

094011

UAM-I
✓CBI

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA ELECTRICA.

AREA DE INGENIERIA BIOMEDICA

UAM IZTAPALAPA

✓
DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN LABORATORIO
PILOTO PARA REGISTRO EXTRACELULAR EN LA
CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA Y EL CONEJO

✓
Q.F.B FRANCISCO JOSE HEREDIA LOPEZ
TESIS DE MAESTRIA EN INGENIERIA BIOMEDICA

Director de tesis: Dr. Ismael Espinosa Espinosa.

Trabajo realizado en el Laboratorio de Cibernética de la
Fac. de Ciencias, U.N.A.M.

FEBRERO DE 1990 ✓

Al Dr. Ismael Espinosa E., coordinador del Laboratorio de Cibernética de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., maestro y amigo, con agradecimiento por sus enseñanzas, consejos y apoyo, durante mis estudios y en la realización de este trabajo

Con agradecimiento al M. en C. Victor Carbajal C., por todo su apoyo durante mis estudios y en los inicios de este trabajo.

Al M. en C. José Luis Contreras, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción de la U.A.M.I., por facilitarnos su Laboratorio para poder iniciar la parte experimental de este trabajo, gracias.

Al Dr. Francisco Cervantes Pérez, coordinador del Laboratorio de Bioingeniería del Instituto de Fisiología Celular, las más sinceras gracias, por facilitarnos las instalaciones y equipo de su Laboratorio para la continuación y conclusión de los experimentos del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Antonieta Labín del Laboratorio del Dr. René Drucker del Instituto de Fisiología Celular, muchas gracias por sus consejos y sugerencias, sin los cuales no me hubiera sido posible concluir el presente trabajo en un tiempo tan corto.

Al Médico Cirujano Alfonso Martínez del Departamento de Ingeniería Biomédica de la U.A.M.I., por facilitarnos parte de su equipo en los inicios de la parte experimental de este trabajo.

Al Dr. Carlos García Moréira y al M. en C. Jaime García del Laboratorio de Biofísica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., por el equipo facilitado y sus útiles sugerencias, muchas gracias.

Al M. en C. Justino Guzmán y al Fis. Andrés Porta del laboratorio de acústica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., gracias por el equipo facilitado.

Al Biólogo Jorge Flores y al Médico Cirujano Sergio Alvarez del Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M., con agradecimiento por su ayuda y sugerencias durante la realización de la parte experimental de este trabajo.

Al Dr. Raúl Aguilar del Laboratorio de Cronobiología del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M, por su ayuda durante los experimentos, gracias.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de cibernética, por su ayuda y apoyo, gracias

A los integrantes del Laboratorio de Bioingeniería del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M., por su ayuda gracias, en especial a:

Biol. Mayra García Ruíz
Ing. Sergio Quintana Thierry

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Instrumentación del Departamento de Ingeniería Biomédica de la U.A.M.I., por el apoyo y ayuda prestados:

Lic. Miguel Angel Roque.
Ing. Verónica Hernández.

CONTENIDO

1. - INTRODUCCION	1
1.1.- ANATOMIA FUNCIONAL DE LAS NEURONAS	2
1.2.- POTENCIALES DE MEMBRANA	3
1.3.- POTENCIAL DE ACCION E IMPULSO NERVIOSO	3
1.4.- REGISTRO DE LOS POTENCIALES DE ACCION	4
2. - REGISTRO DE ACTIVIDAD NEURONAL EXTRACELULAR	6
2.1.- ANESTESICOS Y ANALGESICOS	7
2.1.1.- FIJACION DEL ANIMAL	7
2.1.2.- MICROMANIPULADORES DEL ELECTRODO	8
2.2.- AMPLIFICADORES Y MICROELECTRODOS	8
2.2.1.- SELECCION DEL AMPLIFICADOR	9
2.2.2.- MICROELECTRODOS	10
2.2.2.1.- SELECCION DE MICROELECTRODOS	10
2.2.2.2.- PROPIEDADES ELECTRICAS	10
2.2.2.3.- ELECTRODOS DE TUNGSTENO	11
2.2.2.4.- FABRICACION DE ELECTRODOS DE TUNGSTENO	11
2.2.2.5.- AISLACION	12
2.2.2.6.- PRUEBA DE LA AISLACION	12
2.3.- DESPLEGADO Y ANALISIS DE LOS POTENCIALES DE ACCION	12
2.3.1.- PROCESAMIENTO DE LOS POTENCIALES	13
2.3.2.- DESPLEGADO DE LOS POTENCIALES DURANTE EL EXPERIMENTO	13
2.3.3.- ANALISIS DE LOS POTENCIALES DE ACCION	14
3. - METODOS	15
3.1.- FABRICACION DE LOS MICROELECTRODOS	15
3.1.1.- AFILADO DE LOS ALAMBRES DE TUNGSTENO	15
3.1.2.- BARNIZADO DE LOS MICROELECTRODOS	17
3.1.3.- PRUEBA DE LOS MICROELECTRODOS	17

3.2.- DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS FILTROS Y AMPLIFICADORES DE SEÑAL	18
3.3.- ACONDICIONAMIENTO DEL LOCAL PARA EL LABORATORIO	18
3.4.- REALIZACION DE LOS EXPERIMENTOS DE REGISTRO EXTRACELULAR	18
3.5.- ALMACENAMIENTO DE LOS POTENCIALES EN COMPUTADORES PC COMPATIBLES	22
4. - RESULTADOS	23
4.1 De los microelectrodos	23
4.2 Del puente medidor de impedancias	23
4.3 Del amplificador de potenciales	23
4.4 De la tarjeta de adquisición	24
4.5 De los experimentos mismos	24
4.6 PROTOCOLOS	28
4.6.1 Experimento 1	28
4.6.2 Experimento 2	30
4.6.3 Experimento 3	32
4.6.4 Experimento 4	33
4.6.5 Experimento 5	36
4.6.6 Experimento 6	38
4.6.7 Experimento 7	39
4.6.8 Experimento 8	40
4.6.9 Experimento 9	42
4.6.10 Experimento 10	44
FIGURA 1	46
FIGURA 2	47
FIGURA 3	48
FIGURA 4	49
FIGURA 5	50
5. -DISCUSION Y CONCLUSIONES	51

6. - APENDICE A: FUENTE DE VOLTAJE AC REGULABLE	54
7. - APENDICE B: PUENTE MEDIDOR DE IMPEDANCIAS PARA MICROELECTRODOS	57
8. - APENDICE C: MONITOR DE AUDIO	61
9. - APENDICE D: AMPLIFICADOR Y FILTRO PARA REGISTRO EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE ACCION	64
10. - APENDICE E: TARJETA DE ADQUISICION DE 8 BITS	71
11. - APENDICE F: LISTADOS DE LOS PROGRAMAS UTILIZADOS	85
TEST8.PAS	86
CAPTURA.PAS	90
ESCRIBE.PAS	95
12. - APENDICE G: FUENTE DE ALIMENTACION DEL AMPLIFICADOR DE POTENCIALES	99
13. - BIBLIOGRAFIA	101

1. - INTRODUCCION.

Dentro de la investigación biomédica el área de la neurofisiología se ocupa del estudio del funcionamiento del sistema nervioso y de cómo éste recibe y transmite información de y hacia su entorno. Este intercambio de información es realizado por células especializadas que reciben y procesan esta información, estas células, las neuronas, se comunican entre sí por medio de impulsos eléctricos, los potenciales de acción, y en trenes de ellos se encuentra codificada la información transmitida.

Estos potenciales de acción fuera de las neuronas o extracelulares son posibles de registrar en seres vivos adecuadamente preparados para ello en montajes estereotáxicos y condiciones de sedación adecuadas, utilizando para ello microelectrodos de metal o de vidrio, filtros y amplificadores de señales, pudiéndose observar la actividad neuronal en osciloscopios de aplicación general.

Las neuronas, para poder realizar diversas tareas, trabajan en grupos que son capaces de llevar a cabo funciones específicas cuyo grado de complejidad puede ser muy alto como es el caso de reconocimiento de patrones complejos de audio, video, movimiento coordinado de miembros etc.

El cómo estos grupos de neuronas se forman y se comunican entre sí, como interactúan con su entorno y bajo que normas y leyes, es motivo de estudios constantes y profundos por parte de las neurociencias, y para ello es necesario poder detectar y almacenar los impulsos nerviosos generados por los grupos neuronales en estudio, esto es, llevar a cabo registros extracelulares de los potenciales de acción. Este trabajo experimental se realiza en los cerebros de animales tales como ratas, gatos, monos, etc; lo cual permite adquirir un conocimiento más profundo de cómo están realizadas en un cerebro viviente las conexiones interneuronales que le permiten llevar a cabo tareas tan variadas y complejas con esa asombrosa precisión que caracteriza a todo cerebro biológico sano.

El presente trabajo consistió en implementar los elementos e instrumentos necesarios para poder montar un pequeño laboratorio piloto donde poder realizar registro de actividad extracelular multiunitaria. El trabajo se dividió en las siguientes etapas:

- 1) Fabricación de los microelectrodos.
- 2) Diseño y construcción de los filtros y amplificadores de señal.

- 3) Acondicionamiento eléctrico del local para el laboratorio.
- 4) Realización de los experimentos de registro extracelular en cerebros de rata y sapo.
- 5) Almacenamiento en computadores PC compatibles de los potenciales registrados .

1.1 ANATOMIA FUNCIONAL DE LAS NEURONAS.

La unidad básica del sistema nervioso es la célula nerviosa, la neurona, (existe otro grupo de células nerviosas, las neuroglías, las cuales tienen a su cargo el mantener el metabolismo de las neuronas, brindarles soporte y probablemente participen en mecanismos de defensa de las neuronas.).

Estructuralmente las neuronas pueden dividirse en tres partes, cada una de las cuales está asociada con determinada función: (1) las dendritas y el cuerpo celular, (2) el axón, y (3) los terminales del axón.

(1) Las dendritas forman una serie de prominencias celulares considerablemente ramificadas, conectadas al cuerpo celular y pueden considerarse como una extensión de la membrana del cuerpo celular. Las dendritas y el cuerpo neuronal constituyen el sitio de las uniones especializadas con otras neuronas mediante las cuales se comunican las señales a la célula. El cuerpo neuronal contiene el núcleo celular así como organelos comprometidos con mantener el metabolismo celular.

(2) La fibra nerviosa o axón es una estructura tubular limitada por una membrana celular característica y llena de líquido intracelular llamado axoplasma; constituye una prolongación que se extiende desde el cuerpo celular y es, por lo general, considerablemente más larga que las dendritas, está recubierta por una vaina aislante de material lipídico llamada vaina de Schwann o vaina de mielina.

(3) La primera parte del axón junto con la del cuerpo celular al cual está unido forma el denominado segmento inicial. A lo largo del axón pueden surgir ramas denominadas colaterales y en su extremo puede tener gran cantidad de ramificaciones denominados terminales axónicos cuya última parte se ensancha formando el llamado botón sináptico, sitio donde tiene lugar la "unión" o sinapsis con otra neurona.

La gran mayoría de las señales eléctricas nerviosas se transmiten por fibras nerviosas o axones, ya sea en cerebro, médula espinal o nervios periféricos.

1.2 POTENCIALES DE MEMBRANA.

A través de la membrana de todas las fibras nerviosas se encuentra un potencial eléctrico de aproximadamente -70 mv, llamado potencial de reposo de membrana. Lo causan las diferencias de concentración iónica a través de la membrana celular especialmente en lo referente a las concentraciones del sodio y el potasio. De manera específica, la concentración de iones potasio (K^+) en el interior de la membrana es muy elevada en comparación con su concentración en el exterior y en el exterior de la membrana nerviosa la concentración de iones potasio (K^+) es baja, no siendo así para la concentración de iones sodio (Na^+), la cual es muy elevada. La llamada bomba K-Na genera esta diferencia de potencial en ambos lados de la membrana celular, el potencial de reposo de membrana.

1.3 POTENCIAL DE ACCION E IMPULSO NERVIOSO.

Cuando la fibra nerviosa se estimula apropiadamente desde el potencial de reposo de (- 70 mV) hasta el potencial de umbral (-50 mV), los conductos del sodio se vuelven muy permeables y los iones sodio pasan en ese momento en grandes cantidades al interior del axón haciendo que el potencial de membrana se vuelva súbitamente positivo, aproximadamente +40 mV, manteniéndose esta condición por poco más de un milisegundo, y posteriormente los iones sodio en exceso son expulsados hacia el exterior de la membrana restableciéndose la electronegatividad en el interior de ésta. Este cambio del potencial de membrana se conoce como potencial de acción o impulso nervioso, el cual se extiende a todo lo largo de la fibra nerviosa transmitiendo información.

El mecanismo iónico del potencial de acción puede resumirse como sigue: En condiciones de reposo la conductancia de la membrana para el potasio (G_K) es mucho mayor que la conductancia para el sodio (G_{Na}). La conductancia para el sodio es inmediatamente sensible al potencial de la membrana; una vez que este ha llegado al umbral, la conductancia aumenta debido al cambio de potencial y a su vez este cambio vuelve a aumentar la conductancia; este gran aumento de G_{Na} produce el correspondiente aumento en la corriente de sodio que tiende a dominar la situación y trata de llevar rápidamente el potencial de la membrana hasta el potencial de equilibrio para el sodio (+60 mV), no logra llegar a este valor, porque al aproximarse a él, la corriente de sodio tiende a cero. Además, entra en juego un segundo mecanismo que hace que la conductancia del potasio se vuelva sensible al potencial de la membrana y entonces conforme el potencial se mueve hacia el potencial de equilibrio del sodio, la conductancia del potasio aumenta, oponiéndose al efecto de la corriente del

sodio. Mientras esto sucede aparece otro efecto, la inactivación del sodio, lo cual provoca que el potasio quede dueño de la situación y tienda a llevar el potencial de la membrana al potencial de equilibrio del potasio (-90 mV), pero con un tiempo de decaimiento mucho mayor que el tiempo de levantamiento del potencial de acción. En este descenso del potencial de membrana (hiperpolarización) se produce un sobretiro negativo y después de cierto tiempo el potencial de reposo se restablece a -70 mV.

Si se intenta provocar un segundo impulso durante el intervalo de tiempo entre el pico del primer impulso y el final del sobretiro negativo, se encuentra que el umbral de estimulación está más elevado y el nervio es relativamente refractario a estimulación adicional. Esto es debido a la combinación de la inactividad del sodio y al aumento de la G_K . En un tiempo anterior, el axón es totalmente refractario a estimulación, no es posible provocar un segundo impulso con ninguna estimulación por fuerte que esta sea. Esto es debido a que la G_N ya está activada y no puede responder para dar un segundo impulso durante los primeros 0.5 msec. El periodo refractario en los axones establece un límite superior a la frecuencia máxima de transmisión de impulsos a unos 1000 potenciales por segundo.

En los axones mielinizados los potenciales de acción se transmiten a una velocidad mayor que los axones sin cubierta de mielina. Al ser la mielina un material lipídico se comporta como un buen aislador de las corrientes de la membrana, por lo que los potenciales de acción generados solo pueden viajar saltando de una región no mielinizada (nodo de Ranvier) a otra, lo cual se traduce en una velocidad de conducción mayor.

1.4 REGISTRO DE LOS POTENCIALES DE ACCION.

Para registrar potenciales de acción es necesario el empleo de microelectrodos, los cuales suelen ser fabricados principalmente de pipetas muy delgadas de vidrio: micropipetas, llenas de una solución salina, o bien, de alambres metálicos aislados.

El registro de los potenciales de acción implica el situar el microelectrodo lo más cercanamente posible del grupo neuronal de interés ya que la amplitud de la señal registrada disminuye con la distancia. En promedio una separación de hasta treinta micras⁽⁴⁾ del grupo neuronal de interés permitirá obtener registros adecuados. Dentro del registro de potenciales de acción extracelulares existe la posibilidad de realizar registros de actividad unitaria y registros de actividad multiunitaria.

Los registros extracelulares de actividad multiunitaria permiten detectar la actividad de varias neuronas de un grupo en estudio lo cual proporciona un mayor cantidad de

información del funcionamiento como grupo de las células de la región del sistema nervioso en estudio.

También existe el registro intracelular que consiste en detectar la actividad eléctrica en el interior de una célula, este tipo de estudio permite la obtención de un mejor conocimiento de las propiedades biofísicas de las células en estudio como unidades individuales, en particular las variaciones en el potencial de la membrana y la actividad pasiva en las dendritas.

2. REGISTRO DE ACTIVIDAD NEURONAL EXTRACELULAR.

En la investigación científica, muchas respuestas a la misma pregunta se obtienen conforme los experimentos progresan, las respuestas se hacen más detalladas, precisas, y en consecuencia más informativas, tal es el caso con el registro extracelular. Hace sólo unas pocas décadas el registrar la respuesta de neuronas individuales en respuesta a estímulos específicos era algo sumamente complejo, hoy es relativamente simple.

