pueda representar la magnitud de esta en determinado ambiente. En la gran mayoría de los casos los fotones captados son transducidos en señales de voltaje de forma directa o indirecta mediante diferentes mecanismos electrónicos. Por otro lado, no hay que perder de vista que para cualquiera de las tecnologías utilizadas para el fin de adquisición de imágenes, todos los sensores existentes constan de cuadrículas de pequeños elementos electrónicos denominados píxeles.

A continuación se abordará de manera muy general el funcionamiento de dos de las tecnologías base que se emplean para adquirir imágenes, siendo una de ellas la que se utilizó en este trabajo para llegar al objetivo final.

2.4.1. Adquisición basada en CMOS (*Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*)

En este tipo de sensores cada uno de los pixeles existentes están formados por celdas individuales tipo CMOS, en donde la conversión carga a voltaje se realiza en el pixel; sin embargo, esta conversión no es directa: primero ocurre la conversión fotón-electrón en la celda central del pixel, mientras que la conversión electrón-voltaje ocurre gracias a un transistor CMOS que se encuentra junto a la placa encargada de captar la luz.⁴ En un proceso posterior se requiere de la utilización de un convertidor analógico digital para que las señales indirectas de la luz puedan ser interpretadas. En la FIGURA 2.6 se muestra un diagrama representativo de este tipo de arreglo.

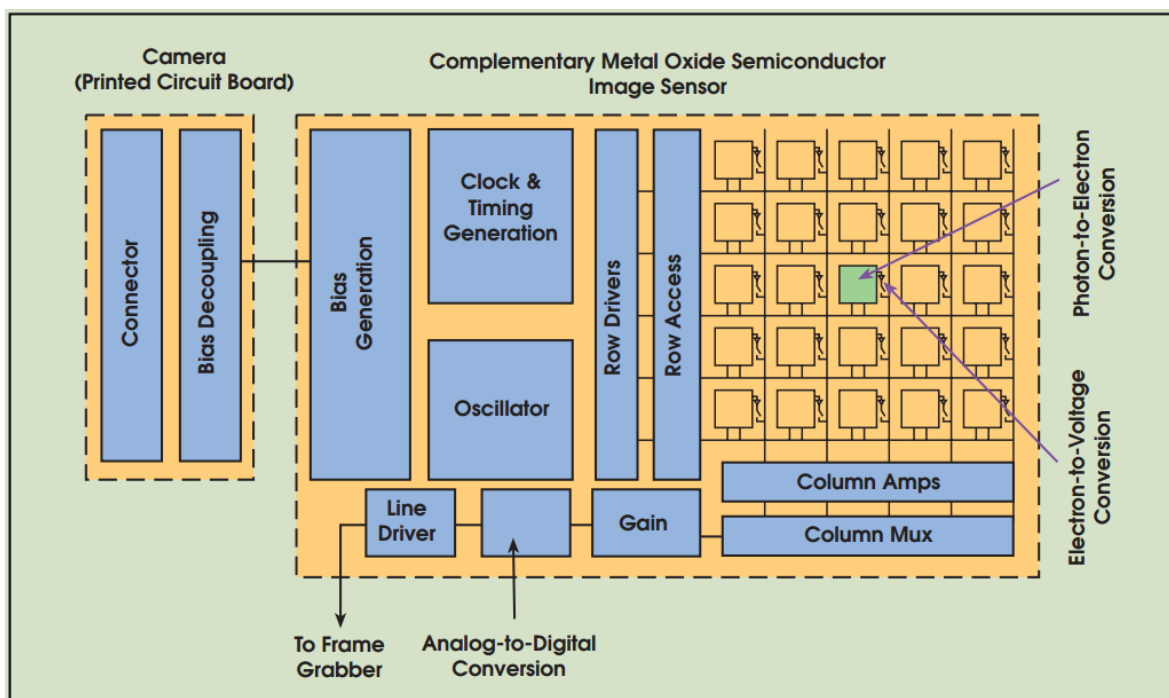


Figura 2.6. Chip CMOS.⁴

2.4.2. Adquisición basada en CCD (*Charged-Coupled Device*)

Los sensores de este tipo de tecnología están conformados por CCDs colocados en columnas o filas logrando con ello que estos sean individualmente pixeles. Estos dispositivos electrónicos, al ser colocados uno contra otro en dicha configuración, pueden transferir cargas entre sí. En los bordes de las columnas también hay CCDs; estos últimos se encargan de transferir las cargas captadas por los CCDs centrales de la cuadrícula de pixeles hacia un convertidor analógico digital, que permite interpretar más tarde las señales capturadas. En este tipo de tecnología la conversión fotón-electrón ocurre en el pixel mientras que la conversión electrón-voltaje ocurre en el último CCD de cada una de las columnas que conforman la cuadrícula.⁴ En la FIGURA 2.7 se puede apreciar un chip de este tipo:

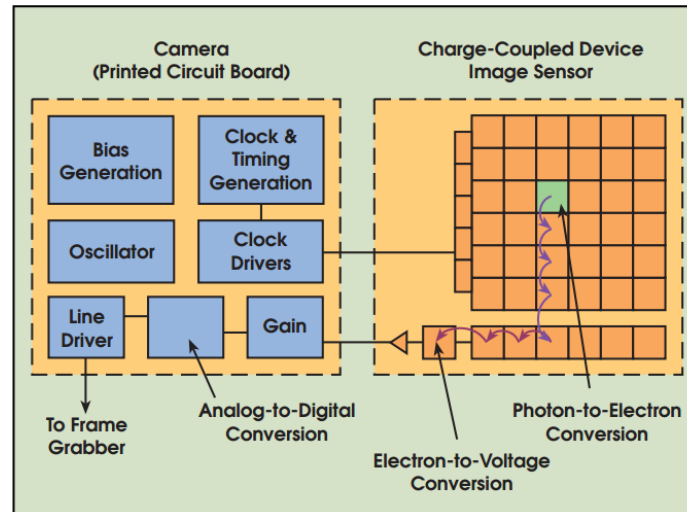


Figura 2.7. Chip CCD.⁴

2.5. Sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes

El sistema final propuesto debe ser capaz de proporcionar, con la suficiente flexibilidad, parámetros eléctricos de estimulación, a saber: frecuencia, amplitud y ancho del pulso de estimulación, al mismo tiempo que debe permitir la configuración de los parámetros de adquisición de imágenes.

La comunicación entre el electro-estimulador desarrollado y la cámara se realiza desde una computadora funcionando con un software escrito para tal fin. Dicho software, al mismo tiempo que proporciona la interfaz gráfica para poder manipular todo el sistema, también es el encargado de la importante sincronización de todos los componentes involucrados en el experimento. Esto se menciona porque una de las tareas más importantes que este programa debe realizar es la capacidad de sincronizar el momento previo a la estimulación, así como los momentos que suceden durante y después de la estimulación, al mismo tiempo que asegura que el número de imágenes que se obtienen durante ello siempre sea constante.

Los electrodos utilizados para la experimentación realizada durante la realización de este trabajo fueron el modelo 27GA de 1.2[mm] de largo hechos de silicón, no estériles,⁴ de la marca *Rochester Electro-Medical*. Estos fueron insertados de forma sub-dermal a ~2[mm] de las denominadas “almohadillas” de las patas del ratón, consiguiendo con ello asegurar que la electro-estimulación ocurriera, ya que esta parte de las patas del animal está repleta de terminales nerviosas.

A lo largo de la realización de este sistema se trabajó con ratones de la cepa C57BL/6, la cual ya ha sido estudiada durante décadas y que, por dicha razón, se conocen gran cantidad de sus mecanismos cerebrales y anatómicos.

Para efectos del experimento con el electro-estimulador, se denomina “protocolo” al conjunto de características eléctricas y temporales a las cuales es expuesto el sujeto de pruebas. Es importante saber que un protocolo se puede repetir n cantidad de veces y que pueden existir tiempos de descanso para el sujeto de pruebas entre cada repetición del protocolo dentro de los cuales no existe estimulación eléctrica ni adquisición de imágenes. Debido a que el protocolo de estimulación

se repite como mínimo 30 veces, como resultado se tiene un conjunto de imágenes. Este conjunto total de imágenes resultantes es posteriormente procesado por diferentes algoritmos de tratamiento de imágenes.

El resultado final de todo el proceso es un video hecho a partir de todas las imágenes capturadas durante el experimento. Dicho video es creado a partir del conjunto de imágenes obtenido después de todas las repeticiones del protocolo y proporciona información acerca del área cerebral que fue estimulada de manera indirecta al aplicar corriente eléctrica a una cierta frecuencia y duración. Evidentemente, la duración del video resultante es dependiente del tiempo que dure el protocolo de estimulación multiplicado por el número de veces que dicho protocolo fue repetido.

Cuando existe estimulación en cualquier extremidad del sujeto de pruebas se presenta un reflejo en el tejido cerebral. Este reflejo es detectable debido a que una vez realizada la estimulación se presenta irrigación sanguínea en el área cerebral para la cual está *mapeada* dicha extremidad.

Sabemos que a mayor cantidad de sangre hay menor reflectancia (dado que al haber estimulación la sangre tiene muchos componentes de oxi-hemoglobina) y viceversa. Es por ello que, dado que el experimento se basa en la reflectancia de la luz incidiendo en el tejido cerebral expuesto a través del cráneo del ratón, si existe un estímulo, la cámara captará menor cantidad de luz en las diferentes regiones cerebrales para las cuales la extremidad estimulada corresponde. El resultado final de ello es que se apreciará en las imágenes obtenidas que comienza a crecer un área oscura en el momento en que ocurre la estimulación y en momentos posteriores a esta.

Un aspecto importante a mencionar respecto a la adquisición de las imágenes es que la cámara, una vez que se encuentra enfocando directamente la corteza cerebral del animal, debe ser desenfocada colocándola $\sim 250[\mu m]$ hacia el cráneo.² Esto es debido a que, al momento de realizar el análisis de las imágenes, no se logra apreciar ninguna respuesta como la descrita porque los vasos sanguíneos (venas y arterias) proporcionan demasiado ruido biológico a la imagen final; en otras palabras, al desenfocar la cámara se logra evitar que la imagen resultante muestre los vasos sanguíneos y con ello se consigue que únicamente se aprecie el área en donde ocurre el reflejo, es decir, la corteza cerebral.^{1,2}

A lo largo de este capítulo fue fundamental explicar con mayor detalle los bloques tecnológicos que era necesario conocer para poder desarrollar todo el sistema de electro-estimulación. Aunado a ello también fue necesario explicar el mecanismo mediante el cual el sistema óptico logra adquirir los resultados de electro-estimulación así como algunos de los componentes de la sangre que permiten realizar el monitoreo de la variable buscada: la reflexión de la luz. En el siguiente capítulo se explicarán los bloques que constituyen el sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes, así como el control de la cámara y de todo el sistema. Además se mostrarán las pruebas de calibración realizadas para poder asegurar que el sistema opera correctamente.

Referencias del Capítulo 2

- [1] N. Clarkson Andrew, et.al (2013). *Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model*.
- [2] C. Harrison Thomas, et.al (2009). *Simple and cost-effective hardware and software for functional brain mapping using intrinsic optical signal imaging*. Elsevier, *Journal of Neuroscience Methods*, p.9, Canadá.
- [3] Millar J., Barnett T.G., Trout S.J. (1994). *The neurodyne: A simple mains-powered constant-current stimulus isolator*.
- [4] Litwiller Dave (2001). *CCD vs. CMOS: Facts and Fiction*.
- [5] <http://www.rochestersuperstore.com/s0012615.html>

CAPÍTULO 3

DISEÑO E INTEGRACIÓN DEL SISTEMA

En este capítulo se profundizará en los bloques tecnológicos que componen al sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes.

Se comenzará explicando la unidad de control para posteriormente explicar los bloques que componen a todo el sistema, desde la generación de las señales de electro-estimulación hasta el subsistema de adquisición de las imágenes, el banco de pruebas y la interfaz de usuario desde la que se realiza todo el control.

3.1. Unidad de control

El sistema que se construyó para el presente trabajo está compuesto por varios bloques funcionales que se comunican entre sí. Dichos bloques llevan a cabo tareas muy particulares que, al ser realizadas con la debida sincronización, permiten obtener señales de electro-estimulación y conjuntos de imágenes organizadas.

La unidad de control es el corazón del electro-estimulador y está compuesta por el par de componentes microcontrolador—interfaz de usuario. Este par de importantes componentes son los encargados de comunicarse entre sí para que el resto de los bloques presentes en todo el sistema puedan funcionar.

Como se puede apreciar en la FIGURA 3.1, el sistema de electro-estimulación consta de varias capas, tanto de *software* como de *hardware* que permiten realizar cada una de las etapas de acondicionamiento de la señal de estimulación, así como la correcta sincronización de la toma de imágenes y el ordenamiento de estas desde el momento en que el experimento se ejecuta en una computadora central.

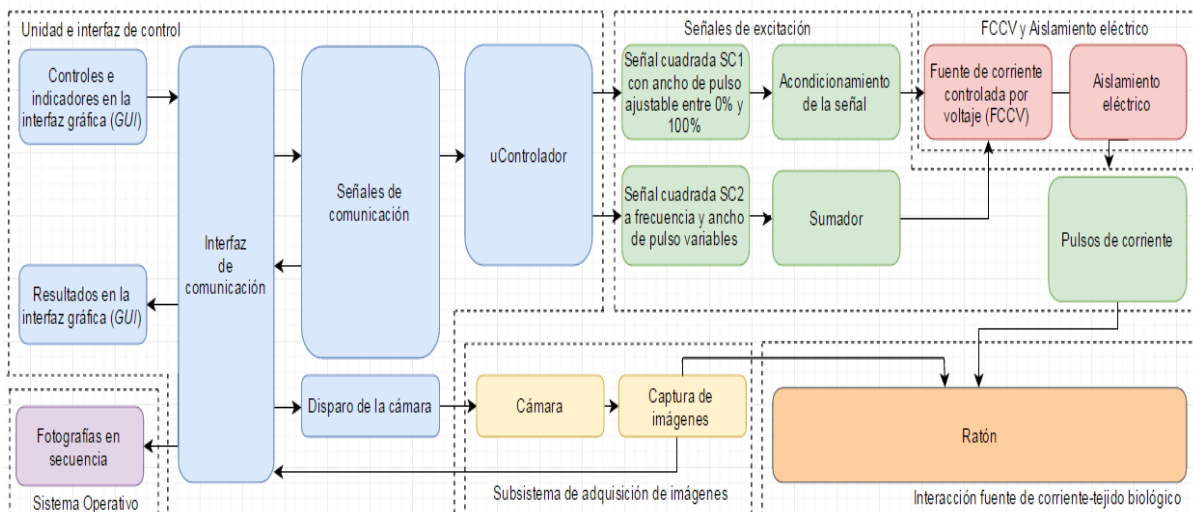


Figura 3.1. Diagrama de bloques del sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes.

El programa que gobierna a todo el sistema presenta una interfaz de gráfica que permite controlarlo por medio de ciertos controles e indicadores. En estos controles se colocan los parámetros de la señal de estimulación que, al ser interpretados por el microcontrolador, el subsistema de electro-estimulación se encarga de generarla. Como se puede apreciar, dicho subsistema está constituido por la fuente de corriente controlada por voltaje (FCCV) y la etapa de aislamiento eléctrico.

El programa se comunica, por medio de una interfaz de *hardware* y *software*, con un microcontrolador colocado en el electro-estimulador y con la cámara que capturará las imágenes del cerebro del ratón. Finalmente, los resultados de todo el proceso son conjuntos de imágenes que son ordenadas y almacenadas. El proceso de almacenamiento se lleva a cabo por el sistema operativo de la computadora central. Además del diagrama de bloques en donde se aprecian todos los módulos que componen al equipo, en la FIGURA 3.2 se muestra un diagrama de flujo del proceso.

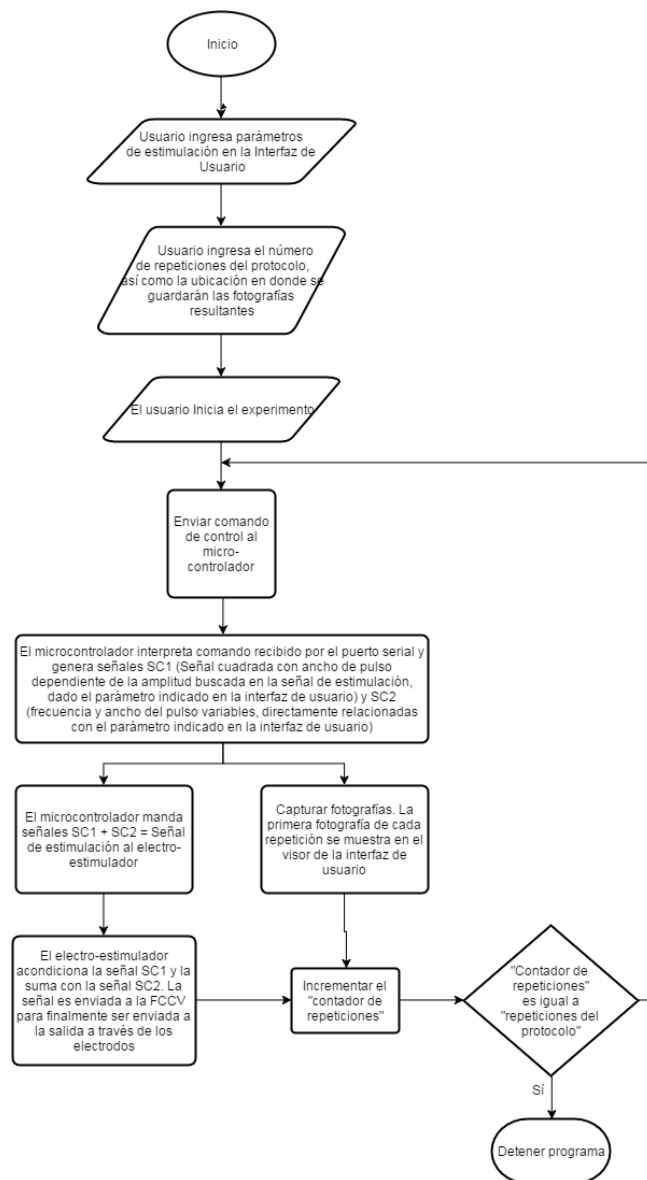


Figura 3.2. Diagrama de flujo del proceso de electro-estimulación y adquisición de imágenes.