Un conocimiento detallado es obtenible de muchas partes del sistema nervioso de los mamíferos y en consecuencia las respuestas, a las preguntas planteadas, los registros de actividad de varias neuronas en diferentes regiones del cerebro han sido importantes en el desarrollo de nuestros conocimientos de regiones particulares del cerebro, del tipo de estímulos a los cuales responde, o del papel que juegan en la ejecución de diferentes tareas. Existen, sin embargo, algunas limitaciones sobre lo que puede ser extractado de un análisis de actividad celular múltiple.

Los registros múltineuronales promedian las salidas de gran número de células. Por extensión como tales células están haciendo alguna cosa en común, se pueden detectar relaciones significativas en tales registros. Pero muchos estudios hechos a nivel de células individuales han encontrado una tremenda cantidad de especificidad en su función, y diversidad de actividad en células cercanas.

Tan frecuentemente como no, dos células vecinas pueden estar haciendo tareas enteramente diferentes, al menos con respecto a algún parámetro; y ser mutuamente inhibitorias, y en consecuencia resaltar la diferencia entre sus respuestas. Claramente cualquier registro que promedie indiscriminadamente las respuestas de dos células de ese tipo tendrá una limitada falta de significación, en comparación a un registro que relacione la actividad de cientos de miles de células vecinas. En estos casos el registro extracelular es más conveniente, ya que hay menos peligro de daño y en consecuencia de distorsión, a las células que están siendo estudiadas.

El registro extracelular multiunitario se ha convertido en los últimos años en un método simple y sensitivo para la detección de eventos electrofisiológicos en los cerebros de animales tanto despiertos y en libertad, como en animales cuidadosamente preparados e inmobilizados.

Este tipo de registro ofrece señales complejas como resultado de la captura de la actividad de varias unidades funcionales, lo cual dificulta examinar las características de cualquiera de los componentes individuales. Así, los registros extracelulares multiunitarios dan como resultados muestras de poblaciones y son una representación de la actividad neta de la muestra de neuronas estudiada.

Uno puede separar los problemas envueltos en un registro extracelular en tres tipos:

Primero, sedación y fijación del animal, y la inserción del microelectrodo en la región de interés del cerebro.

Segundo, los problemas técnicos envueltos en el registro mismo, particularmente las características del microelectrodo y del amplificador usados.

Tercero, el análisis de los trenes de potenciales de acción para poder extraer la información presente en la actividad neuronal. Consideraremos a continuación cada uno de los problemas mencionados.

2.1 ANESTESICOS Y ANALGESICOS.

Muchos experimentos de registro extracelular encuentran ciertos problemas comunes con respecto a la sedación del animal, los cuales usualmente se resuelven con el uso de diferentes agentes anestésicos. Los anestésicos pueden ser usados para (1) eliminar el dolor envuelto en la cirugía y durante el registro, por ejemplo el dolor resultante de hacer incisiones para alcanzar el cerebro y al mantener al animal en un montaje estereotáxico y (2) restringir los movimientos del animal para mantenerlo fijo en el montaje y con respecto a algún punto de referencia al equipo de experimentación. La restricción del movimiento es también requerida para prevenir movimientos del cerebro con respecto al electrodo.

(3) Aunque usualmente no es deseable en estos experimentos, la acción supresiva de algunos anestésicos sobre ciertas regiones de la corteza cerebral puede facilitar el estudio del sistema neuronal de interés. Aun cuando un anestésico puede en general resolver los problemas anteriormente planteados surge la pregunta de que tan normal se encuentra el sujeto y en consecuencia los datos obtenidos. Los anestésicos generales más comunmente usados para experimentos han sido los barbituratos, uretanos, y agentes gaseosos tales como el ether, halotano, y óxido nitroso, de estos los más importantes son los barbituratos y el oxido nitroso.

2.1.1 FIJACION DEL ANIMAL.

Uno de los problemas encontrados cuando se está registrando en estructuras profundas del cerebro y aun en registros de corteza, es la colocación del electrodo en la parte apropiada del cerebro. Un instrumento desarrollado para auxiliar en la implantación del electrodo es el estereotáxico.

El montaje en el estereotáxico consiste en mantener la cabeza del animal fija en forma rígida en un plano conocido.

valiéndose para ello de un atlas estereotáxico, el cuál consiste de secciones histológicas del cerebro en un plano estereotáxico, y localiza las varias estructuras del cerebro con respecto a coordenadas estereotáxicas.

Los sistemas convencionales de coordenadas estereotáxicas se basan en retener el meato auditivo externo y la cresta orbital inferior en un plano horizontal y esto se consigue en el estereotáxico por el uso de barras que van a los conductos auditivos y ganchos que van al rostro del animal y permiten sujetarlo en el plano deseado. De esta forma las coordenadas estereotáxicas anteriores-posteriores son medidas con referencia al plano vertical que pasa a través del eje formado por las barras en el oído y la normal al plano horizontal definido por las barras en los oídos y rostro. El sistema de coordenadas laterales puede basarse en el plano vertical que pasa por el centro del estereotáxico y la normal al plano horizontal definido por las barras de los oídos y rostro, aunque es más conveniente usar la línea media del cráneo, ya que es muy posible que una de las barras de los oídos se encuentre ligeramente más dentro que la otra. En los experimentos realizados en este trabajo se utilizó un aparato estereotáxico NARISHIGE modelo ST-7 y se consultó el atlas del cerebro de la rata de Köning y Klippel⁽²³⁾.

2.1.2 MICROMANIPULADORES DEL ELECTRODO. -

El estereotáxico no solamente mantiene al animal rígidamente en el sistema de coordenadas estereotáxicas sino que también posee un manipulador mecánico al cual puede sujetarse el microelectrodo y moverlo con precisión en varios planos. Los manipuladores mecánicos son adecuados para posicionamientos no finos del electrodo, pero para movimientos precisos hacia una zona en el cerebro o hacia células aisladas es preferible el empleo de micromanipuladores. Sin embargo es mucho más conveniente el manejo del electrodo a distancia, y no tener que tocar y posiblemente alterar la posición del ensamble del electrodo.

2.2 AMPLIFICADORES Y MICROELECTRODOS.

Aparte de la neuroquímica, el sistema nervioso se comunica con el resto del organismo por medio de potenciales de acción, que son eventos de naturaleza eléctrica y la información enviada está contenida en la frecuencia a la cual las fibras nerviosas producen sus impulsos, estos potenciales son detectados por medio del uso de microelectrodos cuyas dimensiones de puntas son del mismo

orden de magnitud que las células, esto es, micras. Los voltajes sentidos por estos electrodos son inducidos por las corrientes iónicas generadas durante los potenciales de acción, siendo estos potenciales de unos cuantos microvoltios de amplitud, ordinariamente de unas cuantas decenas a un poco mas de cien microvoltios. La amplitud del potencial sentido depende, de la distancia del electrodo a la fuente⁽⁵⁾ y de las propiedades filtrantes del sistema amplificador, así como de las características eléctricas del electrodo empleado, esto es su impedancia a la frecuencia en la cual ocurren los eventos de interés, su ancho de banda, la capacitancia parásita a tierra que presente su cubierta aisladora, etc.

2.2.1 SELECCION DEL AMPLIFICADOR. -

Dada la naturaleza de la señal a sensar, los amplificadores deben diseñarse para minimizar la degradación de la señal. Podemos asumir por el momento que el electrodo tiene una impedancia relativamente alta y compleja y que las capacitancias a tierra (C_e) y de conexión al amplificador (C_c) no afectan apreciablemente la amplitud de la señal, sobre todo esta última que para las frecuencias de interés puede considerarse como un corto circuito, entonces la señal de la neurona será atenuada por el divisor de voltaje formado por la impedancia (Z) del electrodo y la resistencia de entrada del amplificador (R_a) a menos que $R_a \gg Z$. Para evitar tal atenuación muchos preamplificadores fisiológicos tienen resistencias de entrada de 10 a 100 Mohms o mayores.

Hay otras dos formas por las cuales el amplificador puede degradar la señal neuronal: (1) por la adición de ruido extraño y (2) por filtrar algunas bandas de frecuencia de la señal reduciendo así la amplitud y la forma de la señal. El ruido producido por el amplificador puede checarse cortocircuitando sus entradas y observándolo en un osciloscopio, éste puede ser reducido a un mínimo por un diseño adecuado y filtrando las señales en el orden de las decenas y cientos de kilohertz que no están presentes en la señal de interés.

Mientras que las características de los filtros son determinadas según las necesidades de manejo de la señal, otras etapas de filtrado indeseables pueden ser introducidas por capacitancias parásitas en la entrada del amplificador.

El electrodo tiene una capacitancia distribuida a tierra a lo largo del material conductor contenido en la aislación del mismo ($C_{e.}$), y los alambres que conectan el electrodo al amplificador añaden todavía mas capacitancia ($C_{c.}$) a la del amplificador mismo ($C_{a.}$), de esta forma las capacitancias mencionadas están en paralelo y se suman, esto da como resultado un filtro pasa bajos formado por la capacitancia a tierra y la impedancia del electrodo.

Si la impedancia del electrodo es alta o la capacitancia a tierra lo es, el voltaje visto por el amplificador estará atenuado. El problema se hace mayor cuando se hace necesaria una penetración profunda, dado que la capacitancia a tierra del electrodo se hace mayor del orden de .4 a 4.5 pF por cada milímetro de inmersión⁽⁴⁾. Si la impedancia del electrodo fuera más alta, o si el amplificador y sus cables de conexión hicieran una contribución significativa de C_s , todavía se perdería mas señal. Así, es una buena razón el escoger un amplificador con baja capacitancia a tierra y mantener los cables de conexión lo más cortos posibles.

A primera vista la solución lógica al problema de las capacitancias parásitas es el empleo de un amplificador de capacitancia negativa, el cual neutraliza la capacitancia a tierra, pero la retroalimentación que produce la capacitancia negativa incrementa el ruido del amplificador degradando la relación señal-ruido; este tipo de amplificador es especialmente útil en estudios de actividad intracelular donde las capacitancias del sistema en estudio son mayores y tienen que ser cuidadosamente compensadas.

Así, una de las más simples funciones del amplificador es tomar la señal de un punto de alta impedancia (el electrodo) a un punto de más baja impedancia, la salida del amplificador. Esto asegura que las capacitancias parásitas provenientes de otras partes de la salida del sistema de monitoreo no atenuarán los componentes de alta frecuencia de la señal.

En resumen un amplificador de señales debe poseer las siguientes características: baja capacitancia de entrada, bajo nivel de ruido, y una alta impedancia de entrada.

2.2.2 MICROELECTRODOS.

2.2.2.1 SELECCION DE MICROELECTRODOS. -

Para la selección adecuada de los electrodos hay cinco criterios principales que estos deben cumplir: (1) Proveer una grabación estable por largos periodos de tiempo. (2) La relación señal ruido debe ser alta. (3) Los potenciales de neuronas solas deben estar bien aislados de las descargas de células vecinas. (4) Poder muestrear todos los tipos de células y (5) Poseer la suficiente resistencia para soportar los rigores del uso normal.

2.2.2.2 PROPIEDADES ELECTRICAS. -

Las propiedades eléctricas de los electrodos son complicadas ya que presentan una alta resistencia junto con

una capacitancia distribuida a tierra y la construcción de un circuito equivalente es sumamente complicado. Los electrodos metálicos son influenciados en varias formas impredecibles por potenciales de CD que deben ser removidos mediante un capacitor de desacoplo en el preamplificador, esto también previene que corrientes originadas en el amplificador llegen al electrodo y lo dañen. El valor del capacitor debe ser lo suficientemente grande para evitar que degrade la respuesta en baja frecuencia del amplificador.

Los microelectrodos más comunmente usados són: las micropipetas, los electrodos de platino, y los electrodos de tungsteno. Para el presente trabajo resultan de interés los electrodos de tungsteno por las razones que a continuación se mencionan:

2.2.2.3 ELECTRODOS DE TUNGSTENO. -

El tungsteno es un metal duro, que produce microelectrodos fuertes que dan registros estables por largo tiempo. Aun cuando exhibe ruido en cierta cantidad, este se encuentra patente en las bajas frecuencias y puede ser facilmente removido con un filtro pasa altos sin pérdida de la señal, por lo que resulta útil para el registro de señales de alta frecuencia provenientes del sistema nervioso de los mamíferos. Las propiedades de los electrodos son aún pobremente entendidas, pero se sabe que variaciones en los parámetros de los electrodos cambian la muestra grabada; la experiencia común podría sugerir que electrodos grandes no son útiles para buenos registros de células pequeñas, pero los muy pequeños no realizan muy bien lo anterior tampoco. Así que hay una configuración óptima pero que aún no ha sido especificada cuantitativamente.

Aún cuando un grán número de microelectrodos son obtenibles en forma comercial, són muy caros, y como cada situación de registro presenta problemas específicos es probablemente mas deseable la fabricación de electrodos por uno mismo.

2.2.2.4 FABRICACION DE ELECTRODOS DE TUNGSTENO. -

Los electrodos pueden fabricarse a partir de alambre de tungsteno de 120 μ de diámetro cortado en piezas rectas de la longitud deseada, unas dos pulgadas usualmente. Este se afila sumergiéndolo en un baño electrolítico en una solución concentrada de Nitrito de Potasio (KNO_2) y pasándole una corriente alterna de 60 Hz entre el alambre y un electrodo de grafito. Usualmente, una solución de concentración 20 M y una corriente de amplitud de 4 V rms dará resultados satisfactorios. Una solución demasiado diluida o un voltaje muy bajo provocará la formación de un

precipitado café en el alambre; por el contrario una solución demasiado concentrada causará cristalización del nitrito sobre el alambre produciendo muescas y puntas onduladas.

Con el fin de lograr un afilado correcto el alambre debe ser metido y sacado de la solución en forma constante hasta lograr una punta de forma adecuada. Mientras que un electrodo puede ser usado con solo una afilación sencilla, se les puede aumentar su resistencia mecánica por la formación de una segunda sección cónica, esta puede producirse por sumergir la punta del electrodo en una solución 15 M de KNO_2 y aplicarle un corriente de 2 V rms a 60 Hz sin mover el electrodo, este voltaje es especialmente crítico y su valor adecuado se determina experimentalmente, un voltaje muy bajo causa la formación de una segunda etapa con lados cóncavos, mientras que si es muy elevado produciría una segunda etapa corta con lados convexos. Los electrodos con esta forma como de punta de lápiz usualmente penetrarán la duramadre de la rata sin dañarse y todavía podrán registrar unidades aisladas⁽⁶⁾.

2.2.2.5 AISLACION. -

Los alambres afilados son aislados con un barniz aislante, el electrodo es cubierto sumergiéndolo con la punta hacia arriba en el recipiente que contiene el barniz aislante hasta cubrirlo por completo. El siguiente paso es sacar el electrodo lentamente del barniz con el fin de evitar la formación de burbujas y se le deja secar.

2.2.2.6 PRUEBA DE LA AISLACION. -

Después que se le ha dejado secar, de preferencia toda una noche, el chequeo de la aislación para detectar fugas puede realizarse sumergiendo el electrodo en una solución salina fisiológica y aplicarle brevemente 4.5 V cd, con el negativo al electrodo, se formarán burbujas sobre la zona descubierta del electrodo y esta zona puede ser medida bajo un microscopio. Si se detectan fugas, el electrodo puede ser aislado nuevamente o descartado. Según reportes de varios trabajos, la longitud expuesta de la punta del electrodo debe ser de cerca de 15 a 35 μ .

2.3 DESPLEGADO Y ANALISIS DE LOS POTENCIALES DE ACCION.

La etapa final del proceso de registro de potenciales de acción envuelve la mejor forma de extraer la información

contenida en los trenes de impulsos, tres aspectos de este problema serán considerados; (A) El procesamiento inicial de los potenciales a la salida de los electrodos, (B) El despliegado de los potenciales en el momento mismo del experimento con el fin de poder estudiar la naturaleza de la respuesta de las células a un estímulo en particular, y (C) El análisis de los datos en una forma más detallada, lo cual puede ser hecho durante el experimento o un tiempo después con el fin de extraer la mayor cantidad de información posible de la actividad neuronal.

2.3.1 PROCESAMIENTO DE LOS POTENCIALES

La grabación de una forma de onda verdadera de un potencial de acción impone grandes requerimientos en los microelectrodos, amplificadores, y equipo de almacenamiento de la información, ya que numerosas distorsiones pueden ocurrir debido a las características del electrodo mismo, a las vías de conducción entre la neurona y el electrodo o del equipo de almacenamiento del sistema. Ahora bien en la grabación extracelular puede haber mayor interés en la ocurrencia o no, de uno, todos, o ninguno de los potenciales de acción de las células en estudio lo cual no representa un serio problema en cuanto a mantener la fidelidad de la señal o bien, el interés principal puede estar en hacer un estudio con el fin de poder distinguir entre eventos provenientes de cuerpos celulares de los provenientes de fibras, así como distinguir las ligeras diferencias entre los potenciales de células vecinas.

Una etapa posterior en el tratamiento de la señal es el de aumentar la relación señal-ruido por medio de la eliminación o filtrado de las señales que no son de interés: aterrizando al animal y el equipo y utilizando varias etapas de filtros pasa bajos y pasa altos con el fin de eliminar más fuentes de ruido y uno puede durante la grabación variar el paso de banda con el fin de optimizar la relación señal-ruido de la respuesta de una célula en particular.

2.3.2 DESPLEGADO DE LOS POTENCIALES DURANTE EL EXPERIMENTO

Un auxiliar útil durante el proceso experimental es el empleo de un monitor de audio que proporcione una indicación auditiva de la actividad neuronal en estudio, ya que con él es posible seguir la actividad de grupos celulares para aislarlos al presentar estas diferencias en sus trenes de potenciales de acción, diferencias que pueden ser detectadas auditivamente con cierta claridad. De hecho es mucho más fácil discriminar en forma auditiva cambios en

los patrones de disparos de las células como consecuencia de un estímulo o inhibición.

Por otra parte, no menos importante es el uso de un osciloscopio con el fin de poder visualizar los trenes de potenciales de acción, de esta forma uno puede juzgar la calidad del registro, y ajustar mejor los circuitos de filtrado con el fin de obtener un registro de la mejor calidad posible.

2.3.3 ANALISIS DE LOS POTENCIALES DE ACCION

Los potenciales de acción son portadores de información del sistema nervioso, en teoría esta información puede estar almacenada ya sea en un código analógico o uno digital; así, el número total de picos para un periodo de tiempo dado puede ser considerado como el portador de cierta cantidad de información en un sistema de tipo analógico. Alternativamente, el mensaje puede estar codificado por el tren de potenciales de acción y los espacios entre ellos en un código comparable al binario con una base de tiempo de 1 ms. Si la información fuera transmitida en este último sistema uno tendría que conservar los patrones originales de tiempo de los datos así como el analizar sus relaciones temporales, sin embargo, los estudios fisiológicos indican que los trenes de impulsos llevan la información en forma analógica y en consecuencia uno puede razonablemente sumar los números de picos sobre un intervalo de tiempo, o a través del mismo intervalo de tiempo con presentaciones repetidas de un mismo estímulo y comprender que información está transmitiendo la neurona.

Para un análisis completo de los potenciales registrados, éstos deben ser almacenados en alguna forma.

Para estudios mas elaborados es necesario almacenar la información en medios de grán capacidad como es el caso de cintas magnéticas, cintas de video, o bién directamente a la computadora.

3. METODOS

El presente trabajo consistió en implementar los elementos e instrumentos necesarios para poder montar un pequeño laboratorio piloto donde poder realizar registro de actividad extracelular multiunitaria. El trabajo se dividió en las siguientes etapas:

- 1) Fabricación de los microelectrodos.
- 2) Diseño y construcción de los filtros y amplificadores de señal.
- 3) Acondicionamiento eléctrico del local para el laboratorio.
- 4) Realización de los experimentos de registro extracelular en el cerebro de la rata y el sapo.
- 5) Almacenamiento en computadores PC compatibles de los potenciales registrados.

3.1 FABRICACION DE LOS MICROELECTRODOS.

Esta etapa consiste básicamente en tres pasos:

- I) Afilado de los alambres de tungsteno.
- II) Barnizado de los alambres de tungsteno.
- III) Medición de la impedancia de los microelectrodos.

3.1.1 Afilado de los alambres de tungsteno. -

Para poder realizarla se montó una pequeña estación que consiste en un mecanismo que permite sostener el alambre de tungsteno (con el cuál se fabrica el electrodo) así como sumergirlo y extraerlo de un baño electroquímico. Este mecanismo se armó de la siguiente forma:

En un soporte universál de laboratorio provisto de dos juegos de pinzas para bureta, se sujetó en la pinza superior con su émbolo hacia abajo un jeringa de vidrio de 10ml unida por el conector de la aguja mediante una manguera plástica al conector de aguja de una segunda jeringa de 5ml

llenándose totalmente esta unión con agua o aceite de manera que se obtiene un sencillo mecanismo hidráulico con el cuál es posible mover el émbolo de la jeringa de 10ml extrayendo o metiendo el émbolo de la segunda jeringa.

En el extremo libre del émbolo de la primera jeringa se sujetó el conector de aguja obtenido de una tercera jeringa de plástico y a este conector se sujetó un aguja del número 22 con la punta previamente cortada, esta aguja sirve de soporte y conexión eléctrica para el alambre de tungsteno el cuál se mantiene fijo en el interior de la aguja haciéndole un pequeño doblé por uno de sus extremos e introduciendo este por el orificio de la aguja.

En la pinza inferior se sujetó un pequeña cubeta de vidrio de la usadas en espectrofotometría a la cuál se le hizo una pequeña perforación en el fondo de un diámetro lo suficiente para poder atravesar por él un cilindro de grafito de 2cm de longitud obtenido de una pila "seca" comercial tamaño D, finalmente esta parte es perfectamente sellada con plastilina epóxica.

La reacción de electrólisis necesaria para poder afilar los alambres de tungsteno y obtener los microelectrodos requiere una pequeña fuente de CA ajustable de 1.5 a 8 V ac, con una corriente máxima de 100 mA aproximadamente. Esta fuente se realizó con un transformador reductor comercial y un sencillo control de amplitud de fase a base de un triác, el diagrama eléctrico y una descripción del principio de operación de esta fuente se encuentran en el apéndice A.

El proceso de afilado se realiza básicamente de la siguiente forma:

Un alambre de tungsteno es sujetado al arreglo que permite controlar su altura, y la cubeta es llenada con solución saturada de Nitrito de Potasio hasta 1cm antes de su borde, la fuente de CA es conectada al electrodo de grafito de la cubeta y al cuerpo de la aguja que sostiene al alambre de tungsteno.

Se ajusta la salida de la fuente a su voltaje mínimo y se sumerge aproximadamente 1mm del alambre en la solución y se aumenta el voltaje de la fuente (a unos 2.5 V AC) hasta obtener un burbujeo apenas perceptible alrededor del alambre y se le deja en esta posición. Al cabo de un tiempo (de 3 a 5 minutos) el burbujeo desaparece como consecuencia de la reacción de oxidación que ocurre sobre el extremo del electrodo el cuál es desgastado a una forma cónica que puede observarse con un microscopio con un objetivo de 10x.

Este extremo cónico es afilado sumerjiendolo y sacándolo de la solución por un tiempo de 20 minutos. Finalmente para obtener la forma como de lápiz, esto es la segunda porción cónica una parte de unas 15 a 30 μ de longitud del alambre afilado es mantenido dentro de la solución y con un voltaje de aproximadamente la mitad del usado para la afilación, hasta que la punta sea nuevamente cortada. Finalmente el

alambre afilado es lavado con agua corriente y puesto a secar.

3.1.2 Barnizado de los microelectrodos. -

Para poder realizarla se sujetó en un soporte universal provisto de una pinza para bureta un tubo de ensaye de unos 25 ml. A un trozo de alambre acerado de unos 50 cm de longitud tomado de un gancho de ropa se le hace a unos 8cm de un extremo un dobléz en forma de U en cuyo extremo se le sujeta el conector de aguja de una jeringa de plástico y se sujeta a este conector una aguja del número 22 con la punta cortada.

El proceso se realiza de la siguiente forma: se llena el tubo de ensaye con unos 15 ml de barníz aislante "BASA No.36". Se toma un electrodo y se introduce por el extremo no afilado al canal de la aguja cuidando de no golpearlo para no dañar la punta. Tomando el conjunto que soporta el electrodo se sumerje en el esmalte, este paso debe de realizarse con la ayuda de un microscopio y se saca lentamente para evitar la formación de burbujas en el cuerpo del electrodo, de esta forma solamente unas cuantas micras de la punta del electrodo permanecen sin aislar y el resto de él es completamente aislado. Finalmente se dejan secar los microelectrodos por 24 horas antes de probarlos.

3.1.3 Prueba de los microelectrodos. -

El funcionamiento de los microelectrodos es evaluado mediante la determinación de su impedancia en un circuito puente de Wheatstone, excitado con una onda cuadrada a 1 Khz, de 1V de amplitud, el diagrama eléctrico y una descripción del funcionamiento de este circuito se encuentran impresos en el apéndice B. En la estación de afilación con la celda llena de solución fisiológica, el puente es conectado a la aguja que sujeta el microelectrodo y al electrodo de grafito; se enciende el puente y se conecta a un multímetro digital en la escala de mV y se procede a calibrarlo con un resistencia de 12 Mohm manipulando el control de calibración y el control con el cuadrante de las lecturas de impedancia en la posición de 2 Mohm, hasta que el multímetro indique ceros. La determinación de la impedancia se hace de la siguiente manera: el microelectrodo es sujetado nuevamente a la aguja porta electrodos y sumergido en la solución fisiológica, se ajusta el control con el cuadrante que contiene grabadas las impedancias hasta que la lectura del multímetro sea cero, con lo cuál el puente se encuentra balanceado y la impedancia del microelectrodo es indicada en forma muy

aproximada por la lectura en el cuadrante del botón de ajuste, por sumarle una constante de 10 Mohms.

3.2 DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS FILTROS Y AMPLIFICADORES DE SEÑAL.

Comprende básicamente el diseño de un amplificador para las señales nerviosas que consiste de: un preamplificador de instrumentación acoplado capacitivamente que cuenta a su salida con filtros de frecuencias de corte seleccionables y un par de amplificadores de ganancia ajustable, un amplificador (monitor) de audio.

El audio amplificador.- Es construido con el IC LM380 que produce una potencia de salida de audio de aproximadamente 2W rms, con lo cuál es posible monitorear en forma audible la actividad neuronal que esta siendo captada por el microelectrodo y amplificada por el amplificador de señales nerviosas, el diagrama eléctrico y una explicación del funcionamiento de este amplificador se encuentran impresos en el apéndice C.

El amplificador para los potenciales de acción.- Fue diseñado alrededor de circuitos integrados que contienen amplificadores operacionales con entradas J-FET con lo cuál este amplificador presenta una muy alta impedancia de entrada así como características tales como: bajo ruido, baja distorsión armónica, baja corriente de polarización y desbalance en la entrada, con lo cuál se consigue poder diseñar un amplificador muy adecuado a las necesidades del registro extracelular multiunitario. El diagrama eléctrico de este circuito así como una descripción de sus partes y características se encuentran impresos en el apéndice D.

3.3 ACONDICIONAMIENTO LOCAL PARA EL LABORATORIO.

Básicamente, este consiste en disponer de una mesa donde montar el estereotáxico firmemente de manera que quede aislado de la tierra física y con espacio suficiente para poder disponer en forma accesible todo el instrumental quirúrgico y anestésicos, así como también para poder montar y manipular libremente el microscopio de disección.

Es necesario contar con fuentes de iluminación del tipo incandescente para evitar la interferencia generada por los balastos de las luces fluorescentes, y una instalación eléctrica que cuente con tierra física en correcto funcionamiento.

Es importante también que el local se encuentre en la planta baja o sótanos del edificio para lograr una mayor aislación a ruidos externos. También pudiera ser necesario el empleo de una jaula Faraday conectada a tierra para cubrir todo el campo de trabajo para evitar que señales parásitas de radiofrecuencia interfieran con las señales a registrar.

3.4 REALIZACION DE LOS EXPERIMENTOS DE REGISTRO EXTRACELULAR.

Para llevarlos a cabo se siguen una serie de pasos que son los siguientes:

Preparación de la zona de cirugía.- Ello incluye el:

- a) fijar el estereotáxico a emplear y aislarlo de la tierra física y colocarlo en sus coordenadas cero.
- b) fijar en el estereotáxico la torre con el portaelectrodo a emplear, en este caso se fijó al brazo móvil de la torre una aguja hipodérmica con conector plástico del No.22 que sirve como portaelectrodo y aislador para el electrodo del estereotáxico.
- c) fijación del microscopio de cirugía de acuerdo a la zona de interés.
- e) fijar la lámpara incandescente de iluminación.

Preparación del instrumental quirúrgico.- En ella se dispone en la mesa de cirugía de:

- a) una máquina de afeitar para rapar la zona de la cirugía.
- b) bisturíes (dos).
- c) jeringas y agujas hipodérmicas (unas seis).
- d) un taladro para odontólogo con fresas de 1/32 de pulgada de diámetro.
- e) solución fisiológica salina (un litro).
- f) gasas.

Preparación de los anestésicos.- Esto consiste en preparar la dosis de anestésico necesaria de acuerdo al peso de la rata a utilizar en el experimento, en los experimentos realizados se empleó Anestesál (Sulfato de Atropina) cuya dosis es de 35mg/Kg y Uretano cuya dosis es de 1.25gr/Kg, también se utiliza atropina con el fin de controlar las secreciones en el tracto respiratorio del animal debido a que este por el anestésico pierde el control de las glándulas correspondientes. También es recomendable el uso de xilocaina para aplicarla en la zona de la cirugía con el fin de disminuir la respuesta al dolor.

Preparación del equipo de registro y captura de datos.-
Esto incluye:

a) colocar cerca de la mesa de cirugía una fuente bipolar de ± 12 V a 1 o 2 A con bajo voltaje de rizo, menos de 1 mV, para alimentar el amplificador de potenciales.

b) un osciloscopio de dos canales de 15 Mhz, donde uno de los canales es conectado a una de las salidas del amplificador de potenciales esto con el fin de poder monitorear visualmente las señales registradas.

c) el amplificador de potenciales a emplear colocarlo lo mas cerca posible de la mesa de cirugía con el fin de poderlo conectar al portaelectrodo con cables monopolares de la mínima longitud posible, esto con el fin de disminuir al máximo capacitancias parásitas así como el de minimizar la susceptibilidad de la conexión a ruidos externos.

d) conectar el amplificador de audio a su alimentación y su entrada a la otra salida libre del amplificador de potenciales, para de esta manera poder monitorear en forma audible la actividad neuronal de la zona en estudio.

e) instalar la tarjeta de adquisición de datos en la computadora PC compatible a emplear, conectar la entrada de la tarjeta a la misma salida del amplificador de potenciales empleada para monitorear visualmente, y la salida de la tarjeta al otro canal del osciloscopio.

Todo el equipo a emplear deberá conectarse y dejarse estabilizar por lo menos treinta minutos antes de emplearlo.

Preparación de la rata.- Se preferirán para los experimentos las ratas hembra ya que son más dociles y fáciles de manejar, procurando utilizar ratas de peso de unos 200 gr mínimo, ya que en ratas mas pequeñas es mas difícil poder identificar y situar las zonas de interés de estudio. Para manejar la rata se deberá tomarla por el cuerpo nunca por el cuello ya que esto provocará que agreda, de preferencia utilizar guantes para ello. Se determina el peso de la rata, se le administra la dosis de anestésico calculada por via intraperitoneal y se le regresa a su jaula hasta que el anestésico surta efecto.

El nivel de relajación puede estimarse por medio del reflejo doloroso inducido en una de las patas del animal por presionarle con los dedos y observar si existe respuesta a ello, esto es intento del animal de retirar el miembro bajo presión; si es así es conveniente esperar un poco mas de tiempo antes de intentar el montaje en el estereotáxico.

Montaje en el estereotáxico.- A la rata ya totalmente anestesiada se le rapa totalmente el cráneo y es montada en el estereotáxico según la técnica ya descrita en la sección de registro extracelular y para el presente trabajo se situaron las coordenadas estereotáxicas en la región de la sustancia negra compacta, por ser de alta actividad espontanea. Una vez fija se procede a abrir el cuero

cabelludo con el bisturí, practicando una incisión longitudinal la cual se inicia aproximadamente un centímetro por delante de las barras óticas y se termina unos dos centímetros por detrás de estas últimas, esto con el fin de lograr una herida quirúrgica amplia y que permita situar con facilidad la región de interés, así como el de poder realizar el trépano sin interferencias por parte de los tejidos circundantes; seguidamente se separan las pocas capas de músculo de la zona cortando con el bisturí, dejando al descubierto el periostio, el cual es abierto y desprendido del hueso cortando con el bisturí y hacia los lados con el fin de dejar perfectamente despejado el cráneo, en esta etapa de la cirugía es común un sangrado mayor que en el paso anterior por lo que es conveniente esperar un poco a que se detengan las hemorragias o bien cauterizar la zona. Seguidamente con ayuda de la torre portaelectrodo se marca sobre el cráneo el punto en el cuál se hará la trepanación.

Se retira la torre y se procede bajo el microscopio de disección a perforar en el cráneo una ventana de 3 por 4 mm con el taladro de dentista utilizando para ello una fresa dental de 1/32 de pulgada de diámetro y cuidando de no dañar las meninges. Seguidamente se lava la zona de cirugía con solución fisiológica y se verifica que en las meninges descubiertas no se aprecien vasos sanguíneos grandes, de ser así será necesario desplazarse un poco con el fin de dar con una zona adecuada; se procede a abrir las meninges con una aguja hipodérmica cuya punta ha sido previamente doblada para darle forma de gancho, se sujetan las meninges con este, en la zona donde el microelectrodo va a ser introducido y se tira hacia arriba con el fin de provocar la ruptura de las meninges en forma tal que se separen hacia los lados en forma de colgajos triangulares. Se recomienda el abrir únicamente en la zona de introducción con el fin de evitar cambios muy bruscos en la presión intracraneana lo cual provocaría que el cerebro se comprimiera y se dañara en forma masiva. Deberá verificarse el que no se haya provocado daño a la corteza cerebral lavando el área con solución fisiológica y observando al microscopio.