El diseño del electro-estimulador se centra en un micro-controlador de 8 bits Atmega™ 328P de la marca Atmel™ que se encarga de interpretar todas las instrucciones provenientes del programa que se ejecuta en la computadora central. La arquitectura de este microcontrolador es Harvard modificada propietaria de Atmel™ tipo RISC (*Reduced Instruction Set Computer*) y funciona a 20[MHz]. Sus *highlights* son 32 kilobytes de memoria de programa flash, 512 kilobytes de memoria de datos y hasta 2 kilobytes de memoria estática interna. En cuanto a sus periféricos se refiere, cuenta con tres contadores o *timers*, dos de 8 bits y uno de 16 bits, así como seis líneas PWM (*Pulse Width Modulation*), un módulo programable USART (*Universal Synchronous/Asynchronous Receiver/Transmitter*) y dos módulos ADC (*Analog to Digital Converter*), uno de 8 canales a 10 bits y otro de 6 canales a 10 bits.¹

Se eligió este microcontrolador por varias razones:

1. Su tipo de arquitectura permite al usuario tener suficiente flexibilidad al programarlo, así como su velocidad de procesamiento es suficiente para esta aplicación.
2. No es necesario demasiado poder de cómputo desde el punto de vista del electro-estimulador, ya que su microcontrolador únicamente se utiliza para asegurar la sincronización de todo el programa y de mandar y recibir la información relacionada con la señal de estimulación.
3. No se pensó que el procesamiento de los resultados del experimento, es decir, las imágenes, se realizara desde este dispositivo debido al costo computacional que este procedimiento implica. Éste se realiza desde la computadora central, la cual también es la encargada de recibir dichos resultados.

El microcontrolador interpreta y genera señales con los parámetros definidos por el usuario desde la computadora central. Estos parámetros representan la amplitud, la frecuencia y el ancho del pulso de la señal de electro-estimulación. Los pulsos generados por el microcontrolador son enviados a una etapa de conversión de voltaje a corriente a través de una interfaz que cuenta con aislamiento óptico. Para esta etapa se emplean opto-acopladores con el objetivo de proporcionar una capa de seguridad buscando con ello que las diferentes etapas eléctricas/electrónicas se encuentren separadas lo más posible, evitando así que, en caso de que alguna de estas falle, el resto del circuito se dañe o que el ratón sufra daño.

En la FIGURA 3.3 se aprecia el sistema mínimo del microcontrolador, así como las etapas de comunicación que este tiene con la computadora central y con el programa residente en ella.

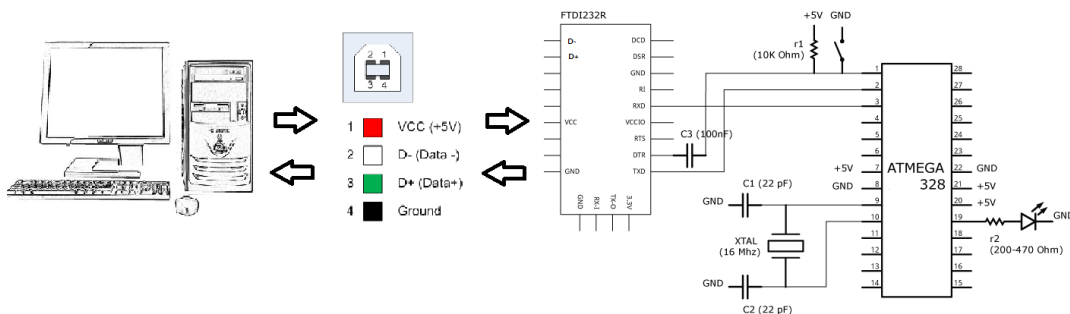


Figura 3.3. Diagrama del sistema mínimo y comunicación.

3.2. Subsistema de electro-estimulación

El electro-estimulador consta de diversas etapas que deben ser sincronizadas. A nivel conceptual es necesario explicar cuáles son las etapas que conforman a todo el sistema de electro-estimulación, es decir, a todos los subprocesos o sub-módulos involucrados en la construcción de la señal de electro-estimulación que será aplicada a una cierta carga.

3.2.1. Señales de excitación

La excitación del tejido se realiza por medio de pulsos de corriente con una amplitud que puede ser sintonizada entre 0 y 580[μ A]. En cuanto a la frecuencia, esta puede ser variada entre 0 y 500[Hz], así mismo es posible configurar el tiempo de duración en nivel alto de los pulsos, entre 0 y 100%. Para lograr lo anterior el microcontrolador fue programado para que, una vez recibidos en su puerto Rx los parámetros de la señal de estimulación, genere dos señales, a saber:

1. Señal cuadrada 1, también llamada SC1: es una señal cuadrada *TTL* (*Transistor-Transistor Logic*) que tiene un voltaje y frecuencia constante generada por el *timer* 0 de 8 bits del microcontrolador. El único parámetro variable de esta señal es el ciclo de trabajo entre 0 y 100% y es mediante el cual se toma indirectamente el voltaje de la señal de estimulación final al hacerla pasar por un filtro paso bajas de segundo orden a una frecuencia de corte de ≈ 6 [Hz] (tan cerca de 0[Hz] como sea posible).

La ecuación 3.1 permite calcular la frecuencia de corte del filtro paso bajas de segundo orden construido:

$$f_c = \frac{1}{2\pi R_{F1} C_1} + \frac{1}{2\pi R_{F2} C_2} \quad (3.1)$$

Es importante notar que este voltaje V_{pulso} no es el empleado en la señal final de estimulación sino que representa la amplitud escalada de dicha señal.

2. Señal cuadrada 2, también llamada SC2: es una señal cuadrada *TTL* cuyo voltaje es constante pero su frecuencia y ciclo de trabajo son variables. Es generada por el *timer* 1 de 8 bits del microcontrolador. Estos dos parámetros variables son los mismos que tendrá la señal de estimulación final.

En cuanto a la señal de estimulación se refiere, sabemos que el ciclo de trabajo (ancho del pulso) de esta señal puede ser variado entre 0 y 100%, por lo tanto resulta importante conocer cuál es el voltaje promedio de esta señal, dado que es un tren de pulsos cuyo ancho depende del ciclo de trabajo seleccionado. Para calcular el voltaje promedio se recurre a la ecuación 3.2 en donde V_p representa el voltaje promedio de la señal de estimulación, T es el período de dicha señal y $V_p(t)$ es la señal en cuestión:

$$V_p = \frac{1}{T} \int_0^T V_p(t) dt \quad (3.2)$$

En la FIGURA 3.4 se puede observar el mecanismo descrito para construir la señal de excitación:

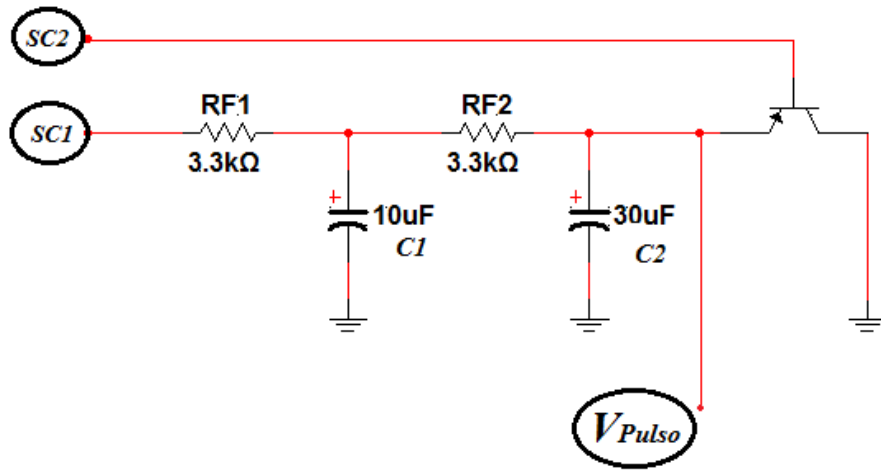


Figura 3.4. Diagrama del filtro paso bajas y construcción de señales SC1, SC2 y V_{pulso} .

Como se puede observar, la señal de V_{pulso} se construye a partir del voltaje proporcionado a la salida del filtro paso bajas de segundo orden así como de la frecuencia y el ciclo de trabajo de la señal SC2.

3.2.2. Fuente de corriente controlada por voltaje

Una fuente de este tipo es un dispositivo capaz de convertir un voltaje V a una corriente proporcional a dicho voltaje. En la FIGURA 3.5 se aprecia el diagrama general de este tipo de fuente dependiente.

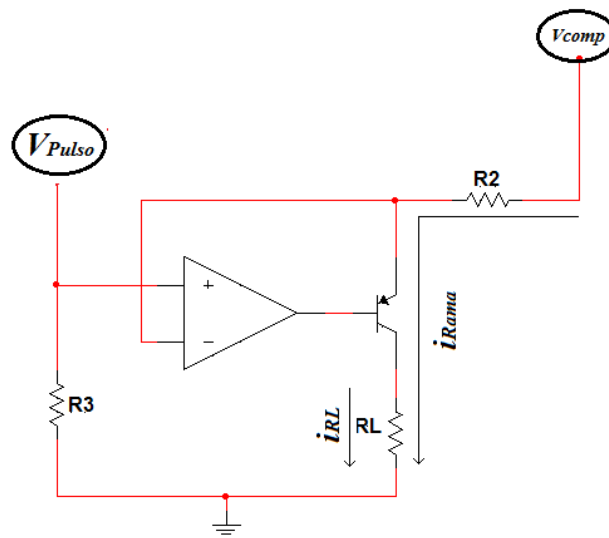


Figura 3.5. Diagrama general de una Fuente de Corriente Controlada por Voltaje (FCCV).

De acuerdo a la ley de Ohm se puede observar que:

$$V_{R_L} = R_L i_{R_L} = R_L i_{Rama} \quad (3.3)$$

Y además que:

$$i_{R_L} = \frac{V_{pulsos}}{R_2} \quad (3.4)$$

Para diseñar la fuente de corriente controlada por voltaje es necesario saber cuál será la carga (R_L) máxima conectada a ella. Según la Ley de Ohm, si se conoce la carga (en Ω) que se podría tolerar conectar a la fuente, es necesario definir un voltaje máximo que pueda variar. A dicho voltaje se le llama voltaje de complianza, el cual corresponde al voltaje que cumple con el compromiso de que la corriente a la salida de la fuente no variará a medida que cambien las cargas conectadas a ella. Sin embargo, existe un límite superior para la fuente de corriente, es decir: no se pueden conectar cargas más grandes para las que el voltaje de complianza permita, de otro modo, es imposible asegurar que la corriente será constante a la salida de la fuente después de sobrepasar la carga máxima permitida.

3.2.3. Obtención del menor tiempo de respuesta posible

El tiempo de respuesta se refiere a aquel requerido para que los pulsos de corriente puedan ser considerados como tales a la salida del electro-estimulador. Considerando que una de las características de éste es que el tiempo de respuesta debe ser lo suficientemente pequeño, se realizó la prueba empleando FETs (*Field Effect Transistor*) y BJT's (*Bipolar Junction Transistor*), a fin de verificar cuál de ellos presenta una respuesta transitoria adecuada para el diseño.

En la FIGURA 3.6 se muestra el oscilograma para un transistor FET modelo IRF630 para una frecuencia de 100[Hz]. El tiempo de respuesta obtenido para esta prueba fue de 5.08[us].

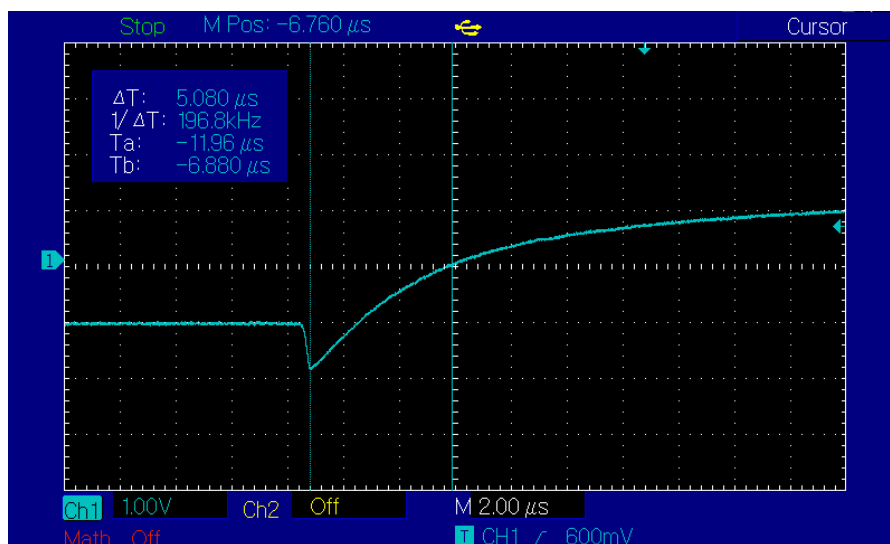


Figura 3.6. Tiempo de respuesta del FET IRF630 a 100[Hz].

En la figura anterior se observa que el FET IRF630 tiene un tiempo de respuesta de 5.08[us] pero además se aprecia que ocurre un transitorio debido a la conmutación lo cual indica que este tipo de transistor, al menos para esta prueba, resulta poco eficiente y lento.

En la FIGURA 3.7 se muestra el oscilograma para un transistor BJT modelo 2N6515 funcionando a una frecuencia de 100[Hz]. El tiempo de respuesta obtenido para esta prueba fue de 2.4[us].

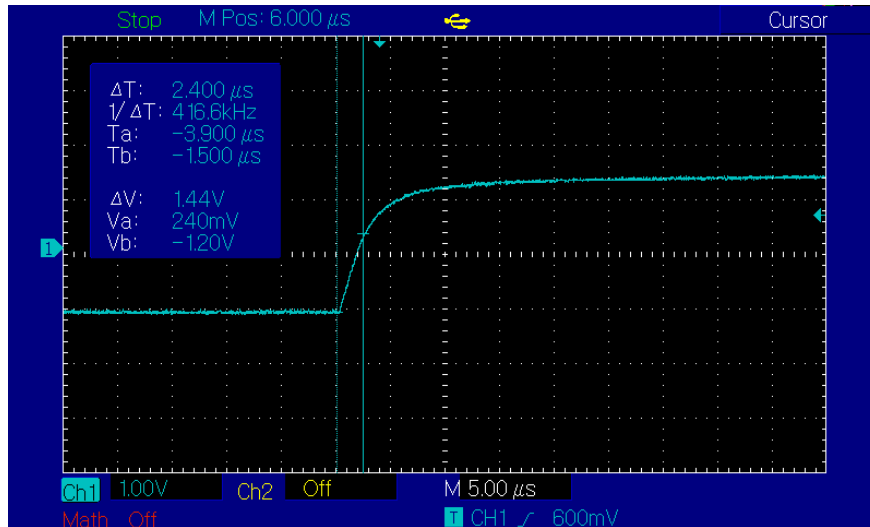


Figura 3.7. Tiempo de respuesta del BJT 2N6515 a 100[Hz].

En resumen, para el diseño, los menores tiempos de respuesta se obtienen al emplear el BJT 2N6515 sin importar la frecuencia de estimulación a la que se haya configurado el electro-estimulador.

3.2.4. Voltaje de complianza y aislamiento eléctrico

De acuerdo con el principio de electro-estimulación, es necesario proporcionar aislamiento eléctrico entre el instrumento y el sujeto de pruebas, lo cual quiere decir que en ningún momento este proporcionará señales indeseadas o alteradas con respecto a las que se supone debería proporcionar. Comúnmente, el diseño de electro-estimuladores contempla este aislamiento eléctrico alimentando al circuito mediante baterías; sin embargo, estas pueden ser un problema debido a que es complicado obtenerlas, suelen pesar demasiado y hay pocos modelos existentes en el mercado.⁵

Eléctricamente, el aislamiento eléctrico se fundamenta en que parte de la corriente de estimulación podría fluir por la conexión a tierra física, provocando con ello que las señales de monitoreo proporcionen inconsistencias y/o información incorrecta.³ Además de ello, no todos los electro-estimuladores pueden ser utilizados para diferentes aplicaciones debido al nivel de aislamiento que pueda proporcionar.

Dado que el electro-estimulador será utilizado para experimentos *in vivo* es importante recordar que el aparato trabaja con un voltaje de complianza relativamente grande de 180[V], y por ende, es importante que este también proporcione aislamiento eléctrico entre el sujeto de pruebas y su etapa de potencia. Para tal fin, se colocó un transformador de relación 1:1 entre la línea de

127[V] a 60[Hz] y el electro-estimulador. Dicho transformador se conectó a un rectificador de onda completa y a un filtro para obtener una señal de voltaje directo que determina el voltaje de complianza. Dicha configuración se puede apreciar en la FIGURA 3.8.

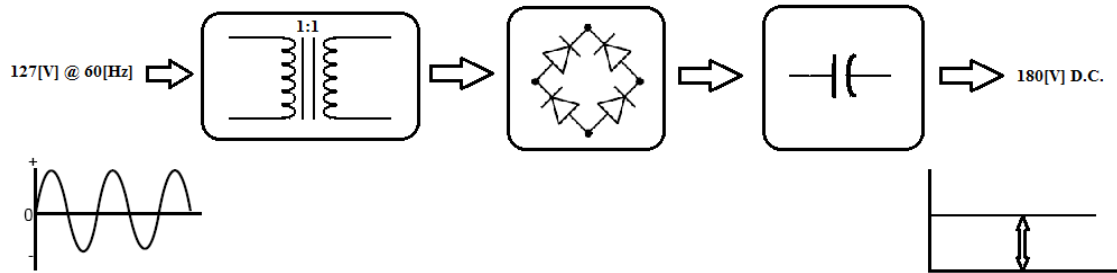


Figura 3.8. Construcción del voltaje de complianza.