Posicionamiento del electrodo.- El microelectrodo a utilizar es fijado en el portaelectrodo de la torre y ésta es situada nuevamente en las coordenadas de interés y el conjunto es conectado al amplificador de potenciales. Se procede ahora a introducir el microelectrodo al cerebro haciéndolo avanzar lentamente en la zona de estudio. Se esperan unos minutos en ese punto con el fin de que las neuronas de la región se reactiven ya que estas como parte de un mecanismo de defensa se inhiben debido al manipuleo de la zona en estudio. Si todo el experimento es realizado adecuadamente es entonces posible el empezar a registrar actividad neuronal.

3.5 ALMACENAMIENTO EN COMPUTADORES PC COMPATIBLES DE LOS POTENCIALES REGISTRADOS .

Esto es realizado por medio de una tarjeta de adquisición de datos diseñada en torno a un par de convertidores analógico-digital y digital-analógico de 8 bits ADC0804 y DAC0830 respectivamente, con lo cual es posible tomar señales analógicas y almacenarlas en forma digital en archivos ASCII o bien tomar los datos contenidos en archivos de esta naturaleza y reconvertirlos a su forma analógica, los diagramas de esta tarjeta así como un explicación detallada de sus partes se encuentran en el apéndice E. Esta tarjeta se inserta en cualquier ranura de expansión de la computadora (DENKI CORONA o ZENITH) y es controlada mediante programas en lenguaje de turbo PASCAL (versión 3.01).

Las señales provenientes del amplificador son introducidas a la tarjeta de adquisición y muestreadas a una frecuencia aproximada de 5 Khz, los datos obtenidos son almacenados en archivos ASCII para su análisis posterior. Los programas utilizados para esto se encuentran listados en el apéndice F.

4.0 RESULTADOS

4.1 De los microelectrodos.- Hasta la fecha no ha sido posible obtener microelectrodos de tungsteno con impedancias adecuadas para el tipo de registro que se pretende realizar en la rata, la máxima impedancia lograda hasta ahora a sido de aproximadamente 2 Mohms utilizando el barniz BASA 36. La utilización de otro tipo de material aislante con mejores características de adhesión, así como de densidad mayor podría ayudar a resolver este problema. Durante los experimentos se encontró también que las impedancias de los microelectrodos disminuía después de ser introducidos al cerebro de la rata, esto indica la posibilidad de que el barniz utilizado (BASA 36) no tenga una adecuada adhesión al tungsteno.

Los resultados que se muestran en las próximas páginas capturados con el sistema desarrollado para el presente trabajo, se obtuvieron utilizando micropipetas de vidrio de impedancia aproximada a los 20 Mohms obtenidas con un jalador de pipetas de la DAVID KOPF INSTRUMENTS modelo 700C.

4.2 Del puente medidor de impedancias.- Fué utilizado para medir las impedancias de los microelectrodos de tungsteno antes de los experimentos y después de los mismos, con lo cual fué posible detectar la variación tan grande en la disminución de la impedancia, que los microelectrodos presentaron después de ser introducidos al cerebro de la rata. La impedancia de las micropipetas fué medida con un medidor de impedancias para micropipetas modelo BL-1000A de la Winston Company. Las impedancias medidas con el equipo comercial y con el puente desarrollado no siempre fueron coincidentes en sus valores. El puente comercial utiliza una onda senoidal a una frecuencia de 120 Hz y el equipo desarrollado una onda cuadrada a 1 Khz. Esto sugiere que las diferencias observadas en las lecturas se deba principalmente a los distintos tipos de ondas de excitación empleados y a sus diferencias en frecuencia. No obstante, las lecturas del puente desarrollado, si bien no son coincidentes con las del comercial, permiten tener una idea bastante buena de las condiciones que guardan los microelectrodos en lo referente a su impedancia.

4.2 Del amplificador de potenciales.- Su funcionamiento durante los experimentos de registro de actividad extracelular en cerebro de rata, así como en el de registro en el tectum óptico izquierdo del sapo, se encontró muy adecuado y no se detectó problema alguno para poder amplificar la señal proveniente de las micropipetas así como poder filtrarla y darle una amplitud suficiente para poder ser capturada por la tarjeta de adquisición del sistema. El amplificador de potenciales fué utilizado en modo unipolar con una de sus entradas conectadas a la referencia eléctrica (marcada como GND en el conector del cable de señal) del

circuito, tanto durante los experimentos con ratas como también en el experimento en el sapo.

En los experimentos en rata el ancho de banda del amplificador fué fijado en 700 Hz por seleccionar el filtro bajo en 300 Hz y el filtro alto en 1 KHz, la ganancia que se utilizó fue la mínima (80 db), ver apéndice D.

En el experimento en el sapo la ganancia en el amplificador fué inicialmente fijada en 80 db, pero como las amplitudes de las señales registradas eran muy pequeñas (unos 200 mV pico a pico) la ganancia fué aumentada a 109 db por colocar el selector de ganancia en x100 y el control variable de ganancia a la mitad de su recorrido (ver apéndice D), con lo cual las señales alcanzaron una amplitud de 1 Volt pico a pico aproximadamente, esto se hizo con el fin de poder capturar las señales con la tarjeta de adquisición. En lo que respecta a la ventana de muestreo fué seleccionada igual que para el registro en la rata.

4.4 De la tarjeta de adquisición.- Fué posible capturar y almacenar con ella en computadoras PC compatibles (DENKI CORONA y ZENITH) los potenciales de acción detectados durante del experimento, la tarjeta fué utilizada con la referencia de voltaje de 2.5 Volts, pudiendo manejar señales con una amplitud de 2.5 Volts pico a pico, y no se le fijó frecuencia de muestreo en el programa de control de la tarjeta, el programa 'CAPTURA' escrito en lenguaje turbo PASCAL (versión 3.01)(ver apéndice F), por lo que la frecuencia de muestreo es de aproximadamente 5 Khz.

Los archivos almacenados fueron leídos y desplegados en pantalla por medio del programa 'ESCRIBE' escrito también en turbo PASCAL (versión 3.01) (ver apéndice F), y son sus desplegados en pantalla los que se muestran mas adelante.

4.5 De los experimentos mismos.- Se realizaron un total de siete experimentos en rata, de los cuales los cuatro primeros fueron para detectar y solucionar problemas relacionados con el montaje del experimento mismo. Y un experimento en sapo.

Los dos primeros experimentos fueron realizados en el laboratorio de biología de la reproducción de la división de C.B.S de la U.A.M.I, los siguientes siete experimentos fueron realizados en la cámara de registros electrofisiológicos del laboratorio de bioingeniería del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M. En dicha cámara se cuenta también con una jaula Faraday con puertas a los lados y al frente, la cual se utilizó para cubrir el área de trabajo, en la cual se situó el estereotáxico, el microscopio utilizado para observar la zona de cirugía, así como la lámpara utilizada para iluminar el campo quirúrgico.

El equipo de amplificación y captura de señales fué situado por fuera de la zona de trabajo, sobre una meseta de concreto, pasándose el cable de señal del amplificador por un borde de la puerta lateral de la jaula Faraday. Para comprobar el nivel de interferencia debida a la línea de

alimentación (60 Hz) se conectó el equipo con las entradas de conexión al microelectrodo al aire. Para poder eliminar la interferencia de 60 Hz, fué necesario aislar el estereotáxico de la tierra física del sistema y evitar que la rata montada o el sapo, hicieran contacto con las partes de la jaula Faraday y de la mesa de cirugía que están unidas a tierra física de la línea de alimentación.

En los experimentos en ratas, éstas fueron montadas en el estereotáxico de acuerdo a la técnica descrita en la sección de registro extracelular de la introducción, y las coordenadas estereotáxicas fueron fijadas en la zona de la sustancia nigra compacta:

Coordenada anteroposterior 5200 μ
Coordenada lateral 1500 μ
De corteza hacia abajo de 6500 μ hasta 8000 μ
(espesor aproximado de la zona de la sustancia nigra)

Se utilizó como anestésico en los cuatro últimos experimentos uretano que se administra en dosis de 1.24gr/Kg por vía intraperitoneal ya que el Anestosal (pentobarbital sódico) resultó inadecuado por deprimir en exceso la actividad cerebral. El tiempo requerido para que el uretano surta efecto es de 1 hora, a 1 hora y media y se encontró que era necesario aplicar pequeñas dosis de mantenimiento del orden de los 0.02 a 0.03 ml aproximadamente cada hora, con el fin de evitar que el animal se moviera, lo cual provoca una gran cantidad de ruido.

El avance de las micropipetas utilizadas, fué controlado por medio del micromanipulador del estereotáxico y para evitar inducir ruido en la preparación al tocar la perilla del micromanipulador se le fijó a ésta, una pieza cilíndrica de plástico (tomada del cuerpo de un bolígrafo), la cual permitió manejar más fácilmente y sin ruido el avance de la micropipeta

En el experimento en sapo se situó la micropipeta en el borde del tectum óptico izquierdo del sapo y a una profundidad de 206 μ . La situación de las coordenadas con exactitud no fué posible por no contarse con un atlas estereotáxico del cerebro del sapo. Se utilizó un inmovilizador de la placa neuromuscular, succiníl colina, para mantener quieto al animal y la micropipeta fué controlada en su avance por el mismo micromanipulador empleado en el experimento en ratas.

Resumiendo lo anteriormente expuesto, a continuación se ennumeran las características de los equipos utilizados en los experimentos y en la obtención de las gráficas impresas más adelante:

En los experimentos:

Cámara de registros electrofisiológicos, construida por la U.N.A.M.

Jáula FÁraday, construida por el Centro de Instrumentos de la U.N.A.M.

Estereotáxico NARISHIGE modelo ST-7

Lámpara de fibras ópticas de doble haz

Videocassettera: SONY SL-HF860D

Procesador de audio: modelo PCM-1 de Medical System Corp.

Amplificador para electrofisiología: GRASS P511K

Monitor de audio: GRASS modelo AM7

Fuente de alimentación: GRASS modelo RPS 107E

Microscopio para disección: OLYMPUS modelo VMZ

Tódo el equipo anteriormente mencionado pertenece al Laboratorio de Bioingeniería del Instituto de Fisiología Celular.

El equipo empleado en los experimentos y que fué desarrollado en el Laboratorio de Cibernética consiste en:

Amplificador de potenciales para registro extracelular

Monitor de audio

Fuente de alimentación para el amplificador de potenciales

Tarjeta de adquisición de 8 bits

Cabe mencionar que los circuitos eléctricos de estos equipos fueron diseñados con el programa ORCAD versiones 1.0 y 1.25. Los circuitos impresos fueron diseñados con el programa SMARTWORK versión 1.3 y se grabaron en el Laboratorio de circuitos impresos del Departamento de Ingeniería Biomédica de la U.A.M.I y en el Laboratorio de Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., por carecerse en el Laboratorio de Cibernética del material e infraestructura adecuados.

También se empleó durante la manufactura de los microelectrodos de tungsteno el siguiente equipo, también desarrollado en el Laboratorio de Cibernética:

Puente medidor de impedancias para microelectrodos

Fuente voltaje AC, regulable

Microscopio OLYMPUS SZ30, perteneciente al Laboratorio de Cibernética de la Facultad de ciencias

Y el siguiente equipo prestado:

Microscopio ROSSBACH monocular (perteneciente al Laboratorio de Biología de la Reproducción de C.B.S de la U.A.M.I)

Horno eléctrico BLUE M, perteneciente al Laboratorio de Biofísica de la Facultad de ciencias

Micromanipulador sin marca, perteneciente al Laboratorio de Biofísica

Las micropipetas fueron hechas en el Laboratorio del Dr. René Drucker con los reactivos y el equipo de ese Laboratorio:

Estirador de pipetas: modelo 700C de la David Kopf Comp.
Puente medidor de impedancias: modelo BL-1000A de la Winston Electronics Comp.

Para poder obtener las gráficas que se ilustran más adelante se requirió del siguiente equipo:

Osciloscopio de memoria TEKTRONIX 7613, prestado por el Laboratorio de acústica de la Facultad de ciencias

Cámara fotográfica con lente de 135 mm y lentilla de acercamiento 7+1, prestada por el coordinador del Laboratorio de Cibernética

Computadora PC compatible DENKI CORONA, del Laboratorio de Cibernética

Computadora PC compatible ELEKTRA, facilitada por el coordinador del Laboratorio de Cibernética

Paquete manejador de la pantalla PIZZAS, facilitado por el coordinador del Laboratorio de Cibernética

Impresora DELTA 10-130, facilitada por el coordinador del Laboratorio de Cibernética

En las siguientes páginas se encuentran impresos los protocolos empleados durante los experimentos, así como también, algunos de los registros obtenidos en los dos últimos experimentos realizados.

4.6 PROTOCOLOS

En las siguientes hojas se encuentran impresos los protocolos seguidos durante los experimentos realizados en las ratas, y en el realizado en el sapo. Estos protocolos pueden dar una idea del trabajo y tiempo que consume el llevar a cabo los experimentos para poder obtener registros de actividad extracelular de neuronas, y pueden servir como guía para evitar cometer errores durante el montaje de futuros experimentos.

4.6.1 EXPERIMENTO 1 1/26/89

Experimento piloto para identificar problemas.

Laboratorio de biología de la reproducción U.A.M.I

12:18 Electrodo y estereotáxico, estereotáxico para rata y conejo de David Kopf Instrs, instalado en mesa de disección, sin protección eléctrica

15:00 Se conectan aparatos

15:20 Anestesia

Anestesal Smith Kline (pentobarbital sódico)

Peso de la rata 333 gr , Wistar macho.

dosis = $333/2.5 = .13$ ml. se diluye tres veces

15:28 Se inyecta intraperitonealmente

15:31 Se rapa

15:38 Se le aplica eter, rata responde al pellizco. La respiración falla, hay exceso de fluidos en tracto respiratorio

15:46 Se sacan flemas con gotero

15:59 Acepta barras óticas

16:01 Se administra 0.5 ml de anestésico, se salió de las barras

16:16 Se administra 0.05 ml de anestésico sin diluir

16:30 Se concluye incisión, coordenadas:

RL 3.33 mm

V 2.55 mm

AP 1.13 mm

16:41 Fin de estereotáxico

16:43 Se administra 0.05 ml de anestésico sin diluir, no se observan potenciales evocados superficiales (con aguja). Trepanación concluida, sangrado que se detiene a los pocos minutos

16:56 Se administra 0.05 ml de anestésico sin diluir

17:15 Mucha interferencia de 60 Hz. Hace falta microscopio de disección. La anestesia debe ser más formal para evitar esperas tan largas

17:35 Penetrando con electrodo de tungsteno, vertical en 4.67 mm, no se ve ni se oye nada.

17:40 Avance de 1/4 de circunferencia

17:55 Segundo electrodo, se ve una actividad muy pequeña

18:05 Se administra 0.05 ml de anestésico sin diluir

18:09 Avance del electrodo, no hay señal

18:20 Avance del electrodo, sólo se detecta ruido

18:44 Rata agonizando, falla respiratoria. Se prueba otro electrodo usando el polígrafo

19:00 Fin del experimento

Hay problemas con la instalación eléctrica, con la situación de los electrodos en la zona de interés, hay que hacer cambios en el diseño del amplificador

4.6.2 EXPERIMENTO 2 2/16/89

Laboratorio de biología de la reproducción U.A.M.I

Experimento para probar equipo de registro y anestesia.

Dos tipos de amplificadores

12:31 Sulfato de atropina 0.5 mg/ml
Anestesal 63 mg/ml

12:46 Rata de 313 gr, dosis a administrar 0.174 ml

12:52 Se le administra 0.1 ml de anestesia

13:00 Se le administra 0.3 ml de atropina

13:05 Se rapa

13:15 Centrando barras

13:20 Incisión

13:23 Se le administra 0.1 ml de anestesal

13:35 Perforación hecha, con microscopio se procede a introducir electrodo

14:21 Introduciendo electrodo, medición 4.52 mm

14:25 Introduciendo electrodo, medición 4.33 mm

14:26 Introduciendo electrodo, medición 4.27 mm

14:32 Introduciendo electrodo, medición 4.20 mm

14:36 Introduciendo electrodo, medición 4.15 mm

14:56 Se saca electrodo #4, doblado en L, rata se mantiene en buen estado

15:23 Se baja otro electrodo #2, a 4.32 mm

15:36 Se baja electrodo a 4.25 mm

15:40 Se baja electrodo a 4.15 mm

15:45 Se baja otro electrodo #5, a 4.31 mm

15:52 Avance de electrodo: 4.1 mm. rata con problemas respiratorios

15:54 Se administra 0.3 ml de atropina

094514

31

16:00 Se avanza electrodo a 3.9 mm

16:02 Se administra 0.1 ml de anestesia, hasta ahora no se ve nada

16:06 Otro electrodo #1, rata muere

Parece que hay problemas con los electrodos, la visibilidad mejoró mucho con el microscopio de disección, aunque sigue haciendo falta uno más adecuado.