3.2.5. Interacción fuente de corriente-tejido biológico

De acuerdo con el diseño y las ecuaciones vistas anteriormente, siempre y cuando la resistencia del tejido conectado entre los electrodos no exceda los 300 [k Ω], la fuente de corriente del electro-estimulador proporcionará una amplitud constante de corriente en el intervalo de 0 a 580[uA].

Desde el punto de vista de la fuente de corriente la carga conectada a ella variará su magnitud debido a diversas circunstancias experimentales relacionadas con los electrodos, tales como:

1. La distancia al ser colocados en el tejido.
2. La longitud tanto de las puntas como del cable.
3. El calibre del cable.
4. La profundidad con que se coloquen en el tejido.
5. El material del que estén hechos.

Además de los puntos mencionados, algo importante a considerar es que a medida que cambian algunas variables como la distancia entre los electrodos y la profundidad a la que estos son colocados en el tejido, el efecto que se consigue es que la estimulación cambie biológicamente debido a que el campo eléctrico tendrá una distribución diferente, con lo cual el resultado final también se verá afectado. Es por ello que la metodología con la que se colocan los electrodos debe ser bastante controlada para evitar tener resultados poco consistentes.

3.2.6. Calibración del electro-estimulador

Para verificar experimentalmente el funcionamiento del electro-estimulador fue necesario realizar la validación y calibración de éste. Dicha calibración debió cubrir dos aspectos:

1. Conociendo la resistencia de carga conectada entre los electrodos es posible conocer la corriente que fluye a través de estos y se buscó que dicha corriente fuera constante sin importar qué carga se conectase.
2. Obtener el menor tiempo de retardo en la generación de los pulsos mediante el uso de diferentes tipos de transistores.

3.2.6.1. Voltaje en la carga vs ciclo de trabajo

Como primera prueba se modificó el ciclo de trabajo de la señal cuadrada SC1 entre el 0 y el 100% y se midió el voltaje en la carga R_L siguiendo la relación entre la carga conectada y la corriente suministrada de acuerdo al voltaje promedio de la señal PWM y el voltaje del pulso V_{pulso} :

$$\frac{V_{comp}}{i_{R_{LMAX}}} = R_{LMAX} \quad (3.5)$$

De esta manera, si $i_L = 600[\mu A]$ y sabiendo que $V_{comp} = 30[V]$ entonces usando 3.5 sabemos que la máxima carga que se puede conectar al electro-estimulador manteniendo dicha corriente asegurada es $R_{LMAX} \approx 50[k\Omega]$.

En resumen, si el voltaje de complianza (V_{comp}) aumenta, evidentemente la carga que se pueda conectar entre los electrodos puede ser mayor manteniendo el compromiso de la corriente constante en ella.

3.2.6.2. Corriente constante en la carga

La verificación del funcionamiento del sistema se realizó empleando resistencias de diferente magnitud cada vez para asegurar que, cuando la magnitud de la carga R_L conectada no excediera la calculada, la corriente se mantuviera constante. Las siguientes pruebas demuestran tres casos:

1. Cuando R_L es menor para todo el rango del ciclo de trabajo de la señal SC1.
2. Cuando R_L es menor para la mayoría de los valores del ciclo de trabajo de la señal SC1, y
3. Cuando R_L es mayor casi en todos los valores del ciclo de trabajo de la señal SC1.

Prueba 1: Se tiene una resistencia de carga de $1000 \pm 50[\Omega]$ en donde al variar el ciclo de trabajo de la señal SC1 se midió el voltaje V_{R_L} . Se puede apreciar un comportamiento creciente en el voltaje a medida que aumenta el ciclo de trabajo, sin que exista saturación en la respuesta de voltaje obtenida; este fenómeno no ocurre debido a que con la resistencia de carga de esta prueba y el máximo ciclo de trabajo no se llega a exceder el voltaje de complianza (V_{comp}).

En la tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos de forma experimental, así como los cálculos teóricos.

Tabla 3.1. Variación del ciclo de trabajo SC1 empleando $R_L = 1000 \pm 50[\Omega]$.

Ciclo de T. SC1	Teórico	Experimental	Teórico		Experimental	
	$R_L [\Omega]$	$R_L [\Omega]$	$IR_2 = I_L [\mu A]$	$V_{RL} [V]$	$IR_2 = I_L [\mu A]$	$V_{RL} [V]$
0.00%	1000	1000 ± 50	0	0	18.13	0
9.80%			61.73	0.06	54.40	0.06
25.49%			160.51	0.16	132.24	0.13
33.33%			209.90	0.20	173.80	0.17
49.02%			308.68	0.30	261.96	0.24
60.78%			382.77	0.38	333.75	0.32
80.39%			506.24	0.50	463.47	0.44
92.16%			580.33	0.58	549.11	0.52
100.00%			629.72	0.62	627.20	0.6

En la FIGURA 3.9 se muestran gráficamente los resultados teóricos y experimentales del Voltaje en la carga V_{RL} como función del porcentaje del ciclo de trabajo de la señal SC1 para una carga R_L de $1000 \pm 50[\Omega]$.

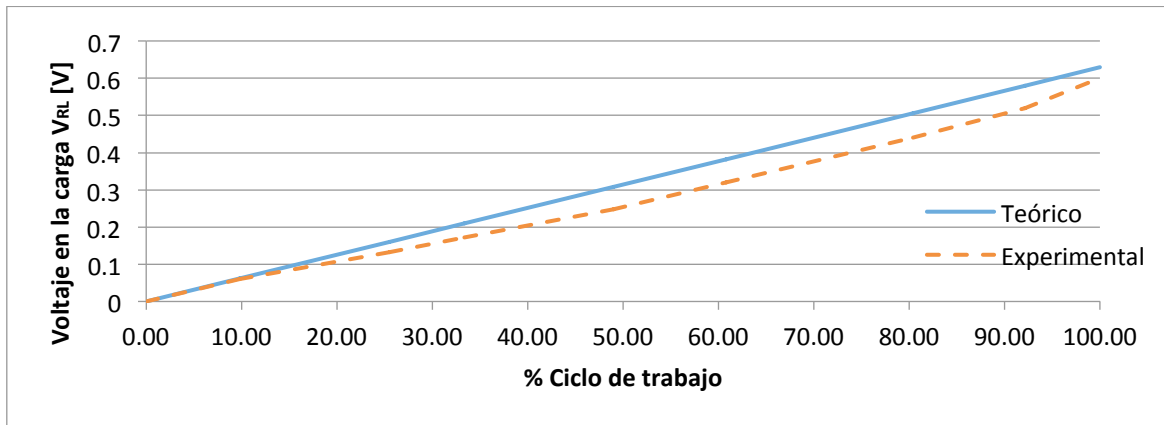


Figura 3.9. Ciclo de Trabajo Señal SC1 vs. Voltaje en la carga.

En la FIGURA 3.9 se observa que hay un comportamiento lineal y que existe un error relativo promedio expresado por:

$$\delta_{V_{RL_{rel}}} = \frac{\sum \left| \frac{\text{ValorExperimental} - \text{ValorTeórico}}{\text{ValorTeórico}} \right|}{\text{CantidadMuestras}} \times 100\% \quad (3.6)$$

Por lo que para esta primera prueba se tiene que $\delta_{V_{RL_{rel}}} = 11.43\%$

Prueba 2: Como segunda prueba se colocó una resistencia de carga de $50,000 \pm 500 [\Omega]$. De igual manera se modificó poco a poco el ciclo de trabajo de la señal SC1 y con ello se modificó el V_{RL} . En la tabla 3.2 se muestran los resultados teóricos y experimentales obtenidos.

Tabla 3.2. Variación del ciclo de trabajo SC1 empleando $R_L = 50,000 \pm 500[\Omega]$.

Ciclo de T. SC1	Teórico		Experimental			
	$R_L [\Omega]$	$R_L [\Omega]$	$IR_2 = I_L [\mu A]$	$V_{RL} [V]$		
0.00%	50,000	50,000 ± 500	0	0	18.13	0.86
9.80%			61.73	3.08	54.40	2.46
25.49%			160.51	8.02	132.24	6.2
33.33%			209.90	10.49	173.80	8
49.02%			308.68	15.43	261.96	11.9
60.78%			382.77	19.13	333.75	15.3
80.39%			506.24	25.31	463.47	21.1
92.16%			580.33	29.01	549.11	24.6
100.00%			629.72	31.48	627.20	24.6

En la FIGURA 3.10 se muestran gráficamente los resultados teóricos y experimentales del Voltaje en la carga V_{RL} como función del porcentaje del ciclo de trabajo de la señal SC1 para una carga R_L de $50,000 \pm 500[\Omega]$.

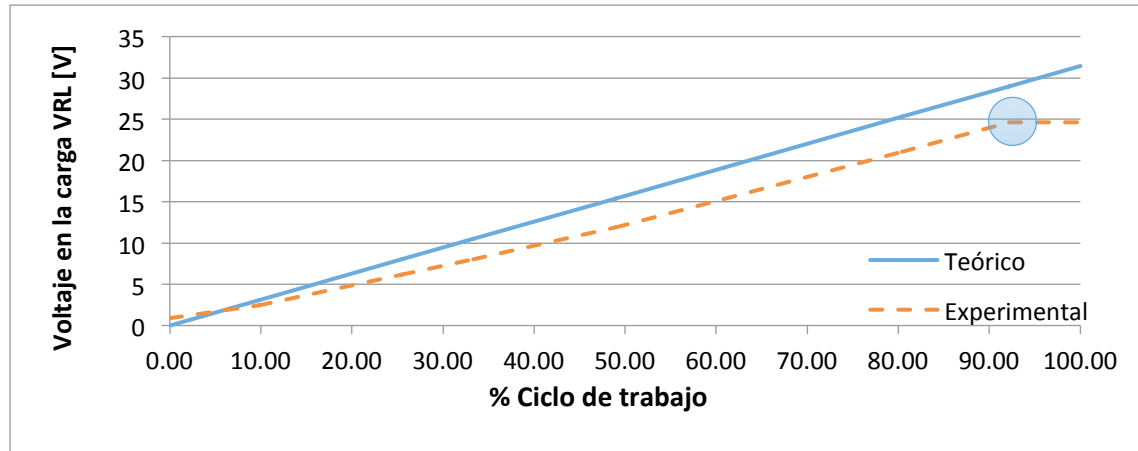


Figura 3.10. Ciclo de Trabajo Señal SC1 vs. Voltaje en la carga.

En la FIGURA 3.10 se observa que, a pesar de existir un comportamiento lineal, la saturación antes mencionada comienza a ocurrir desde el 92.16% debido a que el voltaje de complianza deja de ser suficiente. El promedio del error absoluto es $\delta_{V_{RLrel}} = 18.16\%$

Prueba 3: Se tiene una resistencia de carga mucho mayor a la máxima calculada, que es de 99.8 [kΩ], con lo cual se puede observar casi inmediatamente que al tener un ciclo de trabajo pequeño el voltaje de complianza no es suficiente para conservar las características de diseño buscadas:

Tabla 3.3. Variación del ciclo de trabajo SC1 empleando $R_L = 100,000 \pm 500[\Omega]$.

Ciclo de T. SC1	Teórico	Experimental	Teórico		Experimental	
	$R_L [\Omega]$	$R_L [\Omega]$	$IR_2 = I_L[\mu A]$	$V_{RL}[V]$	$IR_2 = I_L[\mu A]$	$V_{RL}[V]$
0.00%	100,000	100,000 ± 500	0	0	18.13	1.90
9.80%			61.73	6.17	54.40	5.0
25.49%			160.51	16.05	132.24	11.70
33.33%			209.90	20.99	173.80	15.30
49.02%			308.68	30.86	261.96	23.30
60.78%			382.77	38.27	333.75	25.50
80.39%			506.24	50.62	463.47	24.80
92.16%			580.33	58.03	549.11	23.80
100.00%			629.72	62.97	627.20	23.50

En la FIGURA 3.11 se muestran gráficamente los resultados teóricos y experimentales del Voltaje en la carga V_{RL} como función del porcentaje del ciclo de trabajo de la señal SC1 para una carga R_L de $100,000 \pm 500[\Omega]$.

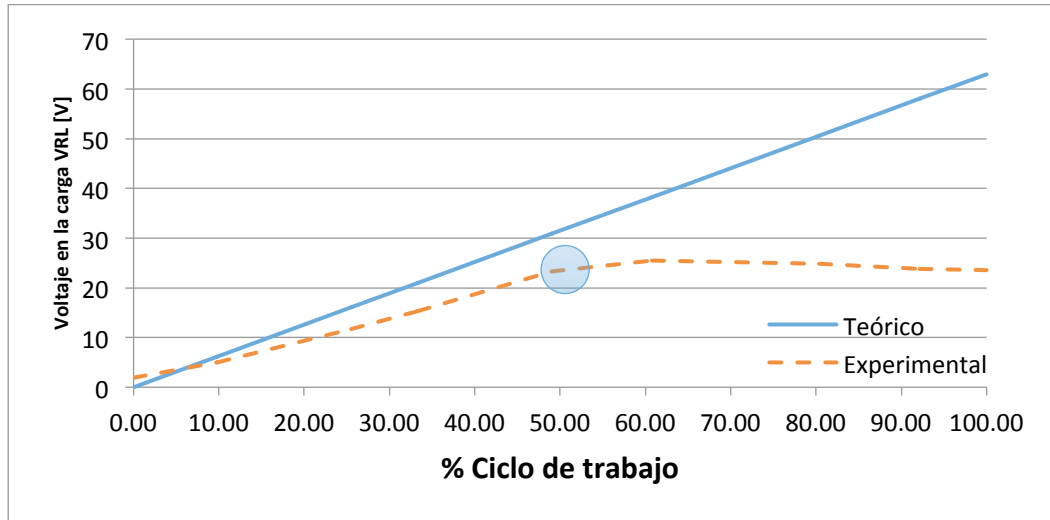


Figura 3.11. Ciclo de Trabajo Señal SC1 vs. Voltaje en la carga.

En la FIGURA 3.11 se observa que el comportamiento lineal se mantiene y que la saturación comienza a ocurrir en el 49.02%. El promedio del error absoluto para este caso es $\delta_{V_{RLrel}} = 33.75\%$.

Como se puede concluir al observar el error en cada prueba, éste incrementa debido a que la carga en cada caso se acerca cada vez más a la máxima permitida por el voltaje de complianza empleado.

3.2.6.3. Carga variable y voltaje en la carga

Una vez verificado el funcionamiento en cuanto a la generación de corriente, a continuación se muestran los resultados obtenidos al medir el voltaje en la carga (V_{RL}) como función de la resistencia de carga para diferentes valores del porcentaje del ciclo de trabajo de la señal SC1. En la tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos para 0%, 49.02% y 100%. Los datos que se aprecian en color verde y rojo son los valores del voltaje V_{RL} para la carga indicada en la primera fila y el ciclo de trabajo indicado en la primera columna. Las celdas de color verde indican que no hubo saturación mientras que las de color rojo indican que sí hubo.

Tabla 3.4. V_{RL} en función del ciclo de trabajo y de la magnitud de la carga R_L .

		RL ± 5%[Ω]										
		1	10	100	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000	50,000	60,000	100,000
% Ciclo trabajo SC1	0	0	0	0	0	0.036	0.088	0.18	0.33	0.86	1.04	1.9
	49.02	0.004	0.011	0.032	0.248	0.504	1.27	2.5	4.92	11.9	14.2	23.3
	100	0.006	0.017	0.074	0.6	1.2	3.02	6.04	11.7	24.6	25	23.5

En la FIGURA 3.12 se muestra el voltaje en la resistencia de carga en función de la resistencia de carga. Cada curva representa el voltaje en la carga dada la resistencia de carga y el ciclo de trabajo indicado.

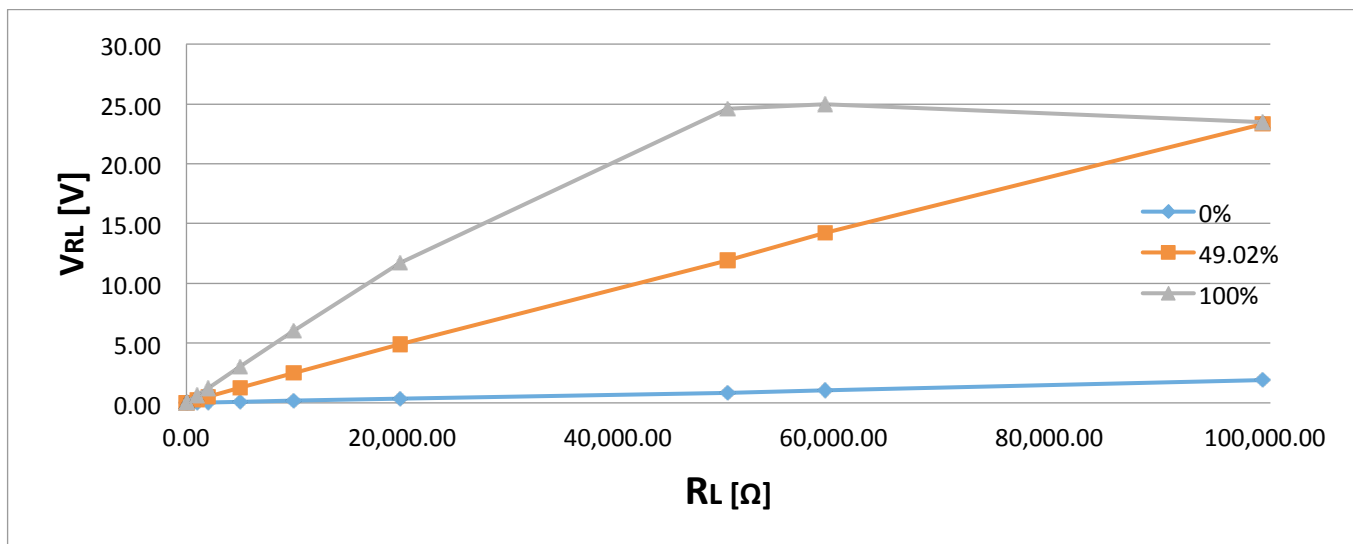


Figura 3.12. Voltaje en la resistencia de carga, en función de la resistencia para diferentes ciclos de trabajo de SC1.

En la FIGURA 3.12 se puede apreciar que ocurre saturación a partir de que V_{RL} comienza a acercarse al voltaje de complianza V_{comp} el cual, en esta ocasión, fue de 30[V].

3.2.6.4. Calibración del electro-estimulador empleando la corriente en la carga como parámetro

Para poder calibrar el electro-estimulador fue necesario emplear los resultados que ya se han presentado en conjunto con la utilización del parámetro buscado a la salida del sistema: la corriente en la carga i_{RL} .

A continuación se muestran los resultados finales obtenidos para calibrar el sistema adecuadamente. Para ello se estimó la corriente de estimulación que se buscaba obtener a la salida (i_o) dados los parámetros de estimulación, es decir, la corriente de estimulación solicitada (i_s). Esta prueba de estimulación se realizó a una frecuencia y ciclo de trabajo de 100 [Hz] y 50%, respectivamente, y los resultados se presentan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Diferencia entre la corriente de estimulación obtenida y solicitada.

i_s [uA]	i_o [uA]	Diferencia [uA]
0	0	0
50	0	50
100	37	63
150	79	71
200	128	72
250	176	74
300	232	68
350	280	70
400	336	64
450	388	62
500	452	48
550	510	40
600	565	35
630	615	15

En la FIGURA 3.13 se presenta la corriente de estimulación obtenida (i_o) en función de la corriente de estimulación solicitada (i_s):

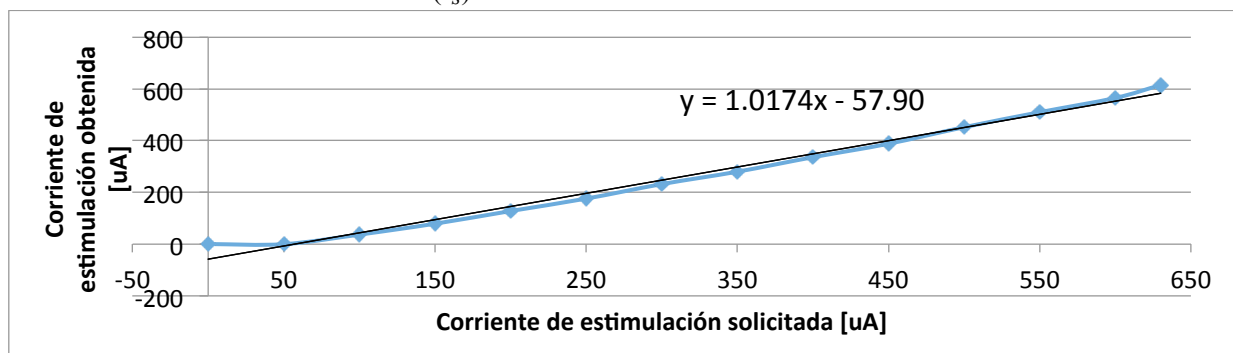


Figura 3.13: Corriente de estimulación solicitada vs corriente de estimulación obtenida.

En la figura anterior se aprecia que el comportamiento del electro-estimulador es lineal pero que es necesario realizar un ajuste para que tanto la corriente obtenida como la solicitada sean iguales en la mayor medida posible. Este fenómeno ocurre básicamente por dos razones:

1. Los componentes electrónicos utilizados tienen una tolerancia en algunos casos del $\pm 10\%$ y en otros del $\pm 5\%$, lo cual provoca que exista un error.
2. La sintonización de la señal de electro-estimulación se realiza mediante el *timer* 0 del microcontrolador, el cual es un medio digital que únicamente puede efectuar 256 pasos. En caso de utilizar un *timer* con mayor resolución, el error disminuiría pero sería imposible eliminarlo completamente.

Por otro lado, como se puede apreciar, la ecuación lineal de ajuste es la que se debe utilizar para calibrar el sistema. Al emplearla, el sistema debe ser capaz de proporcionar la cantidad de corriente que se aproxime lo más posible a la que el usuario solicite. La pendiente de esta ecuación representa el error que existe entre la corriente solicitada y la corriente obtenida, mientras que la ordenada al origen representa que la teoría siempre difiere de la práctica, es decir, hay una diferencia inicial de 57.90 unidades a partir de los cuales el electro-estimulador comienza a proporcionar la corriente solicitada.

3.3. Subsistema de adquisición de imágenes

3.3.1. Cámara Mightex™ CCE-B013-U

Para realizar el proceso de adquisición de imágenes se empleó una cámara Mightex™ CCE-B013-U, mostrada en la FIGURA 3.11, cuyas características técnicas más relevantes se presentan en la tabla 3.6:

Tabla 3.6. Especificaciones técnicas de la cámara Mightex™ CCE-B013-U.³

Modelo	Máxima Resolución	Color/Mono	Tiempo de exposición [ms]	Profundidad de las imágenes [bits]	¿Carcasa?	Trigger In / Strobe out
CCE-B013-U	1392x1040	Mono (escala de grises)	0.05 – 200,000	8/12 (configurable)	Sí	Sí

La cámara empleada tiene un disparador por *hardware* que permite indicar en qué momento se hace la toma de imágenes o, dependiendo de cómo esté configurado a nivel de *software*, indica en qué momento comienza la captura de video. Este disparador es accesible físicamente desde un conector DIN8 colocado en uno de los extremos de la carcasa de la cámara. Es mediante un par de terminales de las 8 proporcionadas por este conector que es posible enviar una señal cuadrada en niveles TTL para proporcionar el disparo; sin embargo, este mecanismo no fue utilizado debido a que no es lo suficientemente flexible para poder asegurar cuántas imágenes se obtendrían como resultado final en cada repetición del protocolo y porque no permite asegurar que el número de imágenes en cada repetición siempre sea el mismo.

A nivel de *software* es importante mencionar que el fabricante de la cámara proporciona dos alternativas para controlarla; la primera de ellas es un programa que permite capturar imágenes y video pero que es muy poco flexible para realizar conexión de la cámara desde diferentes alternativas; la segunda es un SDK (*Software Development Kit*) lo suficientemente potente para utilizar la cámara a nivel de bloques. Esta segunda alternativa fue la que se utilizó para poder hacer funcionar la cámara de la forma deseada.



Figura 3.14. Cámara Mightex™.

3.3.2. Lente de la cámara

Como se puede apreciar en la FIGURA 3.14, la cámara no cuenta con ningún tipo de lente que permita modificar la forma en que se obtienen las imágenes, sino que únicamente se trata del sensor CCD expuesto por una ventanilla. Para analizar ópticamente la respuesta en el tejido estimulado fue necesario colocar un macroscopio que, mediante un arreglo de lentes, permite amplificar y ajustar el foco de la imagen. Dicho macroscopio fue colocado en el extremo de la cámara a través de dos tubos extensores, cada uno de 40mm, como se muestra en la figura 3.15.



Figura 3.15. Cámara Mightex™ con macroscopio.

3.3.3. Sistema de posicionamiento mecánico

Para poder colocar la cámara sobre el área del cerebro perteneciente al sujeto de pruebas fue necesario montarla sobre algún tipo de soporte que mantuviera la posición de la cámara enfocando a un punto de forma precisa. Esto se logró mediante una base sobre la cual se colocó un micro-manipulador de Thor Labs™.⁴ Este dispositivo permite realizar recorridos micrométricos con una resolución de $\sim 2[\mu\text{m}]$ en los ejes X , Y y Z . Su importancia radica en que para lograr el objetivo del experimento es necesario realizar un desenfoque micrométrico de la cámara el cual debe ser del orden de $\sim 250[\mu\text{m}]$ hacia el cráneo.⁶

En la FIGURA 3.16 se aprecia el micro-manipulador mencionado. Nótese que para cada uno de los tres ejes de desplazamiento existe un tornillo para realizar el ajuste.

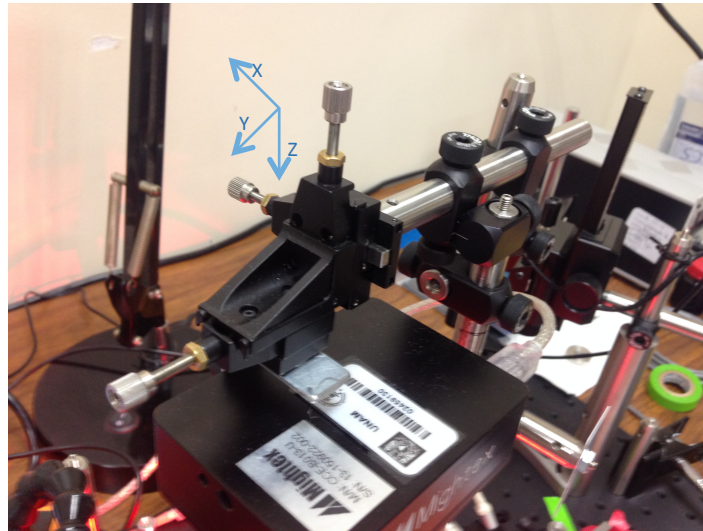


Figura 3.16. Base, micro-manipulador y la cámara sujetos en una sola estructura.

3.3.4. Calibración del sistema de visión

Para calibrar el sistema de adquisición de imágenes temporalmente, la cámara fue enfocada a la cara superior de un LED (*Light Emitting Diode*) con el objetivo de asegurar que cada una de las repeticiones proporcionara la misma cantidad de imágenes y que en cada una de las repeticiones se tuviera la misma información visual.

La FIGURA 3.17 muestra en cada una de sus columnas las repeticiones realizadas, mientras que en sus filas muestra la imagen correspondiente a cada repetición:

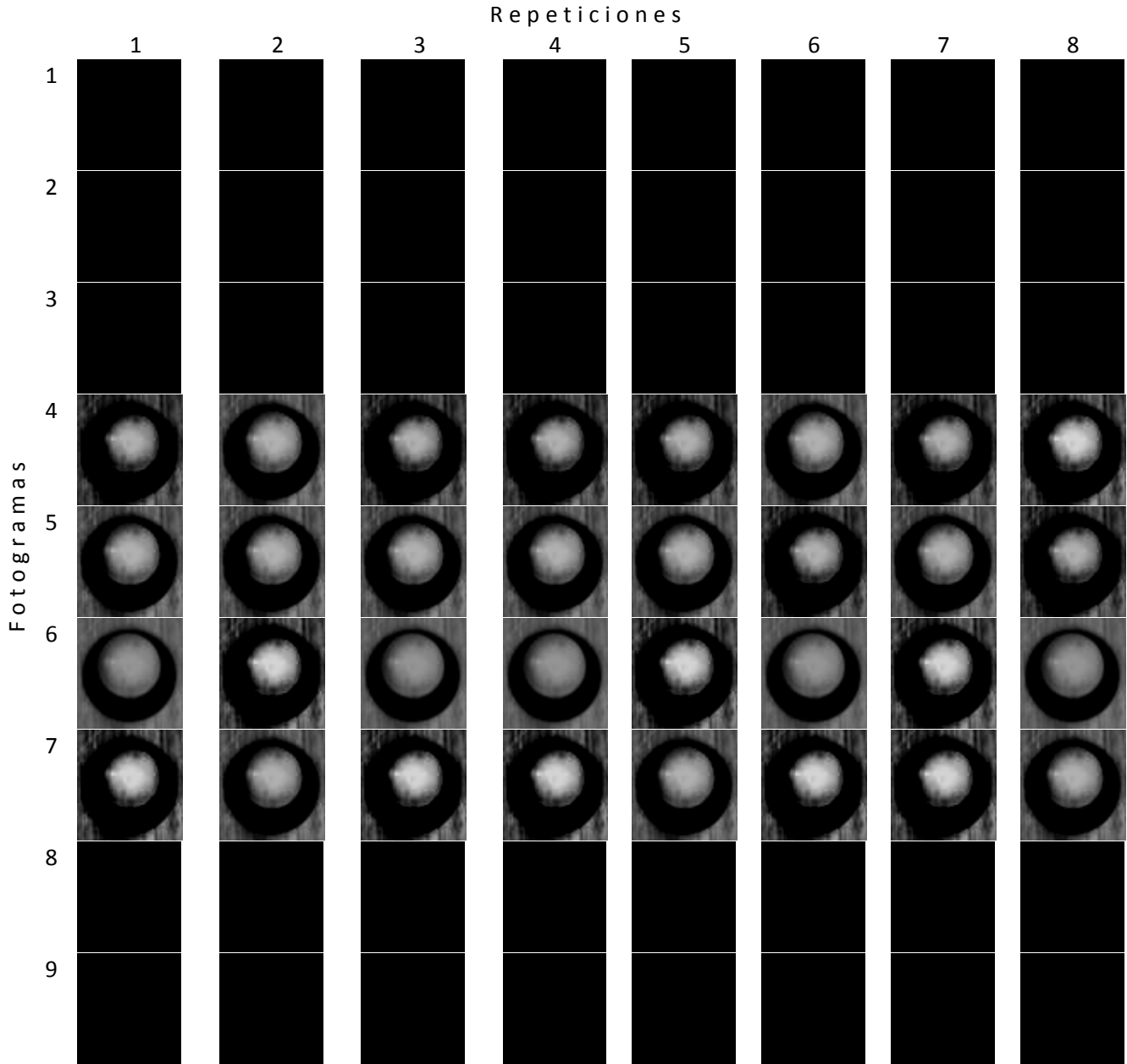


Figura 3.17. Pruebas de calibración del sistema de visión empleando un LED.

Como se aprecia en la FIGURA 3.17 siempre se pudo capturar que en el fotograma 4 es evidente que el LED encendió y que en el fotograma 8, el LED se apagó. Para lograrlo se cambió el programa del micro-controlador para que este encendiera dicho LED conectado en uno de sus puertos cada que recibiera un comando en su puerto serial.

La FIGURA 3.18 representa la corteza cerebral de un ratón. Ésta, como se puede apreciar, se encuentra completamente enfocada, mientras que la FIGURA 3.19 es una de tantas que se tomaron durante la experimentación y, como se puede apreciar, esta se encuentra desenfocada.

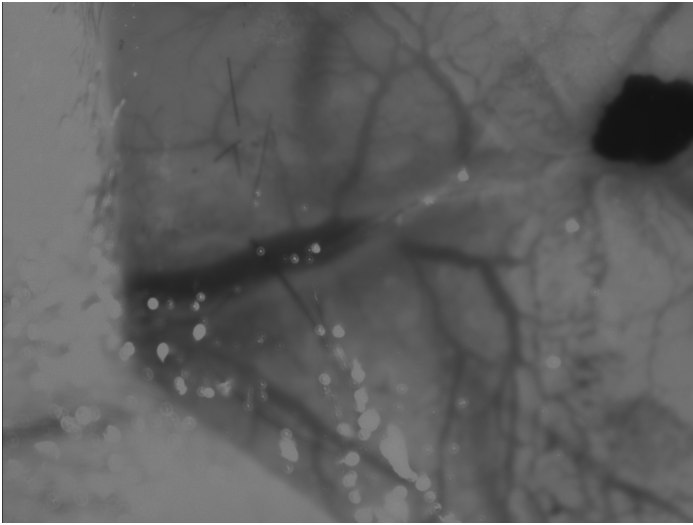


Figura 3.18: Imagen enfocada.

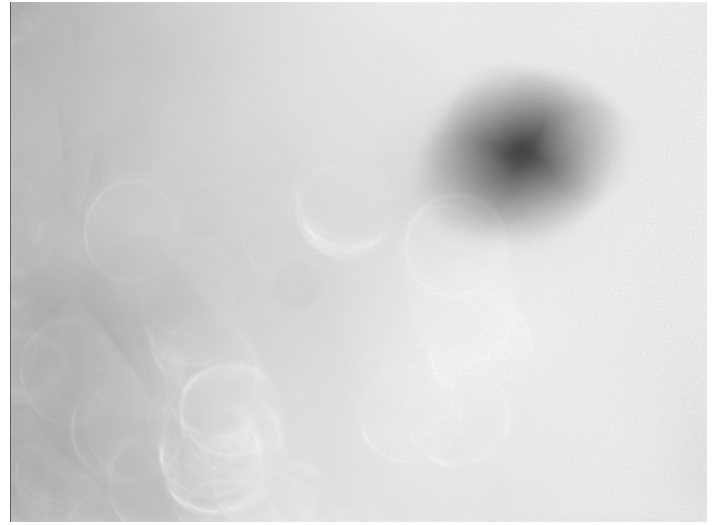


Figura 3.19: Imagen desenfocada.

Además de desenfocar la imagen hacia el cráneo del ratón, es necesario iluminar la escena con luz de color rojo-naranja correspondiente a una longitud de onda $\lambda = 617[\text{nm}]$, pero además de ello, es fundamental que la cámara tenga cierto nivel de iluminación. En la FIGURA 3.20 se muestra un histograma en donde se puede apreciar el nivel de iluminación por pixel, lo cual se interpreta como la cantidad de luz que incide sobre este elemento y cuyo efecto es que la imagen resultante se aprecie con mayor o menor claridad. El nivel de iluminación o valor por pixel con el que se realizaron los experimentos fue de un poco menos del 50%:

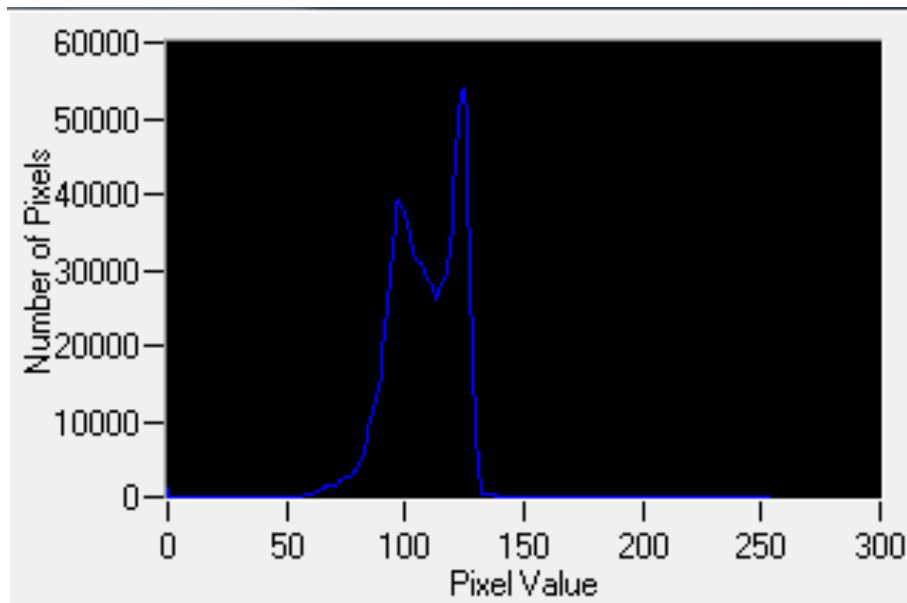


Figura 3.20. Histograma que muestra la saturación del CCD durante la experimentación.