4.6.3 EXPERIMENTO 1/90 1/17/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

Aterrizar todos los cables flotantes, hace falta atropina, cinta adhesiva, una buena lámpara, toallas de papel, sierra para ampolletas

19:00 Rata blanca se le inyecta anestésico 0.1 ml de anestesal

19:27 Se le administra 0.02 ml de anestésico

19:42 Se intentará rasurar, faltan tijeras, rasuradora

19:54 Montada en estereotáxico, se administra 0.05 ml de anestesal, traer navajas del número 10

20:10 Se abre piel y músculo del cráneo, cráneo al descubierto

20:22 Se llega a meninge y se trata de romper

20:30 Al abrir meninges dejó de haber presión intracraneal y el cerebro se contrajo, rata muere

Parece que el procedimiento quirúrgico empleado así como el procedimiento de anestesia no son muy adecuados.

4.6.4 EXPERIMENTO 2/90 1/19/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

9:52 Se inyecta anestésal 0.1 ml

10:22 Rata aún despierta

10:31 Se le administra 0.02 ml de anestesia

10:38 Responde al dolor, se empieza a rasurar

10:47 Aún despierta

10:54 Se le administra 0.03 ml de anestesia

11:06 No responde al dolor, se continúa el rasurado

11:10 Se le administra 0.1 ml de atropina

11:18 Rata montada en estereotáxico

11:25 Se resiste, se le administra 0.03 ml de anestésal

11:35 Se monta nuevamente

11:42 Se detectan ligeros problemas respiratorios, se le administran 0.06 ml de atropina

12:20 Se inicia trépano

12:46 Se introduce electrodo #1

13:13 Se avanza electrodo

13:29 Se checa electrodo

13:30 Se introduce otro electrodo #2

13:35 Se dobla electrodo

13:40 Se inserta electrodo #3

13:59 Se avanza electrodo

14:30 Se avanza electrodo

14:48 Se avanza electrodo

15:11 Se avanza electrodo

15:19 Se inicia grabación en video, de aparentes potenciales de acción

15:22 Se avanza electrodo
15:42 Se avanza electrodo
16:00 Se avanza electrodo
16:10 Se avanza electrodo
16:26 Se administra 0.03 ml de anestesia
16:36 Se administra 0.02 ml de anestesia
16:38 Se avanza electrodo
17:03 Se introduce electrodo #4
17:06 Se continúa grabación
17:13 Se avanza electrodo
17:33 Se avanza electrodo
17:37 Se termina videocassette, se rebobina, lo anteriormente grabado es sólo ruido
17:52 Se avanza electrodo
17:57 Se administra 0.02 ml de anestesia
18:21 Se administra 0.02 ml de anestesia
18:44 Se coloca electrodo en un nuevo agujero, inicia en 18 mm
18:47 Se avanza electrodo a 21 mm
19:03 Se coloca electrodo #5
19:06 Se tocan meninges en 21 mm
19:23 Se avanza electrodo a 22 mm
19:29 Se coloca electrodo A I
19:32 Se coloca electrodo A II, el anterior se dobló, se toca superficie en 17 mm
19:35 Se avanza a 21 mm
19:38 Se avanza a 25 mm
19:43 Se raspa barniz del electrodo y se toca superficie no hay variación

19:46 Se avanza a 21 mm

19:48 Se desconectan aparatos, no hay variación, electrodo doblado

19:51 Se usa otro electrodo, se avanza de 19 mm a 23 mm, no se registra nada

19:56 Se apaga equipo y se sacrifica la rata, con una sobredosis

La metodología seguida en la anestesia parece ser mucho mejor que en los anteriores experimentos, lo observado sugiere que siguen los problemas con las impedancias de los electrodos.

4.6.5 EXPERIMENTO 3/90 1/29/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

9:35 Se aísla estereotáxico de tierra física y se conecta a la entrada GND del amplificador

11:39 Se consigue rata peso: 511.4 gr

Anestésal dosis 35mg/Kg , concentración 63mg/ml

A administrar a la rata .28 ml

11:42 Se le administra 0.12 ml

11:57 Se le administra 0.13 ml

12:17 Se le administra 0.02 ml

12:43 Se le administra 0.03 ml

13:03 Se le administra 0.02 ml, no se deja montar en estereo

13:49 Montada en estereo, se le administra 0.1 ml de atropina

13:52 Se sale del montaje

14:05 Se le administra atropina 0.1 ml

14:50 Se intenta incisión, se resiste, se aplica 0.03 ml de anestésal

15:30 Se intenta continuar incisión, se resiste, se aplica 0.06 ml de anestésal

15:50 Se aplica 0.04 ml de anestésal

16:32 Incisión completa, se coloca porta electrodo en contacto con craneo, se detecta ECG

16:37 Se inicia trépano

16:55 Se aplican 0.06 ml de anestésal

17:10 Se continúa trépano

17:21 Se introduce electrodo I A

17:57 Se avanza electrodo, no se observa actividad

18:17 Se aplica 0.04 ml de anestésal

18:47 Se avanza electrodo 2 mm
19:02 Se aplica 0.08 ml de anestesia
19:19 Se coloca electrodo en cráneo se registra ECG
19:31 Se introduce electrodo II A
20:12 Se monta electrodo de referencia, tornillo en el cráneo
20:15 Se administra quetamina
21:00 Se coloca electrodo A III
21:20 Se avanza electrodo
21:34 Se administra sobredosis

El haber obtenido ECG con los microelectrodos parece confirmar los problemas de baja impedancia o disminución de la misma en el momento de introducirlos al cerebro del animal.

4.6.6 EXPERIMENTO 4/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

Anestésico: Uretano, dosis 1.25 gr/Kg.

Concentración: 1.25 gr/2 ml

Rata peso : 219 gr

Anestésico a administrar: 0.44 ml

12:35 Se le administra 0.45 ml de Uretano

13:26 Se le administra 0.04 ml de Uretano

13:48 Se inicia cirugía

15:02 Se le administra 0.04 ml de Uretano

15:54 Se le administra 0.05 ml de Uretano

16:14 Se introduce electrodo, se obtienen señales, aparentan ser potenciales

16:32 Se aplica 0.06 ml de uretano

16:48 Se avanza 1 mm

17:13 Se aplica 0.1 ml de uretano

17:35 Se avanza electrodo

17:55 Rata muere

El cambiar de anestésico parece haber mejorado mucho la relación señal ruido de lo que se observa al osciloscopio, aparentemente continúan los problemas con la impedancia de los electrodos

4.6.7 EXPERIMENTO 5/90

2/2/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

Anestésico: Uretano, dosis 1.25 gr/Kg.

Concentración: 1.25 gr/2 ml

Rata 1 peso : 190 gr

Rata 2 peso : 191 gr

Anestésico a administrar: 0.38 ml

Electrodo: micropipeta de 18 Mohms

12:22 Se le administra 0.38 ml de Uretano, a rata 1

12:32 Rata muere

12:34 Se le administra 0.2 ml de uretano, a rata 2

12:54 Se le administra 0.18 ml de Uretano

14:54 Se le administra 0.02 ml de Uretano

15:13 Se le administra 0.04 ml de Uretano

15:48 Se le administra 0.06 ml de Uretano

16:23 Se le administra 0.1 ml de uretano, se inicia cirugía

16:40 Se inicia trépano

18:00 Se coloca electrodo en superficie del cerebro, a 27 mm

18:10 Se avanza electrodo, se sitúa en corteza, no se registra actividad alguna.

18:20 Se avanza a una profundidad de 7 mm de la superficie, se encontró actividad que responde a estímulos auditivos

19:00 Se sacrifica rata

El cambio de anestésico, pero sobre todo de electrodos, ahora se empleó una micropipeta de 18 Mohms de impedancia, a resultado positivo, se empiezan a obtener registros, falta experimentar más.

4.6.8 EXPERIMENTO 6/90

2/2/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

Anestésico: Uretano, dosis 1.25 gr/Kg.

Concentración: 1.25 gr/2 ml

Rata 1 peso : 191 gr

Rata 2 peso : 107 gr

Anestésico a administrar rata 1: 0.382 ml

Anestésico a administrar rata 2: 0.30 ml

Electrodo: micropipeta de 20 Mohms

13:46 Se le administra 0.38 ml de Uretano, a rata 1

14:35 Se le administra 0.04 ml de Uretano, a rata 1

15:37 Rata muere

15:41 Se le administra 0.3 ml de uretano, a rata 2

16:28 Se trata de montar en estereo, se resiste

16:33 Se le administra 0.06 ml de uretano

17:05 Se inicia trépano

17:10 Se llega a meninges

17:40 Se introduce electrodo

17:46 Se avanza a una profundidad de 6 mm de la superficie, se encontró actividad espontánea

18:08 Se guarda archivo PG.DAT (micropipeta, equipo GRASS)

18:10 Se conecta equipo diseñado

18:25 Se graba archivo PF1.DAT (micropipeta, equipo diseñado)

18:36 Se introduce electrodo de tungsteno 6X impedancia 12 Mohms, en superficie marca 38 mm

18:42 Se avanza a 45, 46, 46.5 mm, no se obtiene ningún registro

19:04 Se instala nueva micropipeta, impedancia 22 Mohms, en superficie marca 36 mm

19:09 Se avanza a 42 mm, no se obtiene nada, pipeta tapada

20:00 Se sacrifica rata

La actividad detectada corresponde a un núcleo de alta actividad espontánea, esto sugiere, junto con lo obtenido en el experimento anterior, que el registro en corteza no será posible a menos que se mejoren las técnicas quirúrgicas y se pueda conservar la corteza del animal en las mejores condiciones.

4.6.9 EXPERIMENTO 7/90 2/14/90

Laboratorio de bioingeniería, Instituto de fisiología celular, U.N.A.M.

Anestésico: Uretano, dosis 1.25 gr/Kg.

Concentración: 1.25 gr/2 ml

Rata peso : 212 gr

Anestésico a administrar: .424 ml

Electrodo: micropipeta de 18 Mohms

10:40 Se le administra 0.42 ml de Uretano

11:49 Se le administra 0.04 ml de Uretano

12:21 Se monta en estereotáxico

12:25 Se le administra 0.03 ml de Uretano, se inicia cirugía

12:40 Responde mucho, se le administra 0.03 ml de Uretano, se inicia trepanación del craneo

13:34 Se le administra 0.03 ml de Uretano, se continúa trépano

13:56 Se ha concluido la limpieza del orificio practicado y se han retirado las meninges de la zona de introducción del electrodo

14:00 Micropipeta colocada, se toca con la punta la superficie del cerebro, micromanipulador en marca de 39.5 mm, se avanza hasta 43.5 mm

14:16 Se le administra Uretano 0.04 ml, se continúa el avance del electrodo

14:26 Se inicia grabación de potenciales, contador de cassette en 28'

14:31 Se suspende grabación en 33' 02"

14:37 Se le administra 0.02 ml de Uretano

15:19 Se avanza electrodo, no se ha vuelto a obtener registro

15:26 Se administra 0.03 ml de Uretano

15:53 Se cambia micropipeta, y se toca superficie del cerebro en 39.5 mm

15:58 Se registra actividad, video continúa a partir de 33' 02"

15:03 Pausa en 37' 14"

16:03 Se captura con la tarjeta, archivo PG2.DAT (pipeta,grass), se continúa grabación

16:04 Se administra 0.02 ml de Uretano, pausa en grabación

16:06 Se conecta equipo diseñado

16:08 Avance de electrodo: 3 mm

16:20 Se continúa grabación en 37' 14", con equipo diseñado

16:22 Se captura con la tarjeta, archivo PF2.DAT (pipeta,francisco)

16:28 Se captura otro archivo PF3.DAT

16:43 Se graba archivo PF4.DAT

16:49 Se graba archivo PF5.DAT

17:19 Se continúa grabando en la video, 1 hora 11' 42"

17:46 Pausa en 1 hora 38' 23''

18:00 Se sacrifica la rata

Los potenciales registrados en este experimento, són nuevamente, de la misma zona de alta actividad espontánea, sustancia nigra compacta. No fué posible obtener registros de la corteza.

4.6.10 EXPERIMENTO 8/90 2/22/90

Laboratorio de bioingeniería, instituto de fisiología celular, U.N.A.M

Anestésico, para cirugía: MS-122, dosis 0.23 g/10ml de sol. salina.

Inmovilizador, empleado durante el experimento: Succinilcolina (bloqueador de la placa neuromuscular), dosis: 20 mg/ml

Animal: Sapo M-130 (Bufo marinus horribilis)

El sapo fué sometido a cirugía el 19 de febrero, y se realizó el experimento hoy, con el fin de darle tiempo a que se recupere de la misma.

Electrodo: micropipeta, impedancia 16 Mohms

10:30 Se coloca sapo en hielo, para potenciar efecto del inmovilizador

10:35 Se coloca sapo en escenario de experimentación, en un plato sobre el estereotáxico

10:40 Se introduce micropipeta, hasta aproximadamente capas 6 u 8 del tectum óptico izquierdo, se usa como referencia el mapa de campos receptivos de Gaze.

11:15 Se conecta electródo a equipo GRASS. Se estimula con emisiones cortas de luz (flash), se observan potenciales en respuesta al estímulo

11:20 Se avanza electrodo 0.5 mm, aumenta la actividad, no respuesta al estímulo luminoso

13:43 Se baja más electrodo, se arma un estímulo tipo gusano, se le presenta al sapo y aumenta la frecuencia de los potenciales de acción.

13:47 Se cambia a equipo diseñado, hay una mejora notable en el registro, se aprecian mejor los potenciales.

13:53 Se estimula al sapo con diferentes medios, con el estímulo tipo gusano no hay cambio, con el estímulo cuadrado se observa aumento de la frecuencia de los potenciales, se le presenta un estímulo tipo "mosca" (un cordón con un nudo en el extremo) y se observa un aumento de la frecuencia de los potenciales.

14:15 Se marca la zona del registro por pasar una corriente de 1 μ A por una hora, conectando el negativo de una fuente

al electrodo y el positivo al cuerpo del sapo. Esto se realiza con el fin de examinar histológicamente el cerebro del sapo.

En este experimento se pudieron grabar potenciales con una mejor relación señal/ruido que en los dos anteriores experimentos y el haberlos obtenidos en una zona con poca actividad espontánea sugiere que el método quirúrgico seguido es más adecuado que el empleado en la rata, ya que en ésta sólo fué posible obtener actividad espontánea y no del tipo evocada.

EJEMPLOS DE LOS POTENCIALES REGISTRADOS EN LOS EXPERIMENTOS

En las siguientes páginas se encuentran impresas fotografías de potenciales de acción, figuras 1 a la 4, registrados en tectum óptico del sapo durante el último experimento realizado, experimento 8.

También se encuentra impreso un tren de potenciales de acción, pasado a papel con un graficador GRASS modelo 7512, figura 5, obtenido de la sustancia nigra compacta del cerebro de la rata, durante el experimento 7.