3.4. Banco de pruebas

Para poder realizar el protocolo experimental con todo el equipo integrado, es necesario que, en primera instancia, se asegure la integridad del sujeto de pruebas. Para ello se debe contar con un termómetro/regulador de temperatura y una mascarilla de anestesia que puede ser colocada en la nariz del ratón. Esto último es necesario porque el ratón tiene que permanecer dormido durante todo el experimento, dado que se realiza una cirugía en la piel que cubre su cráneo.

En la FIGURA 3.21 se aprecia al termómetro/regulador de temperatura (2), el cual consta de una pequeña mesa de trabajo sobre la cual se coloca al ratón. Esta mesa de trabajo, además de proporcionar una superficie rígida sobre la cual trabajar con el animal, es una estructura controlada que aumenta o disminuye su temperatura por medio de un lazo de control. El sensado se realiza utilizando un termómetro que se inserta vía rectal en el ratón. Dependiendo de la temperatura del animal, si esta no es igual a la indicada en el instrumento, esta mesa de trabajo aumentará o disminuirá la temperatura hasta llegar a un punto de equilibrio, asegurando con ello que el animal se encuentre a una temperatura controlada de $\sim 37^{\circ}\text{C}$.

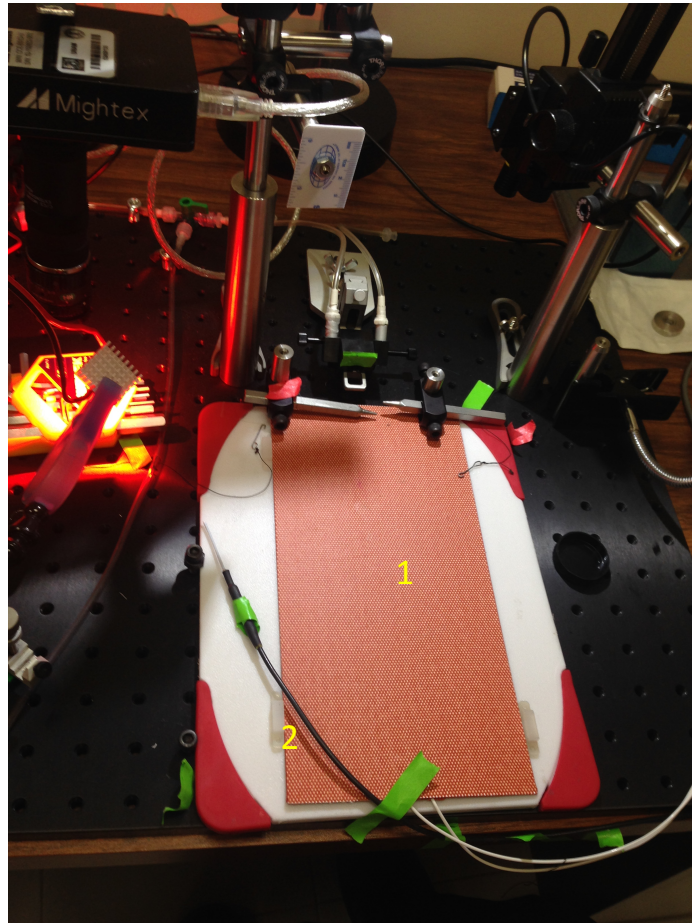


Figura 3.21. Mesa de trabajo (1) con termómetro regulador de temperatura (2).

Por otro lado, la mascarilla de anestesia que se aprecia en la FIGURA 3.22 consta de dos sujetadores, los cuales se colocan en las orejas del ratón con el objetivo de mantener su cabeza lo más estable posible. En caso de que esto no se logre, es muy probable que la experimentación no

proporcione los resultados esperados, ya que un movimiento tan sutil, como la respiración del ratón, provocará que todas las imágenes no sean repetibles. Es también por esta razón que es muy importante que el ratón se encuentre en óptimas condiciones físicas y que el nivel de anestesia permita asegurar que se encuentra lo suficientemente dormido sin que esto afecte importantemente su frecuencia respiratoria.

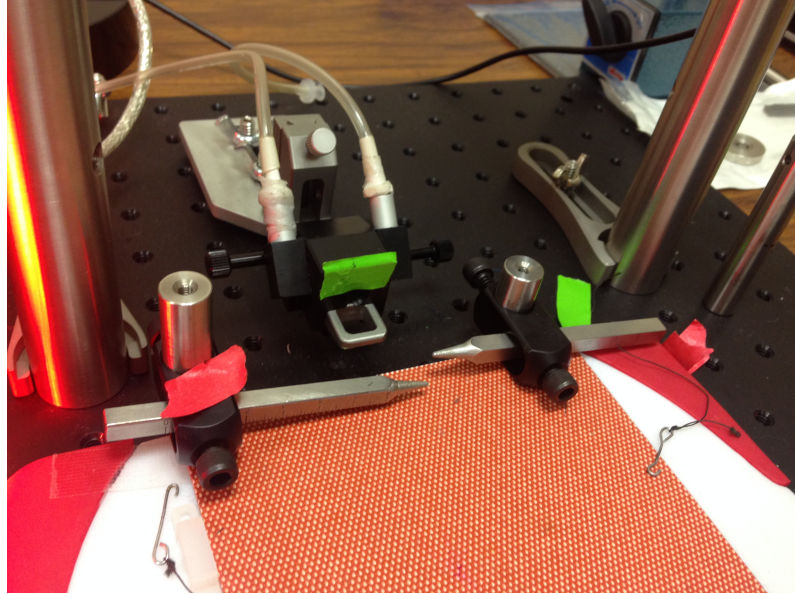


Figura 3.22. Mesa de trabajo con la mascarilla de anestesia y las piezas de sujeción del cráneo.

Finalmente, en la FIGURA 3.23, se muestra el arreglo de los dispositivos anteriormente descritos siendo utilizados en el sujeto de pruebas, conformando así el montaje de control fisiológico de este.

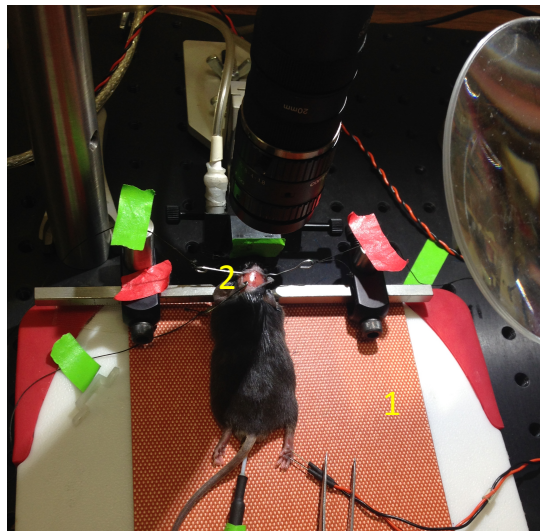


Figura 3.23. Banco de pruebas funcionando con el sujeto de pruebas (1). Cráneo expuesto (2).

En la FIGURA 3.24 se aprecian todos los dispositivos involucrados en el experimento:

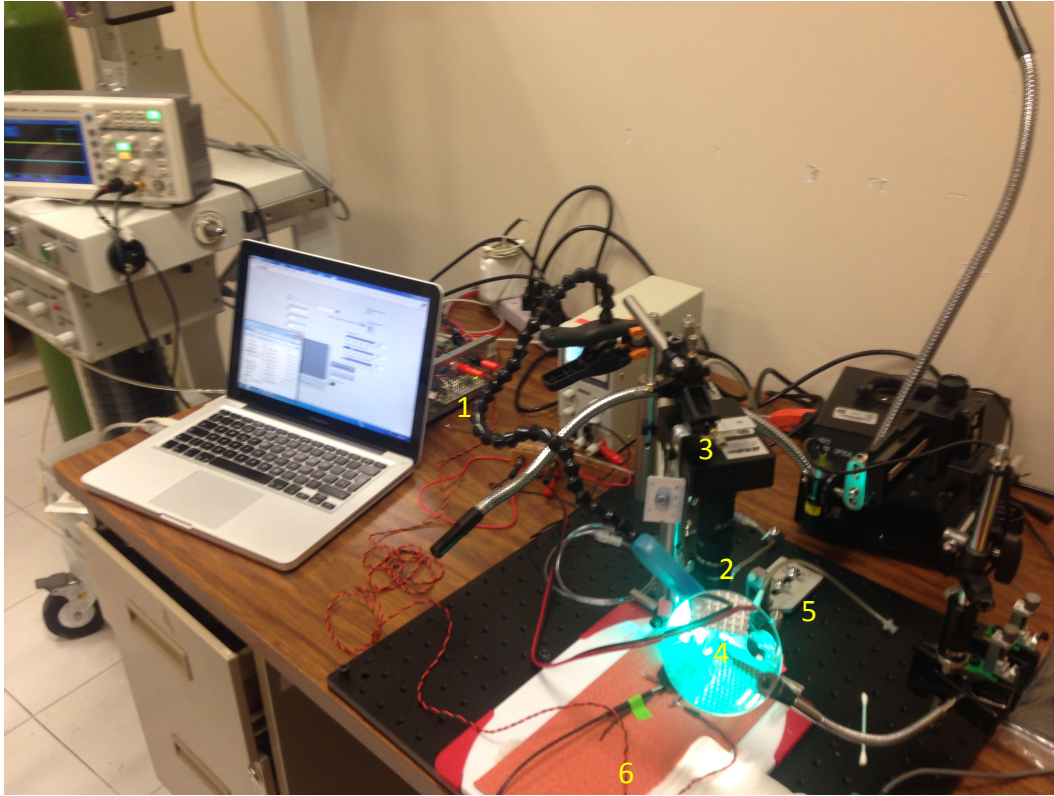


Figura 3.24. Rig de estimulación (1), adquisición de imágenes (2), posicionamiento (3), iluminación (4), anestesia (5) y control de temperatura (6).

3.5. Interfaz gráfica de control

La interfaz gráfica de usuario corresponde al programa que corre en la computadora y el programa que funciona con ella es el encargado de mandar información al microcontrolador del electro-estimulador y a la cámara.

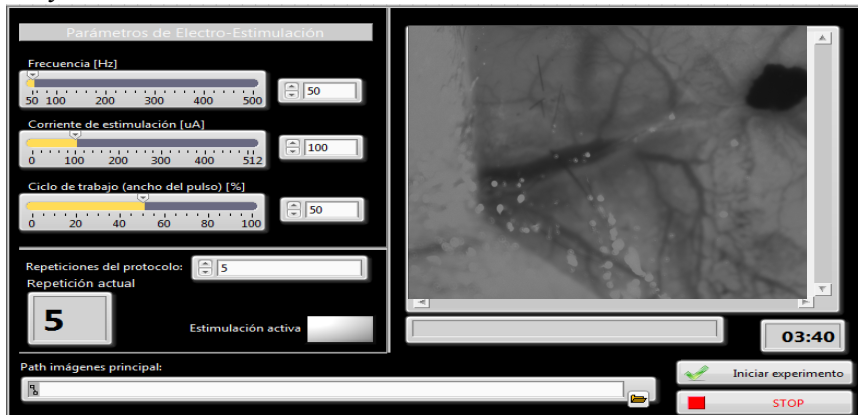


Figura 3.25. Interfaz gráfica de usuario (*GUI*) en donde se aprecian los controles para "moldear" la señal de estimulación.

En la FIGURA 3.25 se muestra la interfaz gráfica desarrollada y que permite manipular todo el experimento desde una computadora. En ella se aprecia un apartado en donde se colocan los parámetros de electro-estimulación ubicado en la parte superior izquierda. El resto de los apartados indican la cantidad de veces que se requiere repetir el protocolo de electro-estimulación, así como un indicador de las repeticiones transcurridas. La barra inferior permite ingresar el directorio en el cual se guardarán las imágenes de todo el experimento, así como un cronómetro cuya máxima representación es 99:59, útil para que el experimentador sepa cuánto tiempo ha tomado el experimento. En la parte superior izquierda hay un visor que muestra la primera fotografía capturada durante cada repetición del protocolo. Un par de botones permiten iniciar la experimentación y detener el programa, respectivamente. Finalmente, las imágenes son guardadas en una carpeta ubicada en la dirección indicada en el apartado “*Path* imágenes principal”. Estas son organizadas desde el momento en que son capturadas y se almacenan gracias a la interacción que existe entre el programa y el sistema operativo de la computadora.

Este capítulo describió la integración de todos los bloques tecnológicos que componen al electro-estimulador. Por otro lado se mostraron los resultados de la calibración del sistema y de esta manera los resultados experimentales tienen suficiente sustento teórico.

En el siguiente capítulo se mostrarán los resultados obtenidos al realizar los protocolos experimentales realizados en un sujeto bajo prueba.

Referencias del Capítulo 3

- [1] *Atmega328/P 8-bit AVR Microcontrollers Datasheet Complete*. 06. Atmel Corporation. Junio 2016.
- [2] <http://www.fmf.uni-lj.si/~ponikvar/STM32F407%20project/SerialCommunication-RS232.pdf>
- [3] *Mightex Buffered USB CCD Camera User Manual*. 1.0.7, Mightex. Julio 2011.
- [4] <https://www.thorlabs.com/drawings/7375dc33da503888-4F953A88-5056-0103-7946F0A7C643D6E5/PT3-AutoCADPDF.pdf>
- [5] Millar J., Barnett T.G., Trout S.J. (1994). *The neurodyne: A simple mains-powered constant-current stimulus isolator*.
- [6] C. Harrison Thomas, et.al (2009). *Simple and cost-effective hardware and software for functional brain mapping using intrinsic optical signal imaging*. Elsevier, *Journal of Neuroscience Methods*, p.9, Canadá.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este capítulo se muestran los mecanismos involucrados en la obtención de los resultados que el sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes debe proporcionar, así como el proceso de análisis de dichos resultados para que el usuario pueda corroborar que la electro-estimulación se realizó correctamente en el sujeto de pruebas.

4.1. Procedimiento de medición

Una vez que la señal de electro-estimulación es procesada la cámara debe tomar 10 imágenes durante 5 segundos (frecuencia de muestreo de 2[Hz]), período durante el cual hay un descanso para el sujeto de pruebas, es decir, no hay estimulación. Posteriormente, la señal de electro-estimulación es enviada por los electrodos hacia las almohadillas de la pata del ratón y es en este paso en el que se toman 2 imágenes más, esto es debido a que la señal de estimulación únicamente dura 1 segundo. Finalmente, se toman las imágenes correspondientes al período post-estimulación que es de 30 imágenes (19 segundos de descanso). Con este procedimiento tenemos 50 imágenes a las cuales se les etiqueta con el nombre de “Repetición del protocolo n ”. No hay que olvidar que este procedimiento llamado “protocolo” se repite n cantidad de veces, con lo cual al final de todas las repeticiones se tiene una cantidad de imágenes representada por:

$$n \cdot 50 = \text{Total de imágenes} \quad (4.1)$$

Aunado a ello es importante mencionar que existe un período de descanso entre todo el protocolo y la siguiente repetición de éste. El descanso que se proporciona al sujeto es de 30 segundos, período durante el cual no existe estimulación ni captura de imágenes. Considerando este tiempo de descanso es posible plantear la siguiente ecuación que representa el tiempo total de todo el experimento:

$$T. \text{ Experimental} = n \cdot (D. \text{ Prev.} + T. \text{ Estim.} + D. \text{ Post.} + D. \text{ Comp.}) \quad (4.2)$$

en donde:

$T. \text{ Experimental}$	=>	Tiempo total del experimento, en segundos
n	=>	Cantidad de repeticiones
$D. \text{ Prev.}$	=>	Descanso previo a la estimulación, en segundos
$T. \text{ Estim.}$	=>	Duración de la estimulación, en segundos
$D. \text{ Post.}$	=>	Descanso posterior a la estimulación, en segundos
$D. \text{ Comp.}$	=>	Descanso complementario (sin estimulación ni imágenes), en segundos

Para el experimento realizado se tuvo que el protocolo se repitió $n = 30$ veces, que hubieron 5[s] de descanso previo a la estimulación, 1[s] de duración de la estimulación, 19[s] de descanso

posterior a la estimulación, más los 30[s] de descanso sin estimulación ni captura de imágenes, por lo cual este experimento duró 1650[s] = 27.5[min].

La FIGURA 4.1 muestra gráficamente un único protocolo que, como ya se mencionó, puede ser repetido varias veces.

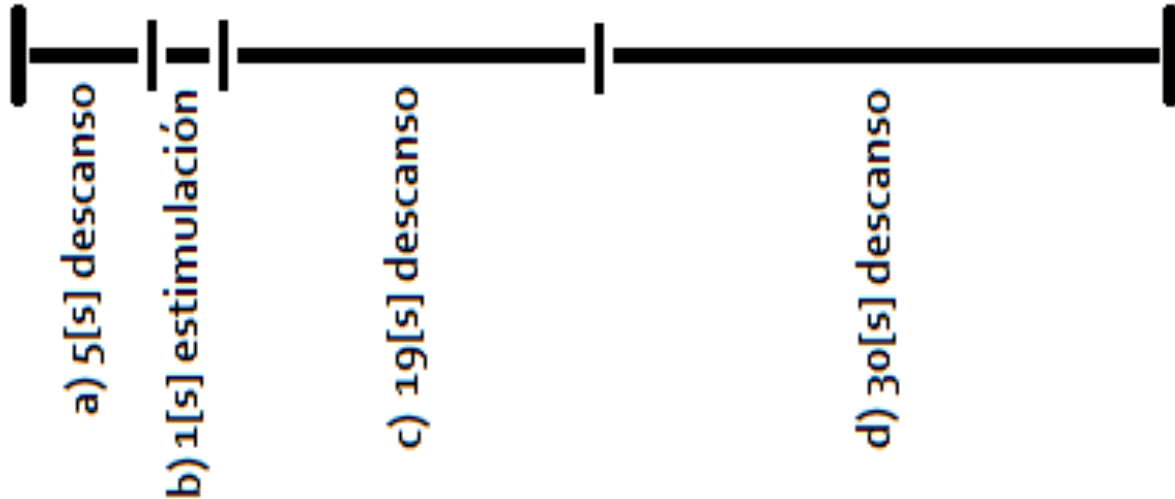


Figura 4.1. Diagrama de un protocolo de estimulación.

La FIGURA 4.2 muestra una representación gráfica del comportamiento del tejido cerebral del ratón cuando hay descanso, estimulación y un descanso más prolongado que el primero (ocurre una etapa basal).

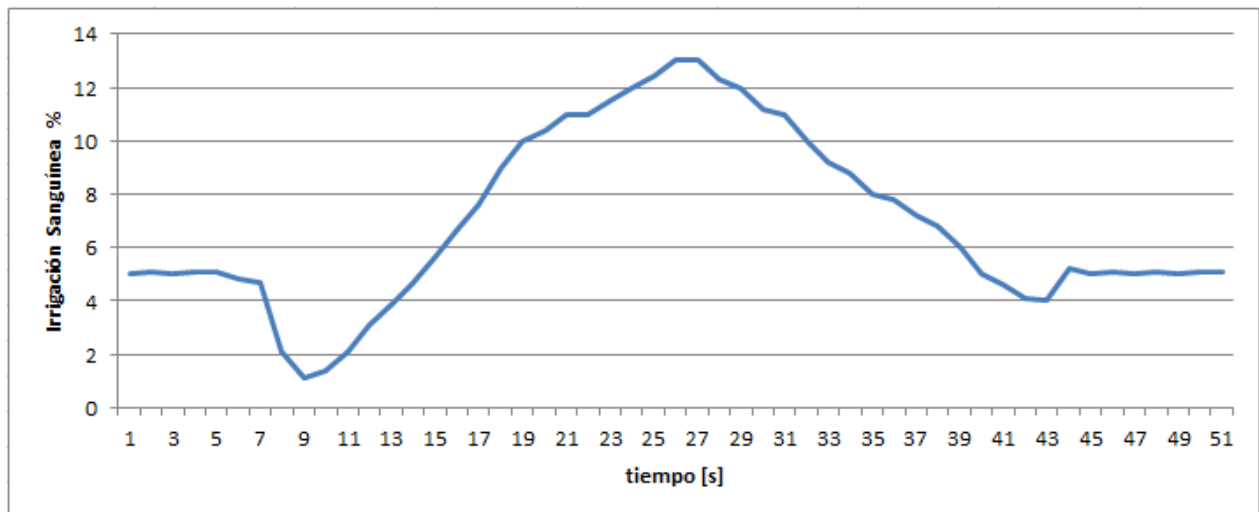


Figura 4.2: Representación de la respuesta (irrigación sanguínea) que ocurre en el tejido cerebral del ratón, con respecto al tiempo.¹

4.2. Monitoreo de la respuesta cerebral por electro-estimulación en ratones

En las imágenes que se presentarán a continuación se explicará el proceso que fue necesario realizar para obtener los resultados mostrados. Se busca con ello demostrar la secuencia de eventos.

En la FIGURA 4.3 se aprecian cómo el ratón fue expuesto a una cirugía para abrir la piel de su cráneo. A edad temprana el cráneo del animal es transparente, por lo que no es necesario abrirlo. Con ello, toda la estructura cerebral se puede apreciar. La luz verde-turquesa resalta los vasos sanguíneos en la imagen de la cámara.

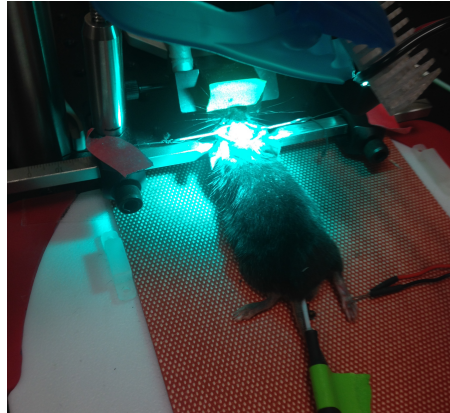


Figura 4.3. Cráneo del ratón expuesto e iluminado con luz verde-turquesa.

En la FIGURA 4.4 se observa la colocación de los electrodos en las almohadillas de la pata trasera derecha del animal a aproximadamente una distancia entre sí y una profundidad de 2[mm].

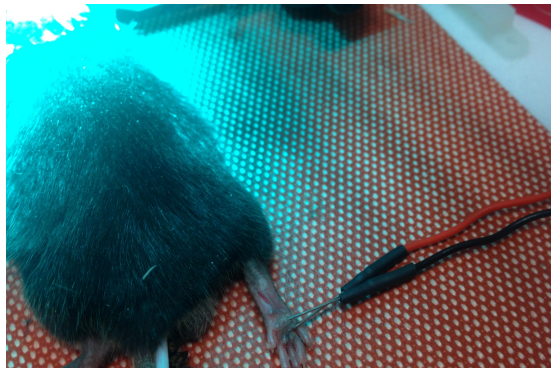


Figura 4.4. Colocación de los electrodos en la pata del ratón.

En la FIGURA 4.5 se observa el equipo funcionando en conjunto. En la computadora se “moldea” la señal de estimulación desde la interfaz de usuario y se cambia la luz que incide sobre el sujeto de pruebas de verde-turquesa a rojo-naranja.

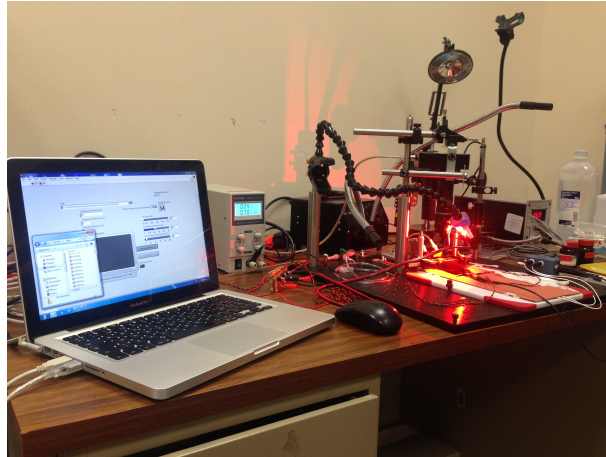


Figura 4.5. Sistema en funcionamiento.

Para la FIGURA 4.6 se observa que la electro-estimulación se realizó cada 55 segundos. En el osciloscopio que se muestra, la corriente de estimulación se aprecia en el canal 1 (azul) y el voltaje se muestra en el canal 2 (amarillo). Es importante notar que la escala de tiempo está configurada en 10[s] por división.

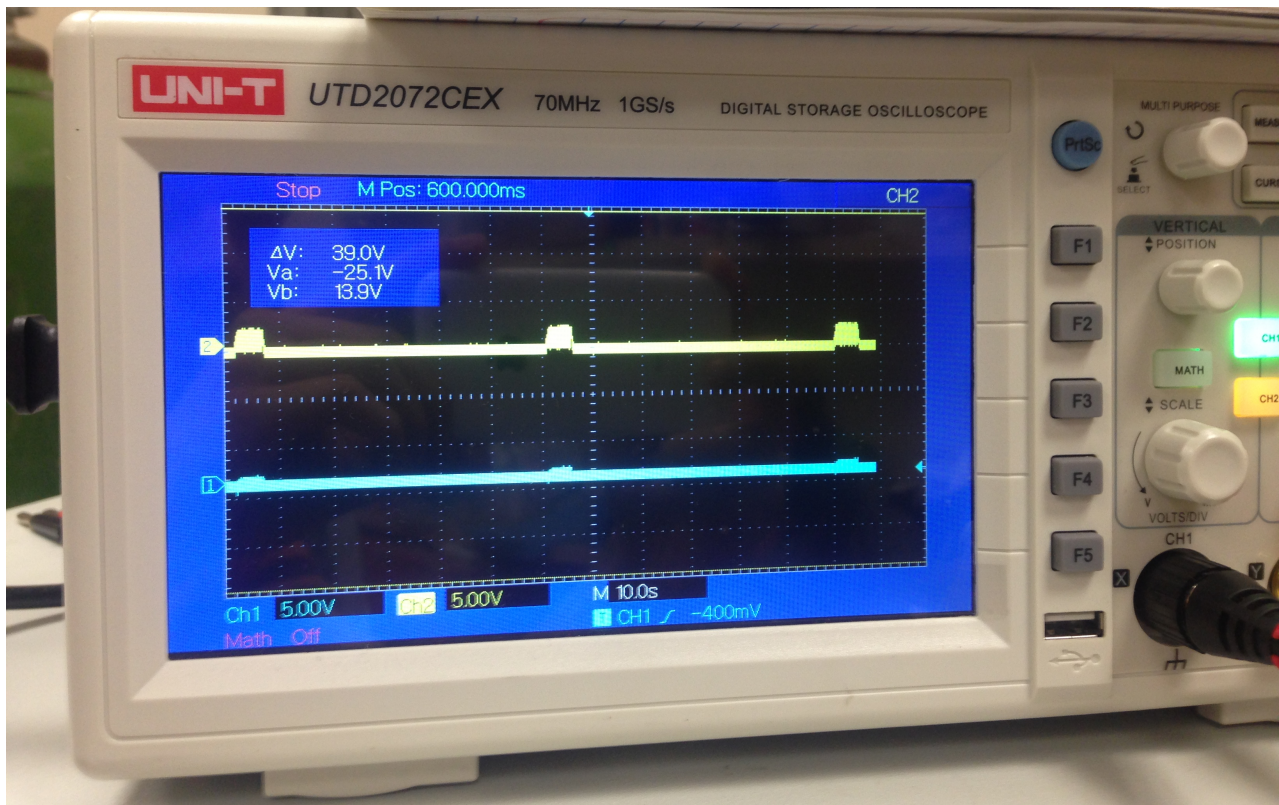


Figura 4.6. Señales de electro-estimulación.

En la FIGURA 4.7 se observa que el macroscopio de la cámara (1) y el cráneo del ratón expuesto (2).

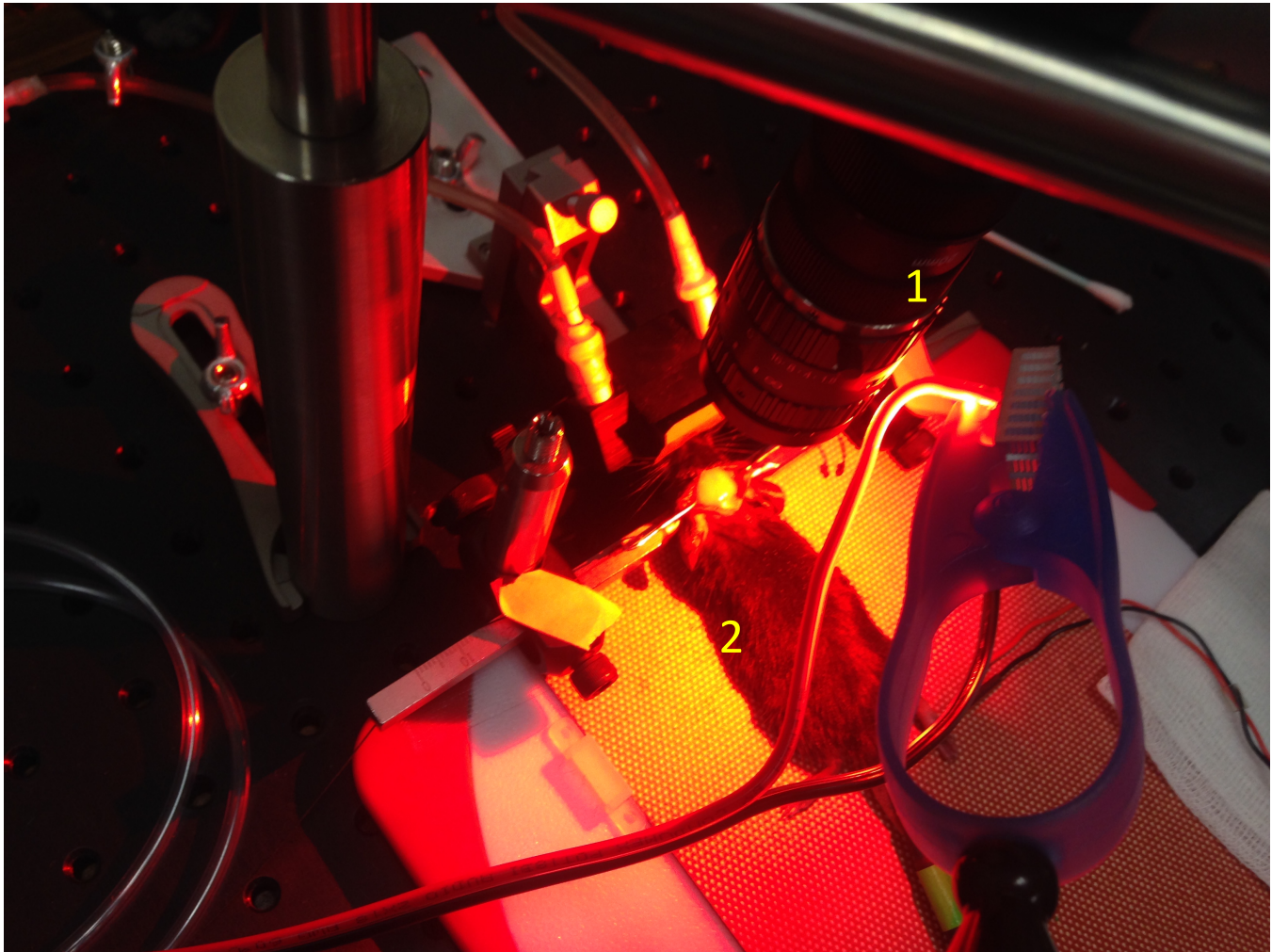


Figura 4.7. Zoom in al experimento efectuándose en el sujeto de pruebas. 1) Cámara. 2) Sujeto de pruebas.

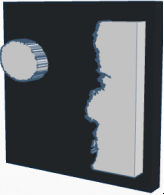
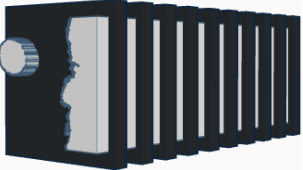
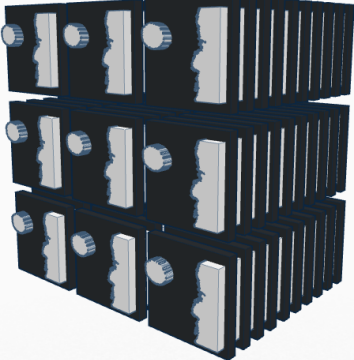
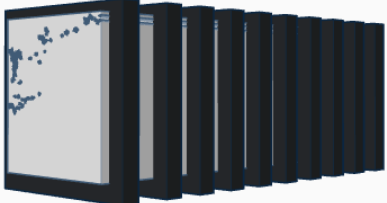
4.3. Procesamiento de las imágenes

Tras haber realizado la captura de todas las imágenes para cada repetición y tomando en consideración que durante cada una de ellas se debe capturar exactamente la misma cantidad de ellas es necesario procesarlas para obtener los resultados. También es importante observar que todas las imágenes adquiridas se hicieron a una resolución de 1392 x 1040 píxeles, a una profundidad de 12 bits, con lo cual cada una de las imágenes ocupa 4.3MB de espacio en memoria secundaria de la computadora central. El formato inicial de estas imágenes es BMP, para ser posteriormente transformadas a formato TIFF. Realizando el cálculo de la cantidad de memoria que este experimento ocupa, se llega al resultado de 6450MB necesarios; sin embargo esta cantidad de memoria no será toda la que se ocupará debido a que cada conjunto de 50 imágenes que pertenece a cada una de las repeticiones, es posteriormente agrupado en secuencias de imágenes para poder

normalizarlas y promediarlas en conjunto, procedimientos que tienen como resultado la utilización de memoria adicional.

En la tabla 4.1 se puede observar el procedimiento por el cual se hacen pasar todas las imágenes para llegar al resultado final.

Tabla 4.1. Descripción del procesamiento de las imágenes.

	<p>Se almacenan todas las imágenes que se obtienen como resultado después de cada repetición; en este caso se obtienen 50 imágenes en cada una.</p>
	<p>Para cada conjunto de 50 imágenes se forma una secuencia.</p>
	<p>Una vez que se tienen todas las secuencias de cada repetición se procede a realizar un proceso estadístico con el cual se promedia la reflexión presente en todas las imágenes previas a la estimulación. Además de ello se hace lo mismo con las imágenes posteriores a la estimulación. Finalmente se obtiene la relación entre ambos promedios y se procede a realizar una normalización con respecto a las primeras imágenes que representan los momentos previos a la estimulación.</p>
	<p>El resultado es una secuencia de 50 imágenes a partir del cual se crea el video en cuyos primeros segundos se aprecian tonalidades blancas/grises y conforme este avanza se aprecian tonalidades grises/oscuras en el área cerebral dentro de la cual ocurrió la estimulación.</p>

El resultado es un video en cuyos primeros cuadros podemos considerar que tenemos un conjunto de píxeles blancos y/o grises. A medida que transcurren los fotogramas del video se verá cómo en cierta área de la imagen los píxeles comienzan a cambiar a tonos grises más oscuros hasta llegar a negro. Lo que esto indica es que al existir una estimulación en el área cerebral para la cual está mapeada la extremidad estimulada, existirá mayor cantidad de sangre oxigenada (oxi-hemoglobina) en el cerebro.^{2,3} Dicha área, debido a la estimulación, se apreciará en la imagen con mayor cantidad de píxeles negros debido a que la sangre oxigenada que se presentó dada la estimulación absorbió la luz emitida por el *LED* rojo-naranja y, en consecuencia, la reflexión en dicha área fue menor con respecto al resto del tejido en donde no hay sangre oxigenada.^{4,5}

Es posible asegurar en qué momento del video se apreciará la estimulación. Esto se debe a que se sabe que la respuesta a nivel cerebral de la estimulación se aprecia un segundo después de que el evento eléctrico ocurre en la extremidad, además de que se sabe exactamente en qué número de fotografía se comenzó a capturar el evento.