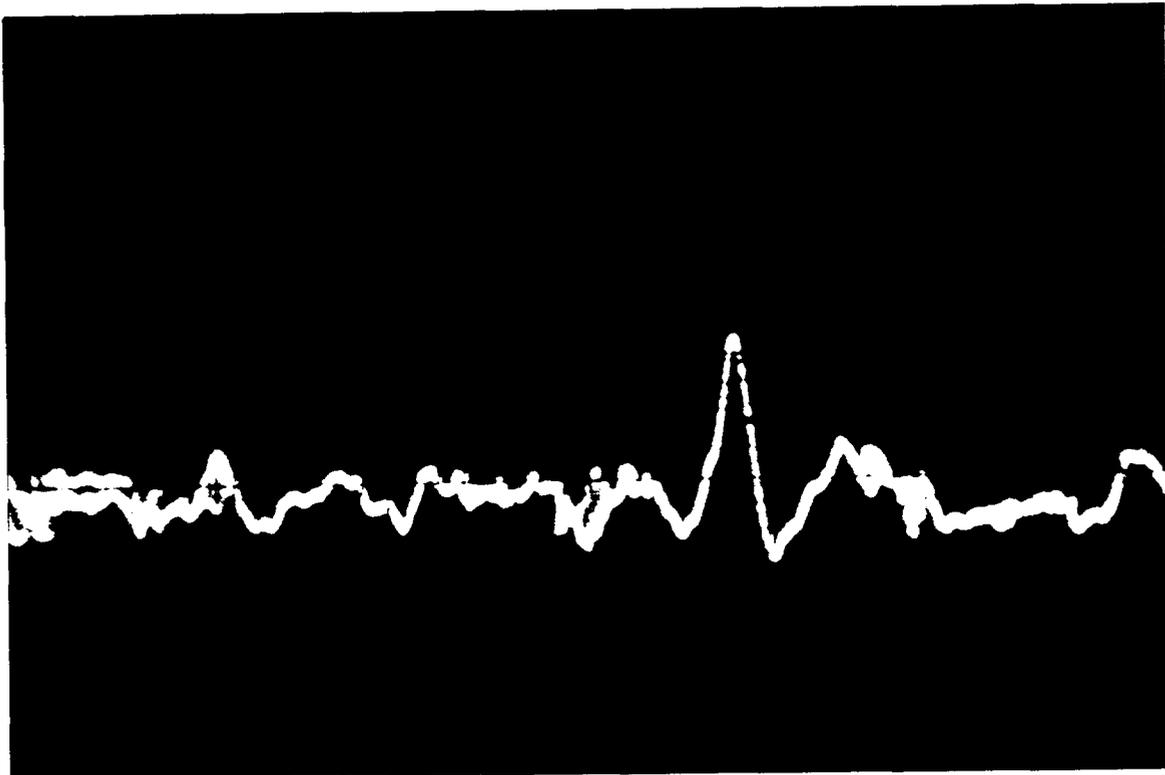


FIGURA 1A

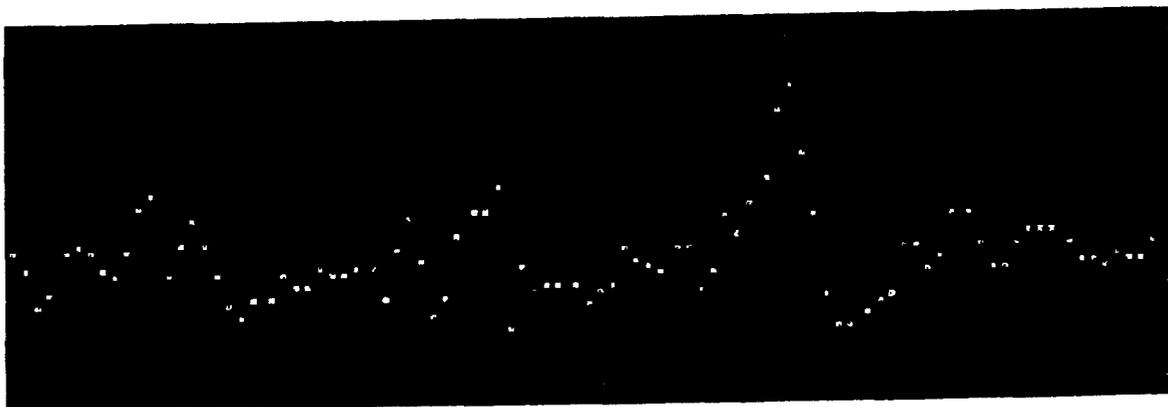


FIGURA 1B

FIGURA A. Imágen analógica de un potencial de acción, del tectúm óptico del sapo, obtenida de la pantalla de un osciloscopio de memoria TEKTRONIX 7613, y utilizando una cámara fotográfica con lente de 135 mm, lentilla de acercamiento 7+1 y película KODACOLOR ASA 400.

FIGURA B. Imágen digitalizada de un potencial muy similar, perteneciente al mismo tren de potenciales que la señal analógica. Las señales digitales fueron obtenidas con la tarjeta de adquisición instalada en una computadora CORONA, con un reloj de 4.77 Mhz. La referencia de voltaje utilizada fue de 2.5 V, y la frecuencia de muestreo de aproximadamente 5 KHz.

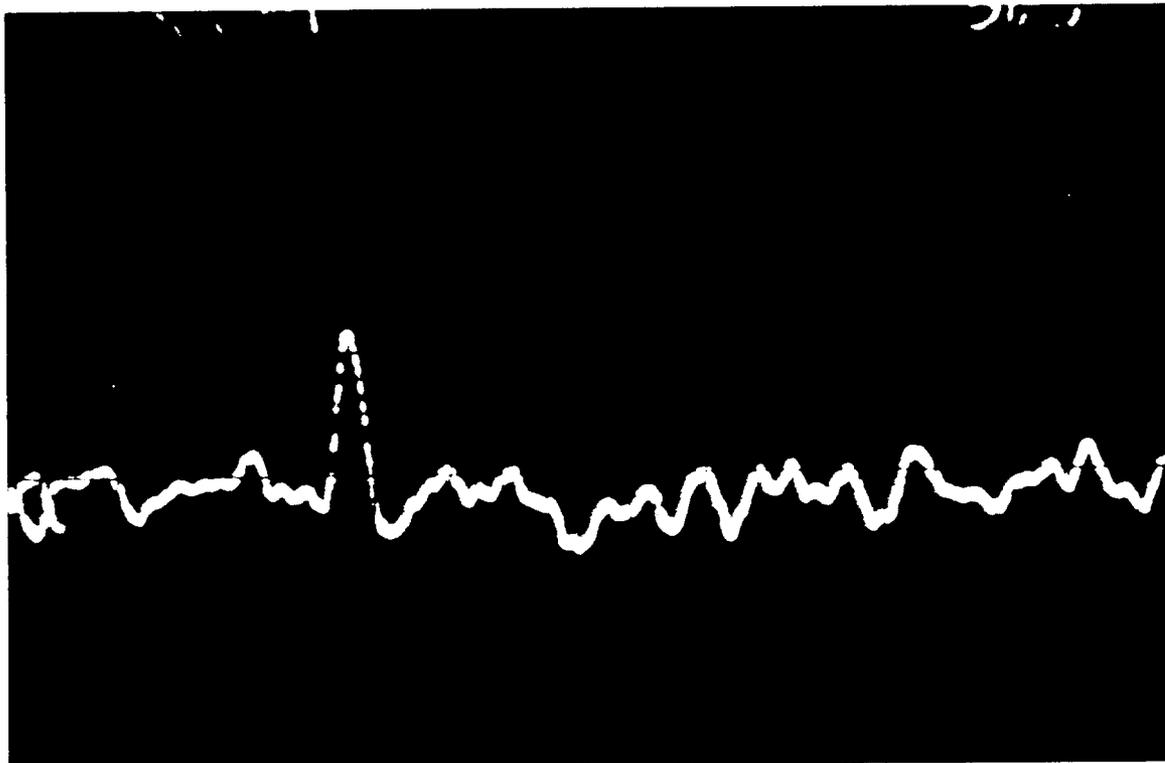


FIGURA 2A



FIGURA 2B

FIGURA A. Imágen analógica de un segundo potencial de acción obtenida de la pantalla de un osciloscopio de memoria bájó las mismas condiciones que en la figura 1A.

FIGURA B. Imágen digitalizada de un potencial muy similar, perteneciente al mismo tren de potenciales que la señal analógica. La señal fué obtenida bajo las mismas condiciones que en la figura 1B

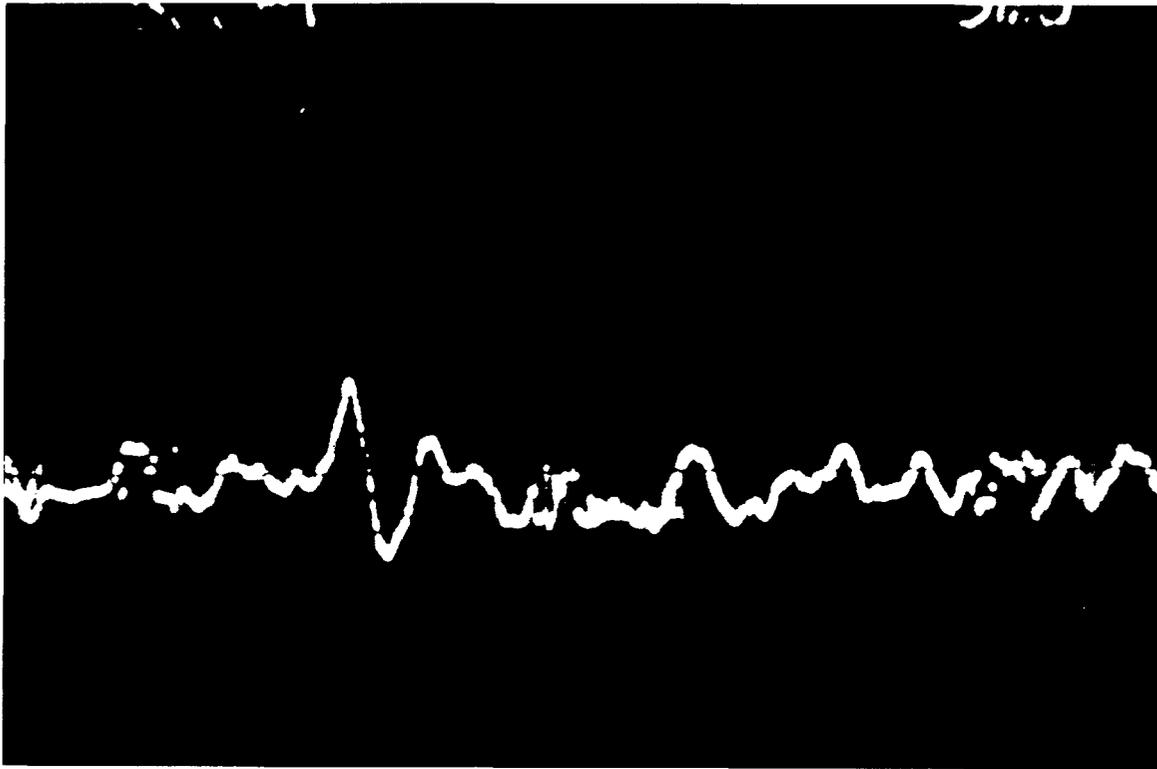


FIGURA 3A

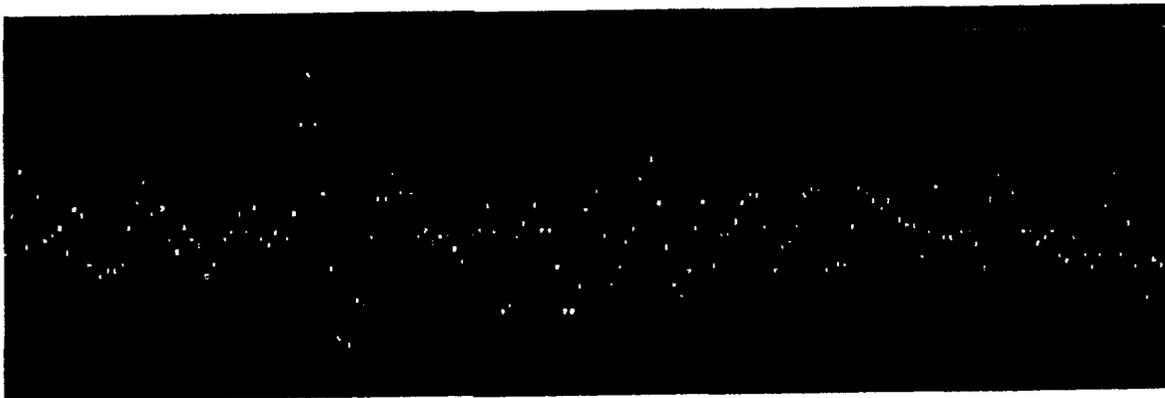


FIGURA 3B

FIGURA A. Imágen analógica de un segundo potencial de acción obtenida de la pantalla de un osciloscopio de memoria bajo las mismas condiciones que en la figura 1A.

FIGURA B. Imágen digitalizada de un potencial muy similar, perteneciente al mismo tren de potenciales que la señal analógica. La señal fue obtenida bajo las mismas condiciones que en la figura 1B.

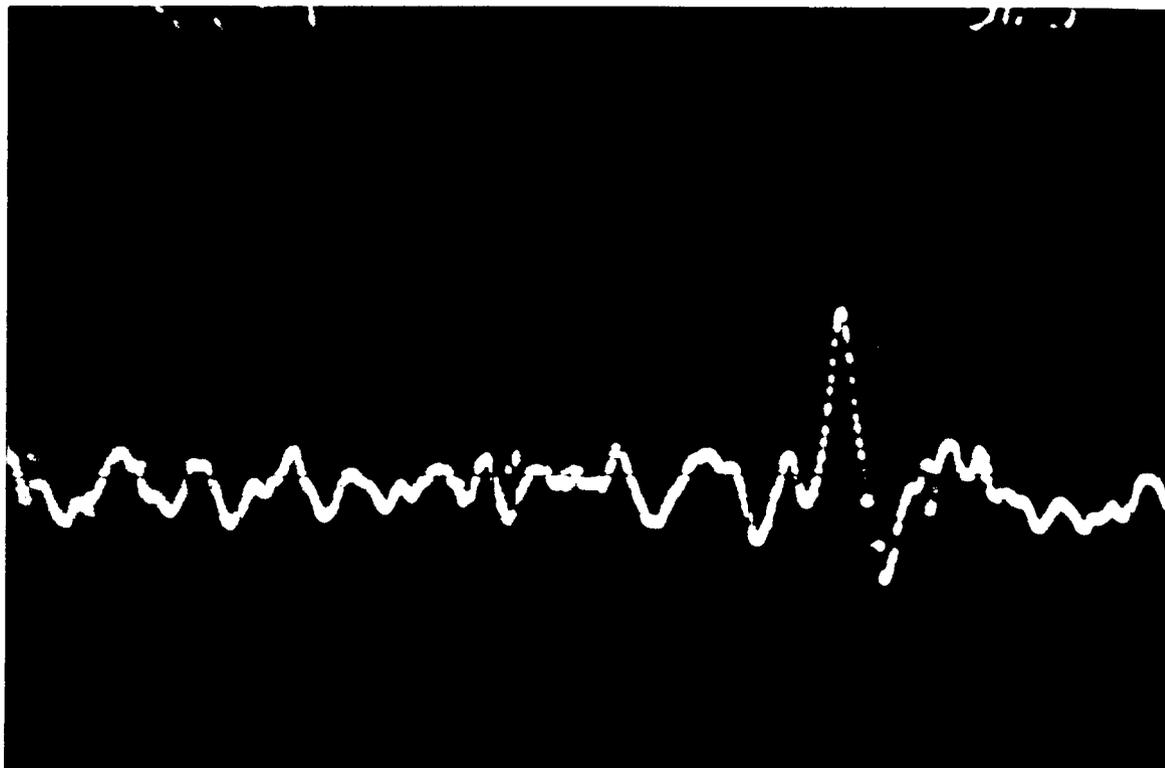


FIGURA 4A



FIGURA 4B

FIGURA A. Imágen analógica de un segundo potencial de acción obtenida de la pantalla de un osciloscopio de memoria bajo las mismas condiciones que en la figura 1A.

FIGURA B. Imágen digitalizada de un potencial muy similar, perteneciente al mismo tren de potenciales que la señal analógica. La señal fué obtenida bajo las mismas condiciones que en la figura 1B

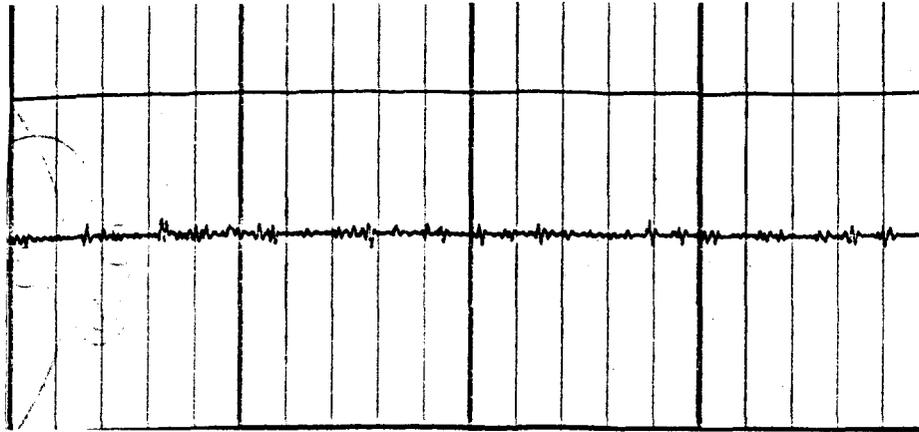


FIGURA 5A

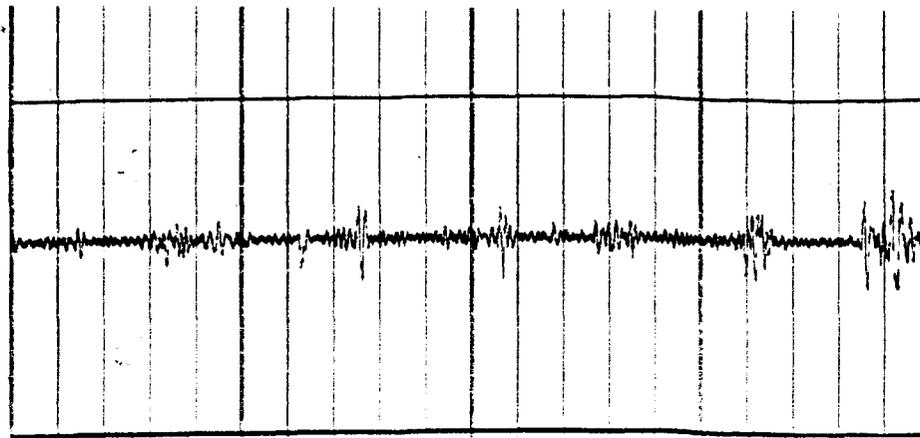


FIGURA 5B

FIGURA A. Imágen analógica de un tren de potenciales de acción obtenidos de la sustancia nigra compacta del cerebro de la rata, estos potenciales fueron graficados con un graficador GRASS modelo 7512 para EEG, por pasar la señal proveniente del PCM a través del amplificador diseñado.