En la parte final del video se puede apreciar cómo poco a poco los pixeles regresan a tonalidades blancas/grises claros debido a que es en este momento el tejido comienza a regresar a su estado basal o de no-estimulación.

La FIGURA 4.8 muestra una secuencia de imágenes cuyos colores han sido invertidos pretendiendo mejorar el resultado. Estas imágenes fueron tomadas de los resultados del procedimiento descrito y en ellas se aprecia el momento en que ocurre el efecto de la electroestimulación en el cerebro de un ratón de 3 meses de edad.

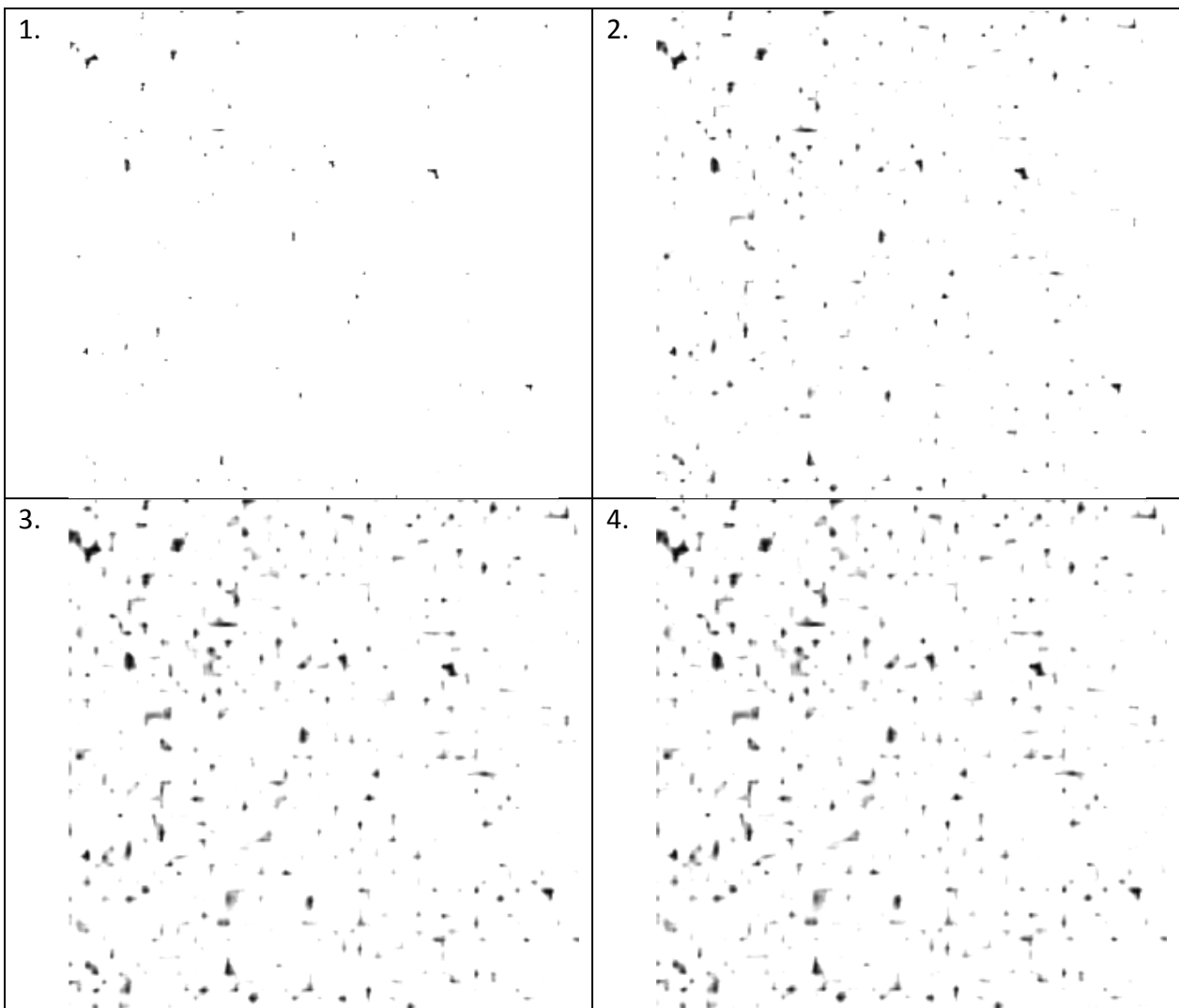


Figura 4.8. Imágenes del cráneo de un ratón estimulado e iluminado a 617[nm]. Efecto de la absorción por la hemoglobina oxigenada.

Lo que se logra apreciar en la figura anterior es el cráneo del ratón preparado como se ha descrito previamente. Los puntos negros que aparecen poco a poco son los reflejos cerebrales que ocurren tras realizar la electro-estimulación.

A lo largo de este capítulo fue posible demostrar el correcto funcionamiento del electro-estimulador gracias a que todo el proceso de diseño que involucró la construcción de este sistema se siguió tomando siempre en cuenta que todos los bloques/módulos que lo componen deben estar conectados entre sí de la forma más integral posible, sin perder de vista que ninguno de ellos debe fallar.

A continuación se presentan las conclusiones derivadas de la realización de este proyecto, para finalizar con los anexos que permitirán ahondar en el lenguaje y conceptos técnicos necesarios para realizar este proyecto.

Referencias del Capítulo 4

- [1] N. Clarkson Andrew, et.al (2013). *Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model*.
- [2] I. Baird (1966). *Technical Note: A new stimulus isolator for biological applications*.
- [3] Tanye Tang Yujie, et.al (2011). *Development and characterization of a microfluidic chamber incorporating fluid ports with active suction for localized chemical stimulation of brain slices*.
- [4] C. Harrison Thomas, et.al (2009). *Simple and cost-effective hardware and software for functional brain mapping using intrinsic optical signal imaging*. Elsevier, *Journal of Neuroscience Methods*, p.9, Canadá.
- [5] López-Valdés Héctor E., et.al (2013). *Memantine Enhances Recovery from Stroke*. *Stroke, Journal of the American Heart Association*, p.9, EUA.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este trabajo fue necesario describir los componentes fundamentales desarrollados para construir el sistema de electro-estimulación y adquisición de imágenes. En el capítulo 1 fue necesario conocer y entender qué es un electro-estimulador y por qué es importante, sin perder de vista que este tipo de instrumentación existe desde hace varios años a nivel mundial. En el capítulo 2 se hablaron los antecedentes teóricos de un sistema como el desarrollado, así como las respuestas óptica y eléctrica que suceden en el tejido biológico y cómo es que ello permite adquirir imágenes con la información buscada por el neurocientífico. En el capítulo 3 se habló del diseño e integración del sistema, pasando por todos los bloques que constituyen al sistema propuesto, como la unidad de control, la fuente de corriente controlada por voltaje, el voltaje de complianza y el aislamiento eléctrico que debe existir en este tipo de instrumentación, así como la calibración y posicionamiento de la cámara empleada, para finalmente llegar a utilizar todo el sistema integrado en un banco de pruebas con un ratón de la cepa C57BL/6 anestesiado. Finalmente, en el capítulo 4 se habló del protocolo de estimulación empleado, que constó de varios segundos de descanso para el animal, seguido de un breve momento de electro-estimulación para dar cabida a otro período de descanso para finalmente pasar a una breve descripción de los mecanismos por los que tienen que pasar las imágenes obtenidas al procesarlas.

El sistema diseñado y construido, si bien pasó por muchas etapas y modificaciones, es posible en este momento describirlo como un sistema que permite realizar electro-estimulación y adquisición de imágenes en ratones vivos. El electro-estimulador puede proporcionar pulsos de corriente aislados que pueden ser variados en frecuencia hasta los 500[Hz], en amplitud hasta 580[uA] y en ancho de pulso hasta el 100%. La máxima carga que se puede conectar al aparato es de 300[kΩ] y el voltaje de complianza con el que este cuenta es de 180[V]. El electro-estimulador es controlado por medio de un programa que funciona desde una computadora y este se comunica con un microcontrolador de 8 bits embebido en él. La comunicación entre ambos dispositivos se realiza mediante el protocolo serial RS232 a 9600 bauds.

La utilización de un micro-controlador de 8 bits permitió trabajar suficientemente bien los aspectos técnicos relacionados con la generación de la señal de electro-estimulación y de sincronización con la cámara. Sin embargo, si se requiere escalar este proyecto en el futuro, considero que el componente principal a cambiar sería dicho micro-controlador por uno que tenga más prestaciones de hardware y más velocidad. Otra alternativa que se podría considerar y que permitiría un nivel de escalabilidad superior sería la utilización de una FPGA (*Field-Programmable Gate Array*). Esta permitiría realizar cómputo de manera paralela logrando también que gran parte del cómputo involucrado en la etapa de resultados se pueda distribuir entre dicha arquitectura de *hardware* y la computadora central, además de que dicha forma de construir el sistema permitiría proporcionar más resultados al neurocientífico durante la electro-estimulación.

Para mejorar los resultados experimentales y obtener mejor calidad de imágenes, se podría recurrir a una o varias alternativas tecnológicas relacionadas con el método de interacción óptica entre el sistema y el sujeto de pruebas. Algunas alternativas serían utilizar una cámara de una profundidad de 16 bits o superior, con un tiempo de muestreo inferior, que repercute en obtener más imágenes en la misma cantidad de tiempo e incluso mayor resolución final en las imágenes. Esto debido a que durante la experimentación la resolución espacial que la cámara utilizada proporciona únicamente llega a cubrir un poco más de $\frac{1}{4}$ del área cerebral del ratón ($\approx 12\text{mm}^2$). Otra opción a considerar para mejorar al sistema es emplear una mascarilla que permita mejorar el

posicionamiento de la cabeza del ratón cuando este se encuentra anestesiado ya que, debido a la respiración del animal, es complejo asegurar que las imágenes tengan la menor cantidad de movimiento entre sí. Esta variabilidad de condiciones provoca que se aprecie movimiento entre las imágenes, ocasionando que no se obtengan resultados favorables al momento de realizar el promedio y normalización de ellas.

Finalmente, el desarrollo y la integración de un primer prototipo de sistema de electroestimulación y adquisición de imágenes permitió realizar las primeras pruebas aplicadas a experimentación real en neurociencias, teniendo como resultado una correcta sincronización entre la estimulación y las imágenes adquiridas en sujetos bajo pruebas, obteniendo con ello los mapas cerebrales derivados de la irrigación sanguínea en el cerebro del animal, al aplicar a este una cierta corriente eléctrica. Debido a que se pudo comprobar el correcto funcionamiento del sistema en pruebas reales, será posible utilizar el sistema desarrollado para realizar más experimentos buscando generar bancos de imágenes que permitan al neurocientífico analizar diferentes procesos cerebrales tales como desarrollo de fármacos capaces de tratar el infarto cerebral en humanos.

A N E X O S

ANEXO A. HOJAS DE ESPECIFICACIONES DE CIRCUITOS INTEGRADOS

2N6515 2N6516 2N6517 NPN
2N6518 2N6519 2N6520 PNP

COMPLEMENTARY SILICON
HIGH VOLTAGE TRANSISTORS



TO-92 CASE

Central
Semiconductor Corp.

www.centrasemi.com

DESCRIPTION:

The CENTRAL SEMICONDUCTOR 2N6515, 2N6518 series devices are complementary silicon transistors designed for high voltage driver and amplifier applications.

MARKING: FULL PART NUMBER

MAXIMUM RATINGS: ($T_A=25^\circ\text{C}$)

Collector-Base Voltage
Collector-Emitter Voltage
Emitter-Base Voltage (NPN)
Emitter-Base Voltage (PNP)
Continuous Collector Current
Continuous Base Current
Power Dissipation
Operating and Storage Junction Temperature

SYMBOL	2N6515	2N6516	2N6517	UNITS
	2N6518	2N6519	2N6520	
V_{CBO}	250	300	350	V
V_{CEO}	250	300	350	V
V_{EBO}		6.0		V
V_{EBO}		5.0		V
I_C		500		mA
I_B		250		mA
P_D		625		mW
T_J, T_{stg}		-65 to +150		$^\circ\text{C}$

ELECTRICAL CHARACTERISTICS: ($T_A=25^\circ\text{C}$)

SYMBOL	TEST CONDITIONS	2N6515		2N6516		2N6517		UNITS
		2N6518	2N6519	2N6519	2N6520	2N6520		
I_{CBO}	$V_{CB}=150\text{V}$	-	50	-	-	-	-	nA
I_{CBO}	$V_{CB}=200\text{V}$	-	-	-	50	-	-	nA
I_{CBO}	$V_{CB}=250\text{V}$	-	-	-	-	-	50	nA
I_{EBO}	$V_{EB}=5.0\text{V}$ (NPN)	-	50	-	50	-	50	nA
I_{EBO}	$V_{EB}=4.0\text{V}$ (PNP)	-	50	-	50	-	50	nA
BV_{CBO}	$I_C=100\mu\text{A}$	250	-	300	-	350	-	V
BV_{CEO}	$I_C=1.0\text{mA}$	250	-	300	-	350	-	V
BV_{EBO}	$I_E=10\mu\text{A}$ (NPN)	6.0	-	6.0	-	6.0	-	V
BV_{EBO}	$I_E=10\mu\text{A}$ (PNP)	5.0	-	5.0	-	5.0	-	V
$V_{CE(SAT)}$	$I_C=10\text{mA}, I_B=1.0\text{mA}$	-	0.30	-	0.30	-	0.30	V
$V_{CE(SAT)}$	$I_C=20\text{mA}, I_B=2.0\text{mA}$	-	0.35	-	0.35	-	0.35	V
$V_{CE(SAT)}$	$I_C=30\text{mA}, I_B=3.0\text{mA}$	-	0.50	-	0.50	-	0.50	V
$V_{CE(SAT)}$	$I_C=50\text{mA}, I_B=5.0\text{mA}$	-	1.0	-	1.0	-	1.0	V
$V_{BE(SAT)}$	$I_C=10\text{mA}, I_B=1.0\text{mA}$	-	0.75	-	0.75	-	0.75	V
$V_{BE(SAT)}$	$I_C=20\text{mA}, I_B=2.0\text{mA}$	-	0.85	-	0.85	-	0.85	V
$V_{BE(SAT)}$	$I_C=30\text{mA}, I_B=3.0\text{mA}$	-	0.90	-	0.90	-	0.90	V
$V_{BE(ON)}$	$V_{CE}=10\text{V}, I_C=100\text{mA}$	-	2.0	-	2.0	-	2.0	V
h_{FE}	$V_{CE}=10\text{V}, I_C=1.0\text{mA}$	35	-	30	-	20	-	
h_{FE}	$V_{CE}=10\text{V}, I_C=10\text{mA}$	50	-	45	-	30	-	
h_{FE}	$V_{CE}=10\text{V}, I_C=30\text{mA}$	50	300	45	270	30	200	
h_{FE}	$V_{CE}=10\text{V}, I_C=50\text{mA}$	45	220	40	200	20	200	
h_{FE}	$V_{CE}=10\text{V}, I_C=100\text{mA}$	25	-	20	-	15	-	

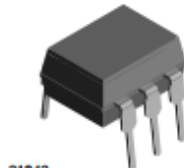
R2 (18-January 2016)



4N35, 4N36, 4N37

Vishay Semiconductors

Optocoupler, Phototransistor Output, with Base Connection



21842



177001-6

FEATURES

- Isolation test voltage 5000 V_{RMS}
- Interfaces with common logic families
- Input-output coupling capacitance < 0.5 pF
- Industry standard dual-in-line 6 pin package
- Compliant to RoHS directive 2002/95/EC and in accordance to WEEE 2002/96/EC



RoHS
COMPLIANT

APPLICATIONS

- AC mains detection
- Reed relay driving
- Switch mode power supply feedback
- Telephone ring detection
- Logic ground isolation
- Logic coupling with high frequency noise rejection

DESCRIPTION

Each optocoupler consists of gallium arsenide infrared LED and a silicon NPN phototransistor.