FIGURA B. Imágen analógica de un segundo tren de potenciales de acción del cerebro de la rata, graficada con el mismo graficador GRASS. Tanto en esta figura A, como en la B, la ganancia del amplificador fué continuamente variada para poder obtener los trazos

5.0 DISCUSION Y CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos puede mencionarse que:

En lo referente a los microelectrodos es necesario continuar trabajando en la aislación de los mismos utilizando para ello algun otro tipo de barniz aislante con características diferentes en cuanto a viscosidad y adherencia para tratar de esta forma obtener microelectrodos con impedancias más altas y adecuadas. Parecería que este problema quedó resuelto con la utilización de micropipetas. Sin embargo, no es así, pues uno de los objetivos a largo plazo de esta investigación es trabajar con animales preparados crónicamente y, en tal situación, los microelectrodos de vidrio no proporcionan la robustez de que son capaces los de tungsteno. Los microelectrodos de metal pueden dejarse instalados en la cabeza del animal y permanecer allí por meses en buenas condiciones. Otra ventaja perseguida con esto es trabajar con el animal despierto o apenas sedado. Todo esto agrega complicaciones al proyecto, pero es exactamente aquí donde se necesitan nuevos experimentos y, sobre todo, resultados del registro de uno o varios grupos de neuronas tomado con atados de microelectrodos.

En lo referente al amplificador de potenciales aun cuando su funcionamiento fué más que adecuado, ya que durante los experimentos se observó, que su desempeño, en comparación con el equipo GRASS P511K empleado como referencia, fué superior haciendo más fácil la detección de los potenciales, por tener una impedancia de entrada mayor al GRASS y por la capacidad que posee de poder "desplazar" la ventana de muestréo con sus contróles rotatórios (ver apéndice D), lo cual permite mejorar mucho la calidad del registro obtenido.

Aun así, sería susceptible de ser mejorado en cuanto a su calidad de funcionamiento añadiéndole filtros con pendiente de corte más aguda, así como un control por pasos de la ganancia de la etapa de preamplificación del mismo. Y desde luego utilizando componentes pasivos de precisión en todo el circuito.

En lo referente a la tarjeta de adquisición, actualmente sólo es posible capturar 20,000 muestras, cantidad de datos que resulta inadecuada para un análisis formal, por lo que será necesario contar en los experimentos que se deséan realizar con una computadora con un mínimo de dos procesadores o bien, utilizar dos computadores que se comuniquen entre sí, donde uno de ellos se haga cargo de la captura y almacenamiento de los datos en un medio de alta capacidad, un disco duro por ejemplo, y la otra computadora que se haga cargo del análisis de los datos capturados. Esto desde luego implica la utilización de sistemas operativos y paquetes de programas más avanzados y completos los cuales pueden adquirirse comercialmente o bien desarrollarse.

La tarjeta misma aun cuando proporciona una buena resolución de los datos con ella capturados, definitivamente el empleo de convertidores de 12 bits mejoraría enormemente su capacidad resolutive, y en cuanto al programa con ella empleado es un programa destinado únicamente a la captura de datos por lo que se encuentra en una etapa muy elemental de desarrollo y en consecuencia es necesario trabajar en él para lograr un paquete más adecuado a la captura y procesamiento de la información encontrada en la experimentación neurofisiológica.

Respecto de los experimentos realizados, si bien el propósito inicial del presente trabajo fué tratar de obtener registros en corteza cerebral de rata y conejo, finalmente fué necesario trabajar con ratas, debido a la dificultad de poderlo hacer con conejos, por desconocerse su manejo y por no ser fácilmente obtenibles de los bioterios con los cuales se trabajó, el de la Facultad de Ciencias y el del Instituto de Fisiología Celular.

Debido a que las ratas utilizadas son muy pequeñas, con un peso en promedio de 215 gr, es sumamente difícil poder abrir el cráneo sin causar lesiones importantes a la corteza cerebral debido a la enorme dificultad que representan las reducidas dimensiones de las estructuras anatómicas del cerebro, amén de que es necesario poder mantener la región descubierta de la corteza lo mejor protegida posible y en condiciones adecuadas de humedad que disminuyan al máximo el número de neuronas muertas.

También es necesario conocer muy bien y utilizar el anestésico adecuado, con el fin de que las regiones que se pretendan estudiar no sean deprimidas en su funcionamiento; debido a estos problemas y considerando que el propósito del presente trabajo era comprobar el funcionamiento del equipo desarrollado, se optó por obtener registros de una región subcortical, la sustancia nigra compacta, la cual presenta una gran actividad espontánea.

En lo referente a los experimentos realizados en el sapo, en las figuras 1A a 4B, se observan potenciales de acción obtenidos en el experimento del sapo, puede observarse en la figura 1A que además del potencial claramente visible, aparece antes de él lo que parece ser un segundo potencial. En la figura 4A, se observa, la imagen de un segundo potencial aparentemente diferente al de la figura anterior y que además parece ser que hay un segundo potencial junto a él. El poder determinar finalmente si lo que en las figuras se muestra es uno o más potenciales y si estos son o no diferentes, corresponde a la parte de análisis de los registros, empleando técnicas de separación y análisis adecuados. Este análisis será llevado a cabo cómo parte del proyecto del laboratorio de cibernética en el cual trabajarán otros tesisistas.

En lo referente a la figura 5A, que es un registro de la sustancia nigra compacta del cerebro de la rata, el tren de señales tiene una amplitud pequeña, por lo que no puede apreciarse muy bien, esto debido a que la ganancia del

amplificador no pudo aumentarse mucho, ya que al hacerlo la señal graficada se volvía muy ruidosa y se distorsionaba como puede apreciarse en la figura 5B. Según parece el problema se debe a malos acoplamientos de impedancias, así como también por haber usado un graficador diseñado para EEG, por lo que su respuesta a las señales relativamente rápidas que se capturaron, es inadecuada. Este equipo fué prestado por el laboratorio de estudios del sueño del Instituto de Fisiología Celular.

Como puede apreciarse, el presente trabajo es completamente inicial y es apenas el principio del trabajo experimental a realizar en el Laboratorio de Cibernética, donde será necesario primeramente obtener el equipo, ya que como puede apreciarse casi todo el equipo empleado fué prestado por diferentes laboratorios de diferentes sitios, lo cual aumentó notablemente el trabajo y las dificultades a vencer para poder realizar los experimentos.

También es necesario hacer notar que para poder realizar los experimentos que se pretenden, registro múltiple, hace falta desarrollar (o adquirir) equipo que sea capaz de manejar varios canales, separar los potenciales de acción por clases (proyecto en marcha en el Lab. de Cibernética), permita controlarlos perfectamente durante el experimento, analizar la información obtenida en cada uno de ellos, almacenar la gran cantidad de información obtenida, etc. Esto se menciona debido a que el equipo desarrollado, así como el empleado para comparación, no son adecuados para una tarea de este tipo. El equipo desarrollado puede modificarse para éste tipo de trabajo, pero implicaría el empleo de bastante tiempo, así como de disponer mejores recursos económicos y de infraestructura en el laboratorio.

Es también necesario el seguir trabajando en las técnicas quirúrgicas, con el fin de minimizar los daños a la región que pretende estudiarse, así como el de poderse situar realmente con precisión en la zona o zonas del cerebro que resultan de interés.

Y es necesario, también, el mejorar los métodos de registro y captura de datos, con el fin de poder obtener registros de mucho mejor calidad y confiabilidad que los obtenidos hasta el momento; todo esto encaminado a poder realizar registros en regiones corticales del cerebro, ya no sólo en ratas y sapos, sino también en gatos y conejos, según las necesidades de la investigación misma.

Finalmente, es necesario adecuar la adquisición y almacenamiento de los datos para que sean compatibles con los paquetes de software para el análisis por el método de correlación cruzada y el método gravitacional de Gerstein. Estos métodos de análisis permitirán la determinación del diagrama de conectividad funcional entre los grupos de neuronas registrados.

6.0 APENDICE A.

FUENTE DE VOLTAJE AC, REGULABLE

La fuente de corriente alterna con voltaje regulado usada en la afilación de los microelectródos consiste básicamente en las siguientes etapas:

- 1) Contról de amplitúd de fase a base de un triac.
- 2) Un transformador reductor de voltaje.

1) El circuito de contról de amplitúd de fase consta de un arreglo RC formado por C_1 y R_1 , R_2 , y R_3 , el cuál determina cuanto tiempo estará conduciendo el diac D_1 que polariza la compuerta del triac Q_1 y en consecuencia el tiempo en el cuál este último permanecerá en conduccción; de esta forma el triac estará conduciendo en periodos de tiempo fijos seleccionables tanto para el ciclo positivo, como para el ciclo negativo de la tensión de la línea. Con R_3 en su posición centrál es posible ajustar la constante de tiempo con R_2 desde $1/8$ del periodo de la onda de la línea hasta $1/4$ de ésta aproximadamente. La posición del cursor de R_3 se varía ligeramente de la posición centrál con el fin de poder lograr cambios de voltaje suaves durante el recorrido total de R_2 , el ajuste de voltaje. C_2 y R_5 forman un circuito filtro para disminuir el rizo de la tensión de disparo del diac. R_4 actúa como limitador de la corriente de compuerta del Triac.

2) Un transformador T_1 de 127V/12 V 1A con derivación centrál, se utiliza como carga del circuito de control y para aislar y reducir el voltaje de la línea. Así el primario del transformador, se conecta al circuito de control y el voltaje regulado de AC es tomado del secundario con respecto a la derivación centrál, así es posible tener un voltaje que varíe de aproximadamente 0 V AC a aproximadamente 6 V AC.

USO DE LA FUENTE

Ver figura 6. El empleo es muy sencillo, ya que solamente es necesario conectarla a una toma de corriente alterna, conectar el circuito a ser alimentado a las salidas de voltaje controlado, los dos conectores banana marcados como SALIDA, encender el equipo y ajustar el voltaje con el contról de AJUSTE, el voltaje seleccionado puede monitorearse conectando en paralelo un voltímetro para AC.

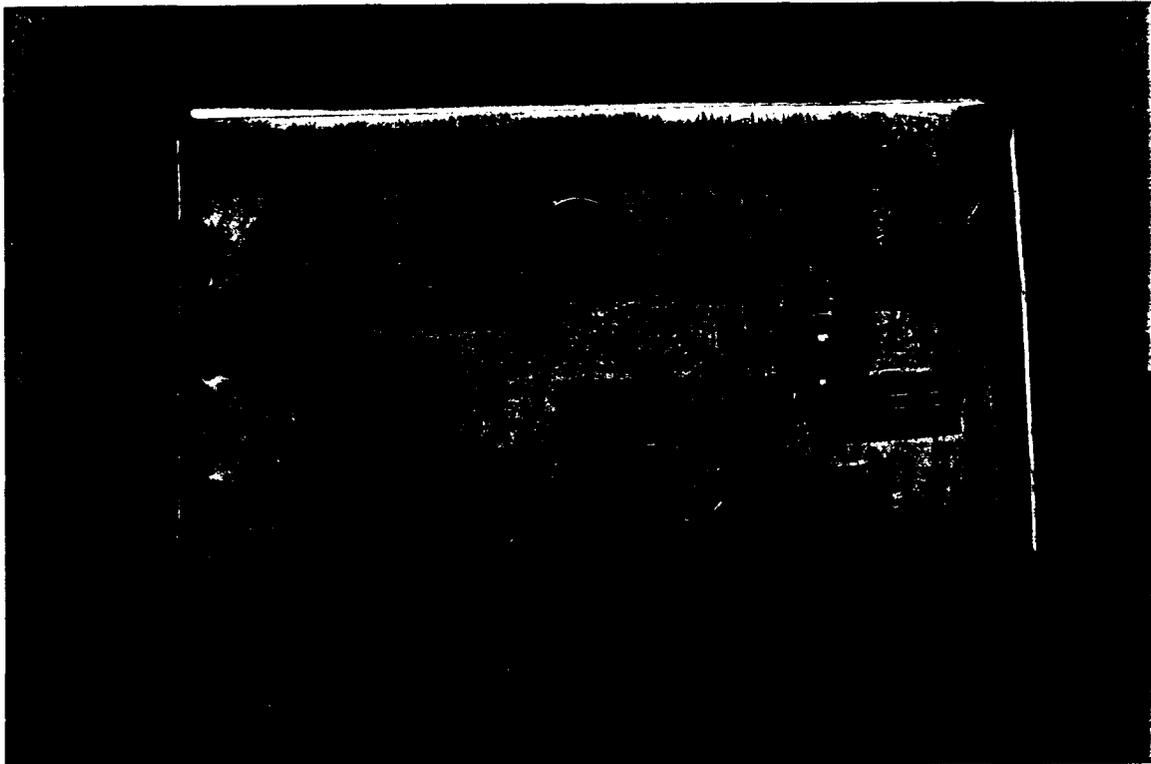
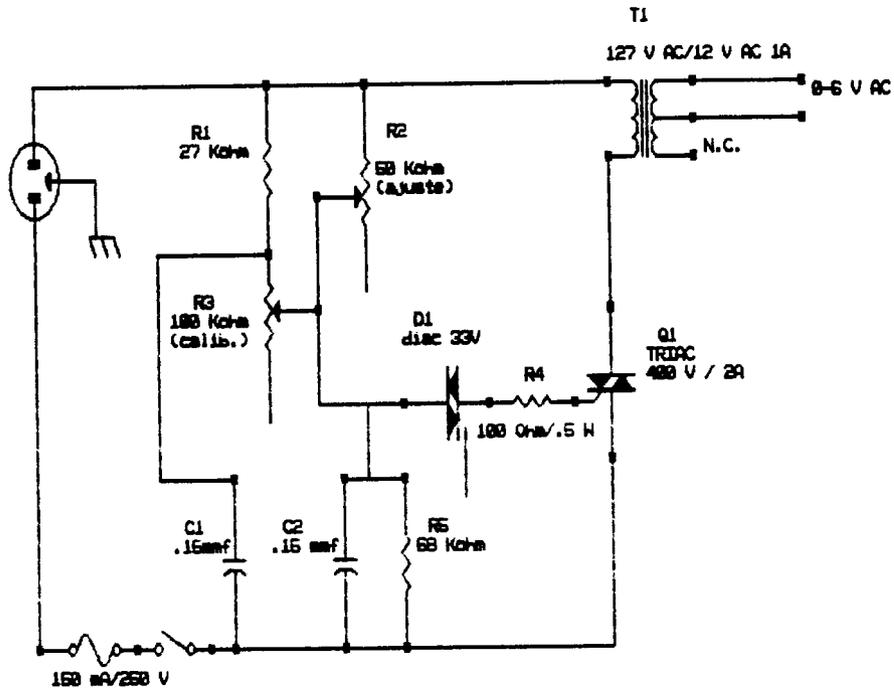


FIGURA 6 FUENTE DE VOLTAJE AC, REGULABLE.- Voltaje regulable de 0 a 6 V.

En la siguiente página se muestra el diagrama eléctrico de la fuente.

Los diagramas eléctricos impresos en este apéndice y los siguientes fueron realizados con el programa ORCAD versiones 1.0 y 1.25. Los circuitos impresos de los equipos desarrollados se diseñaron con el programa SMARTWORK versión 1.3



Francisco J. Heredia Lopez.

Size	Document Number	05	REV
A	Fuente de voltaje AC, regulable		
Date:	September 12, 1969	Sheet	1 of 1

7.0 APENDICE B.

PUENTE MEDIDOR DE IMPEDANCIAS PARA MICROELECTRODOS

Circuito puente de calibración de electrodos.- Con siste en las siguientes etapas:

1) Circuito oscilador astable basado en un CI 555 con contról de la amplitud de la señal.

2) Un circuito puente de Wheatstone.

3) Un circuito filtro pasabajas de un polo, cuya salida se conecta a un multímetro digital que indica la condición de equilibrio del puente.

1) El circuito oscilador está diseñado alrededor de un circuito integrado temporizador 555, en su configuración astable. R_1 , R_2 y C_2 forman un constante de tiempo que determina la frecuencia de oscilación, y los valores de las resistencias permiten fijar el ciclo de trabajo. El capacitor C_2 carga y descarga entre los voltajes de umbral ($\approx 0.67 V_{cc}$) y de disparo ($\approx 0.3 V_{cc}$), estos tiempos de carga y descarga son independientes del voltaje de alimentación y en consecuencia el ciclo de trabajo y la frecuencia también.