AGENCY APPROVALS

- Underwriters laboratory file no. E52744
- BSI: EN 60065:2002, EN 60950:2000
- FIMKO; EN 60065, EN 60335, EN 60950 certificate no. 25156

ORDER INFORMATION

PART	REMARKS
4N35	CTR > 100 %, DIP-6
4N36	CTR > 100 %, DIP-6
4N37	CTR > 100 %, DIP-6

ABSOLUTE MAXIMUM RATINGS ⁽¹⁾

PARAMETER	TEST CONDITION	SYMBOL	VALUE	UNIT
INPUT				
Reverse voltage		V_R	6	V
Forward current		I_F	50	mA
Surge current	$t \leq 10 \mu s$	I_{FSM}	1	A
Power dissipation		P_{diss}	70	mW
OUTPUT				
Collector emitter breakdown voltage		V_{CEO}	70	V
Emitter base breakdown voltage		V_{EBO}	7	V
Collector current		I_C	50	mA
	$t \leq 1 ms$	I_C	100	mA
Power dissipation		P_{diss}	70	mW
COUPLER				
Isolation test voltage		V_{ISO}	5000	V_{RMS}
Creepage			≥ 7	mm
Clearance			≥ 7	mm
Isolation thickness between emitter and detector			≥ 0.4	mm



ATmega48A/PA/88A/PA/168A/PA/328/P

ATMEL 8-BIT MICROCONTROLLER WITH 4/8/16/32KBYTES IN-SYSTEM PROGRAMMABLE FLASH

DATASHEET

Features

- High Performance, Low Power Atmel®AVR® 8-Bit Microcontroller Family
- Advanced RISC Architecture
 - 131 Powerful Instructions – Most Single Clock Cycle Execution
 - 32 x 8 General Purpose Working Registers
 - Fully Static Operation
 - Up to 20 MIPS Throughput at 20MHz
 - On-chip 2-cycle Multiplier
- High Endurance Non-volatile Memory Segments
 - 4/8/16/32KBytes of In-System Self-Programmable Flash program memory
 - 256/512/512/1KBytes EEPROM
 - 512/1K/1K/2KBytes Internal SRAM
 - Write/Erase Cycles: 10,000 Flash/100,000 EEPROM
 - Data retention: 20 years at 85°C/100 years at 25°C⁽¹⁾
 - Optional Boot Code Section with Independent Lock Bits
 - In-System Programming by On-chip Boot Program
 - True Read-While-Write Operation
 - Programming Lock for Software Security
- Atmel® QTouch® library support
 - Capacitive touch buttons, sliders and wheels
 - QTouch and QMatrix® acquisition
 - Up to 64 sense channels
- Peripheral Features
 - Two 8-bit Timer/Counters with Separate Prescaler and Compare Mode
 - One 16-bit Timer/Counter with Separate Prescaler, Compare Mode, and Capture Mode
 - Real Time Counter with Separate Oscillator
 - Six PWM Channels
 - 8-channel 10-bit ADC in TQFP and QFN/MLF package
 - Temperature Measurement
 - 6-channel 10-bit ADC in PDIP Package
 - Temperature Measurement
 - Programmable Serial USART
 - Master/Slave SPI Serial Interface
 - Byte-oriented 2-wire Serial Interface (Philips I²C compatible)
 - Programmable Watchdog Timer with Separate On-chip Oscillator
 - On-chip Analog Comparator
 - Interrupt and Wake-up on Pin Change

D4SB80

PRV : 800 Volts
Io : 4.0 Amperes

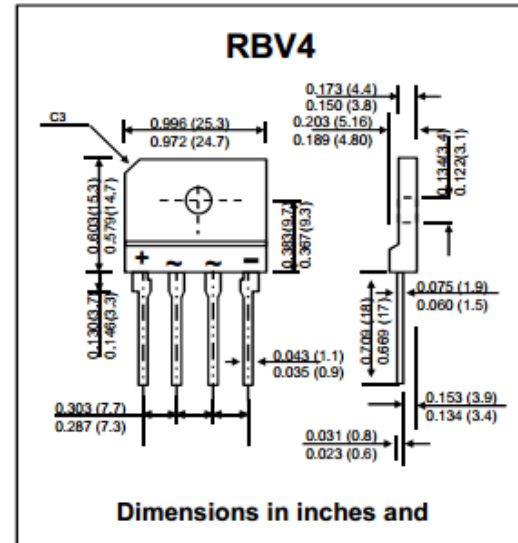
FEATURES :

- * High current capability
- * High surge current capability
- * High reliability
- * Low reverse current
- * Low forward voltage drop
- * **Pb / RoHS Free**

MECHANICAL DATA :

- * Case : Reliable low cost construction utilizing molded plastic technique
- * Epoxy : UL94V-O rate flame retardant
- * Terminals : Plated lead solderable per MIL-STD-202, Method 208 guaranteed
- * Polarity : Polarity symbols marked on case
- * Mounting position : Any
- * Weight : 4.28 grams

SILICON BRIDGE RECTIFIER



MAXIMUM RATINGS AND ELECTRICAL CHARACTERISTICS (If not specified Tc = 25 °C)

RATING	SYMBOL	VALUE	UNIT
Maximum Reverse Voltage	V_{RM}	800	V
Maximum Average Rectified Forward Current (50 Hz sine wave, R-load)	$I_{F(AV)}$	With heatsink Tc = 108 °C	4.0
		Without heatsink Ta = 25 °C	2.3
Maximum Peak Surge Forward Current, 50Hz sine wave, Non-repetitive 1 cycle peak value, Tj = 25 °C	I_{FSM}	150	A
Maximum Forward Voltage at $I_F = 2.0$ A **	V_F	0.95	V
Maximum Reverse Current at $V_R = V_{RM}$ **	I_R	10	μA
Thermal Resistance, Junction to Case (With heatsink)	$R_{\theta JC}$	5.5	°C/W
Thermal Resistance, Junction to Lead (Without heatsink)	$R_{\theta JL}$	6.0	°C/W
Thermal Resistance, Junction to Ambient (Without heatsink)	$R_{\theta JA}$	30	°C/W
Operating Junction Temperature Range	T_J	150	°C
Storage Temperature Range	T_{STG}	- 40 to + 150	°C

** Pulse measurement, Rating of per diode.



IRF630, SiHF630

Vishay Siliconix

Power MOSFET

PRODUCT SUMMARY		
V_{DS} (V)	200	
$R_{DS(on)}$ (Ω)	$V_{GS} = 10$ V	0.40
Q_g (Max.) (nC)	43	
Q_{gs} (nC)	7.0	
Q_{gd} (nC)	23	
Configuration	Single	

FEATURES

- Dynamic dV/dt Rating
- Repetitive Avalanche Rated
- Fast Switching
- Ease of Paralleling
- Simple Drive Requirements
- Compliant to RoHS Directive 2002/95/EC

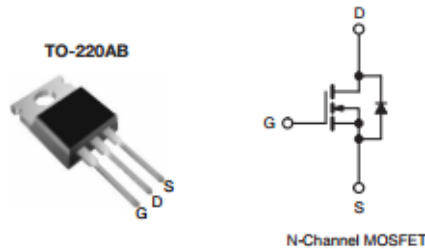


Available
RoHS*
COMPLIANT

DESCRIPTION

Third generation Power MOSFETs from Vishay provide the designer with the best combination of fast switching, ruggedized device design, low on-resistance and cost-effectiveness.

The TO-220AB package is universally preferred for all commercial-industrial applications at power dissipation levels to approximately 50 W. The low thermal resistance and low package cost of the TO-220AB contribute to its wide acceptance throughout the industry.



ORDERING INFORMATION	
Package	TO-220AB
Lead (Pb)-free	IRF630PbF SiHF630-E3
SnPb	IRF630 SiHF630

ABSOLUTE MAXIMUM RATINGS ($T_C = 25^\circ\text{C}$, unless otherwise noted)					
PARAMETER			SYMBOL	LIMIT	UNIT
Drain-Source Voltage			V_{DS}	200	V
Gate-Source Voltage			V_{GS}	± 20	
Continuous Drain Current	V_{GS} at 10 V	$T_C = 25^\circ\text{C}$	I_D	9.0	A
		$T_C = 100^\circ\text{C}$		5.7	
Pulsed Drain Current ^a			I_{DM}	36	
Linear Derating Factor				0.59	W/ $^\circ\text{C}$
Single Pulse Avalanche Energy ^b			E_{AS}	250	mJ
Repetitive Avalanche Current ^a			I_{AR}	9.0	A
Repetitive Avalanche Energy ^a			E_{AR}	7.4	mJ
Maximum Power Dissipation	$T_C = 25^\circ\text{C}$		P_D	74	W
Peak Diode Recovery dV/dt^c			dV/dt	5.0	V/ns
Operating Junction and Storage Temperature Range			T_J, T_{stg}	- 55 to + 150	$^\circ\text{C}$
Soldering Recommendations (Peak Temperature)	for 10 s			300 ^d	
Mounting Torque	6-32 or M3 screw			10	lbf · in
				1.1	N · m

Notes

- Repetitive rating; pulse width limited by maximum junction temperature (see fig. 11).
- $V_{DD} = 50$ V, starting $T_J = 25^\circ\text{C}$, $L = 4.6$ mH, $R_g = 25\ \Omega$, $I_{AS} = 9.0$ A (see fig. 12).
- $I_{SD} \leq 9.0$ A, $dI/dt \leq 120$ A/ μs , $V_{DD} \leq V_{DS}$, $T_J \leq 150^\circ\text{C}$.
- 1.6 mm from case.

* Pb containing terminations are not RoHS compliant, exemptions may apply

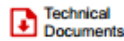
Document Number: 91031
S11-0509-Rev. B, 21-Mar-11

www.vishay.com

1

This datasheet is subject to change without notice.

THE PRODUCT DESCRIBED HEREIN AND THIS DATASHEET ARE SUBJECT TO SPECIFIC DISCLAIMERS, SET FORTH AT www.vishay.com/doc?91000

Product
FolderSample &
BuyTechnical
DocumentsTools &
SoftwareSupport &
Community
TL081, TL081A, TL081B, TL082, TL082A
TL082B, TL084, TL084A, TL084B

SLOS081I – FEBRUARY 1977 – REVISED MAY 2015

TL08xx JFET-Input Operational Amplifiers

1 Features

- Low Power Consumption: 1.4 mA/ch Typical
- Wide Common-Mode and Differential Voltage Ranges
- Low Input Bias Current: 30 pA Typical
- Low Input Offset Current: 5 pA Typical
- Output Short-Circuit Protection
- Low Total Harmonic Distortion: 0.003% Typical
- High Input Impedance: JFET Input Stage
- Latch-Up-Free Operation
- High Slew Rate: 13 V/ μ s Typical
- Common-Mode Input Voltage Range Includes V_{CC+}

2 Applications

- Tablets
- White goods
- Personal electronics
- Computers

3 Description

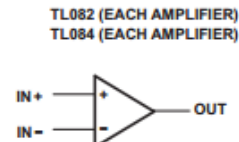
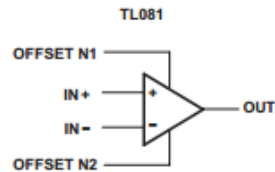
The TL08xx JFET-input operational amplifier family is designed to offer a wider selection than any previously developed operational amplifier family. Each of these JFET-input operational amplifiers incorporates well-matched, high-voltage JFET and bipolar transistors in a monolithic integrated circuit. The devices feature high slew rates, low input bias and offset currents, and low offset-voltage temperature coefficient.

Device Information⁽¹⁾

PART NUMBER	PACKAGE	BODY SIZE (NOM)
TL084xD	SOIC (14)	8.65 mm × 3.91 mm
TL08xxFK	LCCC (20)	8.89 mm × 8.89 mm
TL084xJ	CDIP (14)	19.56 mm × 6.92 mm
TL084xN	PDIP (14)	19.3 mm × 6.35 mm
TL084xNS	SO (14)	10.3 mm × 5.3 mm
TL084xPW	TSSOP (14)	5.0 mm × 4.4 mm

(1) For all available packages, see the orderable addendum at the end of the data sheet.

Schematic Symbol





September 2014

LM78XX / LM78XXA 3-Terminal 1 A Positive Voltage Regulator

Features

- Output Current up to 1 A
- Output Voltages: 5, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 24 V
- Thermal Overload Protection
- Short-Circuit Protection
- Output Transistor Safe Operating Area Protection

Description

The LM78XX series of three-terminal positive regulators is available in the TO-220 package and with several fixed output voltages, making them useful in a wide range of applications. Each type employs internal current limiting, thermal shut-down, and safe operating area protection. If adequate heat sinking is provided, they can deliver over 1 A output current. Although designed primarily as fixed-voltage regulators, these devices can be used with external components for adjustable voltages and currents.



Ordering Information⁽¹⁾

Product Number	Output Voltage Tolerance	Package	Operating Temperature	Packing Method
LM7805CT	±4%	TO-220 (Single Gauge)	-40°C to +125°C	Rail
LM7806CT				
LM7808CT				
LM7809CT				
LM7810CT				
LM7812CT				
LM7815CT				
LM7818CT				
LM7824CT				
LM7805ACT				
LM7809ACT				
LM7810ACT				
LM7812ACT				
LM7815ACT				

Note:

1. Above output voltage tolerance is available at 25°C.

LM79XX Series 3-Terminal Negative Regulators

Check for Samples: [LM7905](#), [LM7912](#), [LM7915](#)

FEATURES

- Thermal, Short Circuit and Safe Area Protection
- High Ripple Rejection
- 1.5A Output Current
- 4% Tolerance on Preset Output Voltage

DESCRIPTION

The LM79XX series of 3-terminal regulators is available with fixed output voltages of -5V, -12V, and -15V. These devices need only one external component—a compensation capacitor at the output. The LM79XX series is packaged in the TO-220 power package and is capable of supplying 1.5A of output current.

These regulators employ internal current limiting safe area protection and thermal shutdown for protection against virtually all overload conditions.

Low ground pin current of the LM79XX series allows output voltage to be easily boosted above the preset value with a resistor divider. The low quiescent current drain of these devices with a specified maximum change with line and load ensures good regulation in the voltage boosted mode.

For applications requiring other voltages, see LM137 datasheet.

Connection Diagram

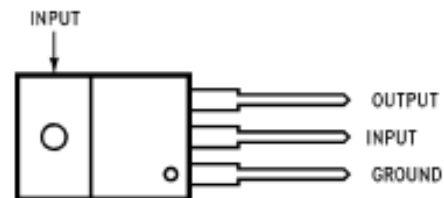
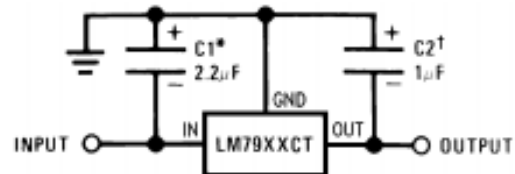


Figure 1. TO-220 Package Front View
See Package Number NDE0003B

Typical Applications



*Required if regulator is separated from filter capacitor by more than 3". For value given, capacitor must be solid tantalum. 25µF aluminum electrolytic may be substituted.

†Required for stability. For value given, capacitor must be solid tantalum. 25µF aluminum electrolytic may be substituted. Values given may be increased without limit.

For output capacitance in excess of 100µF, a high current diode from input to output (1N4001, etc.) will protect the regulator from momentary input shorts.

Figure 2. Fixed Regulator

ANEXO B. MICRO-CONTROLADORES

El micro-controlador es un dispositivo contenido en un denominado *circuito integrado*. Dicho tipo de circuitos son dispositivos almacenados en elementos más sencillos desde el punto de vista de que el usuario de estos no necesita conocer el funcionamiento del circuito contenido en dicho paquete; lo único que tiene que conocer son las entradas y salidas del circuito y trabajar con él sin conocer todo su funcionamiento a detalle. Los micro-controladores, al igual que los micro-procesadores, son pequeñas computadoras usualmente empaquetadas en dicho tipo de circuito.

Los micro-controladores son dispositivos estructuralmente complejos que permiten realizar infinidad cantidad de tareas de control. Actualmente se utilizan en todo tipo de aplicaciones desde el control de luces en los semáforos de las calles, el funcionamiento de pequeñas pantallas en relojes y celulares, control total o parcial de motores de combustión interna, aparatos electrodomésticos y periféricos de computadoras, por mencionar algunos.

A menos que la tarea del micro-controlador esté enfocada a una tarea sumamente específica, este se componen de los siguientes elementos que, como ya se mencionó, son componentes fundamentales de toda computadora:

- a) CPU (*Central Processing Unit*)
- b) Memoria RAM (*Random Access Memory*)
- c) Memoria ROM (Read Only Memory) en sus diferentes presentaciones, como EEPROM, EPROM, Flash
- d) Líneas de comunicación con el mundo exterior (Entrada y Salida) e internamente (*buses*)
- e) Módulos para realizar diferentes tareas como temporizadores, contadores, convertidores de señales analógicas a digitales (*Analog to Digital Converter*), convertidores de señales digitales a analógicas (*Digital to Analog Converter*) y para poder comunicarse con otros dispositivos similares (*USART*)

Este tipo de dispositivos tienen dos clasificaciones. Una se refiere a la forma en que sus componentes internos están interconectados (arquitectura) y la otra se refiere al nivel de complejidad que tienen las instrucciones que permiten controlarlo (complejidad en su juego de instrucciones)

Por un lado, la arquitectura se refiere a la forma en que los componentes internos del micro-controlador (que al final de cuentas es una computadora) se comunican entre sí y cómo es que estos son utilizados, y por otro, la complejidad del juego de instrucciones está directamente relacionada con el nivel de sofisticación que tenga el *CPU* y la memoria con la que cuente el dispositivo.

1. Arquitectura *Von-Neumann*

De ella se destacan ciertas cualidades especiales que la distinguen de otro tipo de arquitecturas:

- Hay un *bus* de control, de direcciones y otro que es compartido para datos e instrucciones;
- El programa y los datos se almacenan en la misma memoria (*RAM*);

- Ejecutar una instrucción conlleva a buscarla en memoria y posteriormente buscar el o los datos que funcionarán con dicha instrucción;
- Debido a lo anterior este tipo de arquitectura es lenta en cuanto a la tasa de instrucciones por minuto se refiere;
- Es una arquitectura barata de construir

2. Arquitectura *Harvard*

- Cuenta con dos memorias. Una de ellas almacena la información del programa y la otra almacenar los datos. Debido a ello esta arquitectura es más compleja que la *Von-Neumann* y es por esta razón que esta arquitectura tiene muchas ventajas sobre otras;
- Hay una simultaneidad en la búsqueda de instrucciones y sus datos, además que de esta forma el procesador puede ejecutar una instrucción mientras continua buscando la siguiente instrucción con sus datos;
- El tamaño que tienen sus instrucciones es independiente del tamaño que tienen sus datos;
- Es una arquitectura muy rápida y por ello se utiliza en aplicaciones de control que requieren de respuestas rápidas;
- Es una arquitectura poco barata de construir

3. Juego de instrucciones complejo (*CISC: Complex Instruction Set Computer*)

Se dice que un juego de instrucciones es complejo cuando este supera las 80 instrucciones y cuando estas requieren de muchos ciclos de reloj para completarse totalmente. En la gran mayoría de estos conjuntos, las instrucciones están relacionadas entre sí, es decir, para que una se realice es necesario que otras más sencillas se realicen en consecuencia (no hay independencia entre las instrucciones).

4. Juego de instrucciones reducido (*RISC: Reduced Instruction Set Computer*)

Son conjuntos de instrucciones no mayores a los 50 elementos y son sencillas estructuralmente a un nivel tan inteligente que casi todas ellas tardan un ciclo de reloj en ejecutarse. A diferencia de las instrucciones de una arquitectura *CISC* las instrucciones *RISC* usualmente no tienen una dependencia entre sí, lo que hace que el *software* y el *hardware* sean sencillos.