Para la determinación de la impedancia del electrodo la frecuencia de oscilación fue fijada aproximadamente en 1 Khz, frecuencia que corresponde en promedio a la de transmisión de los impulsos nerviosos. La frecuencia puede calcularse mediante la siguiente relación⁽¹²⁾:

$$\text{Frecuencia} \approx \frac{1.44}{(R_1 + 2R_2) C_2}$$

Sustituyendo por los valores en el diagrama tenemos:

$$\text{Frecuencia} \approx \frac{1.44}{(6.8 + 2 * 3.3) .1} \approx 1.07 \text{ Khz.}$$

La amplitud de la señal es controlada mediante el divisor resistivo formado por R_3 y R_4 ajustándose la amplitud a aproximadamente 1 V. El capacitor C_1 conectado a la terminal de contról y tierra ayuda a eliminar ruido proveniente de la fuente de alimentación que pudiera causar falsos disparos.

2) El circuito puente se encuentra formado por los resistores R_5 , R_6 , R_7 (cuyo valor es la suma de R_{10} (calibración) y R_{11}) y R_8 el microelectrodo a valorar montado en la cámara portaelectrodos llena de solución

salina. Este circuito es excitado por la señal proveniente del oscilador y su funcionamiento es el siguiente:

La relación $R_6:R_7$ es variada ajustando R_7 hasta que la señal aplicada entre el punto A y D no varíe el potencial entre los puntos B y C; en consecuencia la diferencia de potencial en estos puntos es 0, lo cual es indicado por la una lectura de 0 mv por el multímetro digital. Así se sigue que $E_{AB} = E_{AC}$ y $E_{BD} = E_{CD}$, utilizando la ley de ohm $I_{AB} = I_{BD}$ e $I_{AC} = I_{CD}$ y en consecuencia la relación $R_5:R_6$ (donde R_6 es la impedancia del electrodo) es igual a la relación $R_6:R_7$, así si R_5 y R_6 son iguales el valor de R_6 (el electrodo) será igual al valor encontrado de R_7 .

3) El circuito de indicación de condición de equilibrio del puente está formado por un circuito filtro pasabajos formado por R_8 y C_3 que toma la señal de onda cuadrada proveniente de los puntos C y B y la convierte a un voltaje de CD que es indicado por el multímetro en la escala de mv, así cuando el puente está en equilibrio la diferencia de tensión es cero y la lectura del multímetro es 0 mv.

USO DEL PUENTE

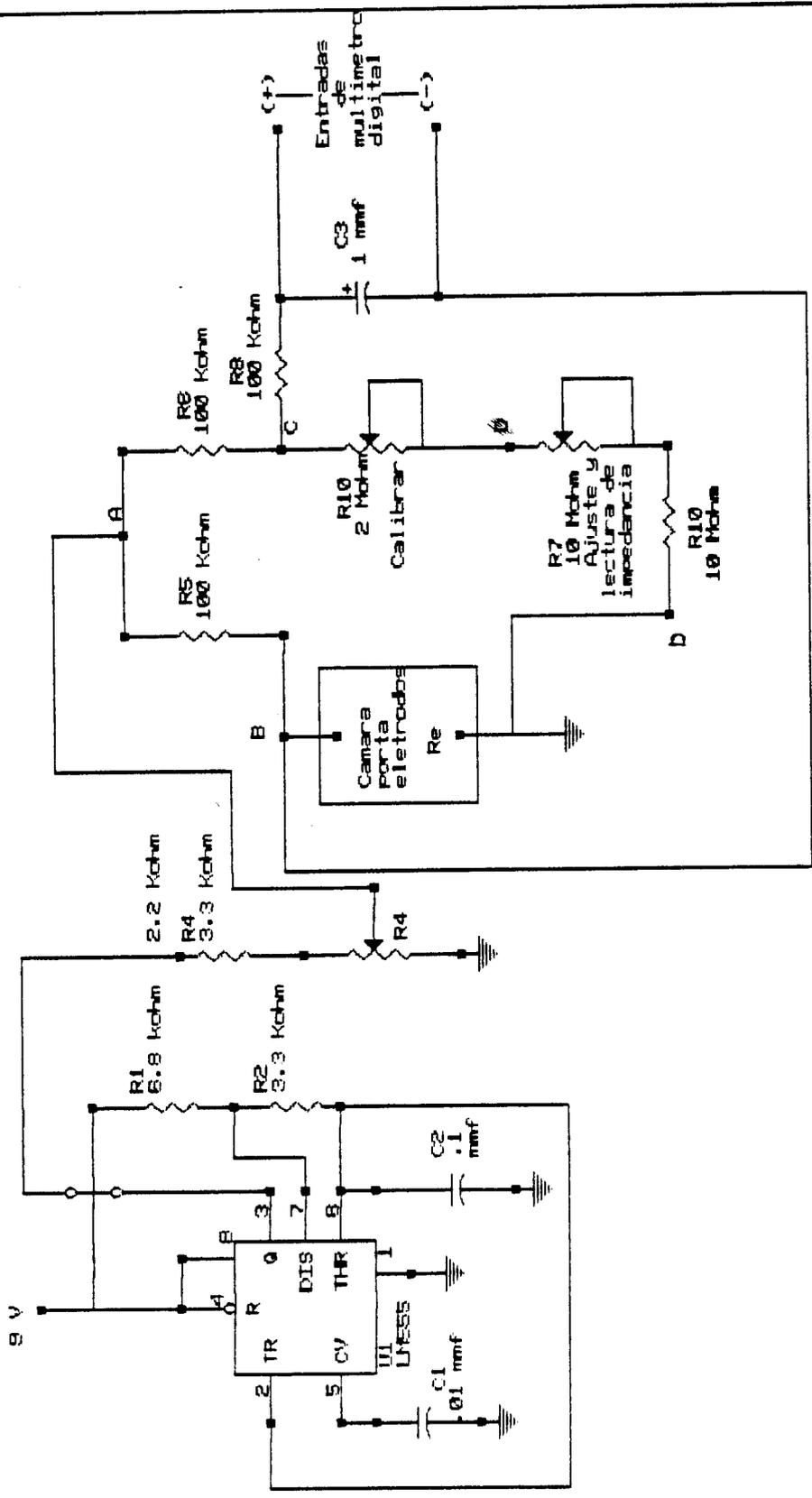
Ver figura 7 durante esta explicación.- Inicialmente es necesario calibrarlo, para ello hay que conectar las terminales marcadas CAMARA, a la cámara que contiene solución salina fisiológica, y la terminal marcada ELECTRODO, al porta electrodos del manipulador utilizado. Las terminales marcadas como + y - son conectadas a la entrada de un multímetro digital y este es seleccionado en el rango de lectura de mV.

Seguidamente se conecta una resistencia de carbón de valor igual a 12 Mohms al porta electrodos y es introducida a la cámara con solución salina, de manera que entre a la solución la otra terminal libre de la resistencia, se enciende el puente y se coloca la perilla marcada como AJUSTE, en la posición marcada con un 2 en el cuadrante de lecturas (a la impedancia leída en este cuadrante, se le suma una constante de 10 Mohms, en consecuencia la mínima lectura posible con la perilla de ajuste seleccionada en 0 ohms, es de 10 Mohms); seguidamente se enciende el puente y se ajusta la perilla marcada como CAL. hasta que el multímetro indique 0 mV.

Para leer la impedancia de un microelectrodo, se apaga el puente, cuidando de no alterar el ajuste de CAL. Y se retira la resistencia substituyendola en el portaelectrodo por el microelectrodo a medir, se enciende el puente y se gira la perilla marcada como AJUSTE hasta que el multímetro indique 0 mV, al valor marcado por la perilla, se le suma la constante de 10 Mohms y con ello se determina el valor del microelectrodo que está siendo medido.



FIGURA 7 PUENTE MEDIDOR DE IMPEDANCIAS PARA MICROELECTRODOS
En la siguiente página se encuentra impreso el diagrama eléctrico del puente.



Francisco J. Heredia Lopez	
Size Document Number 05	REV
A	Puente medidor de impedancias para microelectrodos
Date: February 9, 1990	Sheet 1 of 1

8.0 APENDICE C.

MONITOR DE AUDIO

Monitor de audio.- Este pequeño audio amplificador fue diseñado alrededor de un circuito integrado LM380 de National Semiconductor, con ganancia fijada internamente en 34 db. El circuito es sumamente sencillo de emplear y solamente requiere unos pocos componentes externos para poder obtener un amplificador de potencia de muy buenas características: bajo consumo sin señal aplicada, baja distorsión, amplio rango de voltaje de alimentación, potencia de salida aproximadamente de 2 W.

Con referencia al esquemático del circuito R_1 es el control o ajuste de volumen, C_1 se utiliza para eliminar ruidos de alta frecuencia provenientes tanto de la entrada de audio como originados por el movimiento del cursor de R_1 ; C_2 es un capacitor de desacoplo cuyo valor es recomendado por el fabricante. Con respecto a R_2 y C_4 estos forman una red para eliminar oscilaciones en el circuito bajo condiciones de carga. El capacitor C_3 se utiliza para bloquear el paso de DC y acoplar la señal de audio a la bocina.

El transformador T_1 , junto con el puente rectificador D_1 y el condensador C_5 forman la fuente de alimentación del circuito amplificador de audio.

USO DEL MONITOR

Simplemente conectése a una toma de corriente alterna, conéctese el cable coaxial de entrada de señal con el conector BNC a la fuente de señal a monitorear, enciendase el monitor y ajústese el nivel del volumen por medio del control de volumen en la parte posterior, marcado como VOL. El monitor es ilustrado en la siguiente página, figura 8, no se aprecian en ella los detalles señalados anteriormente.

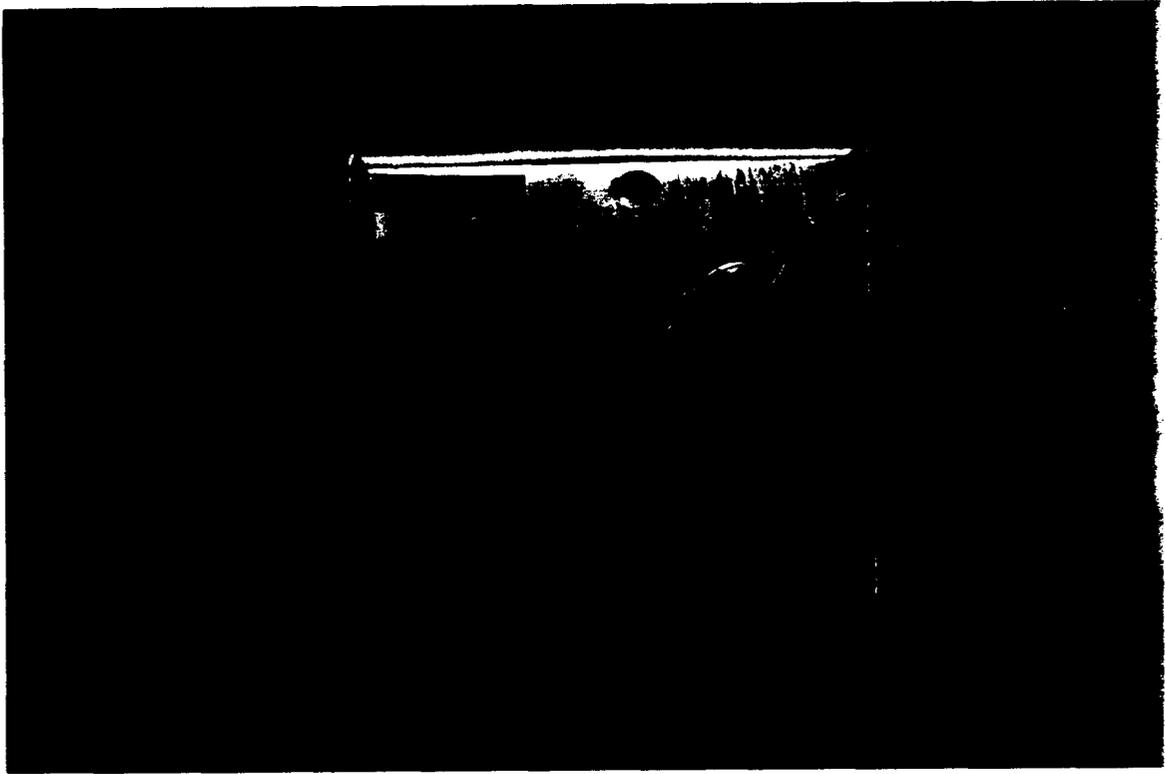
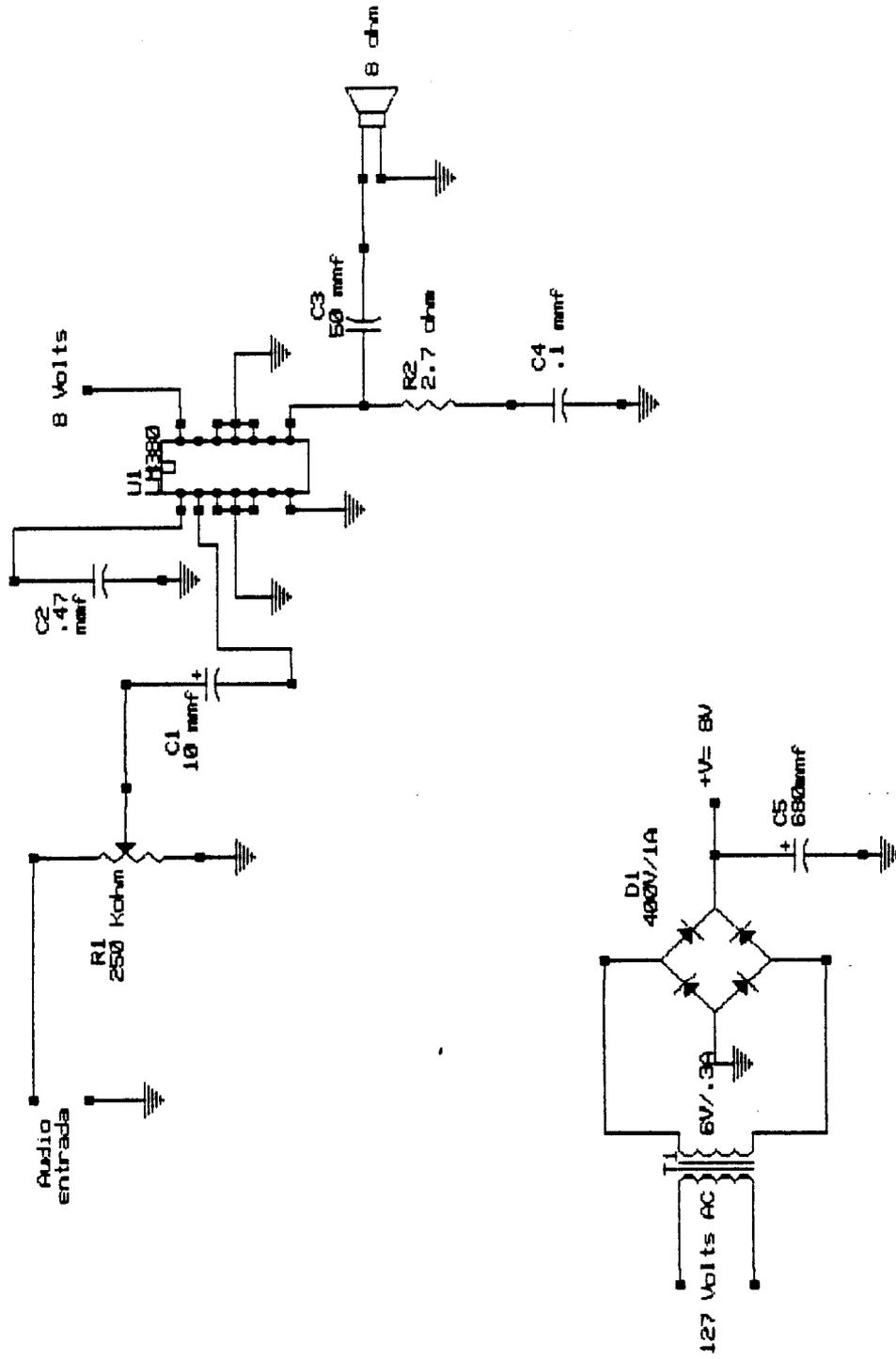


FIGURA 8 MONITOR DE AUDIO.
En la siguiente página se encuentra impreso el diagrama eléctrico del monitor.



Francisco J. Heredia Lopez

Size Document Number 03 REV

A Monitor de audio

Date: February 16, 1990 Sheet 1 of 1

9.0 APENDICE D.

AMPLIFICADOR Y FILTRO PARA REGISTRO EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE ACCION

Módulo amplificador de potenciales de acción.- Fue diseñado alrededor de circuitos integrados de la serie TL074 de Texas Instruments, los cuales contienen cuatro amplificadores operacionales con entradas J-FET, estos IC se escogieron por sus características: de bajo ruido, bajas corrientes de polarización a la entrada, baja distorsión armónica, alta impedancia de entrada.

El circuito consiste de las siguientes etapas:

1) Un preamplificador de instrumentación de alta impedancia de entrada (10^{12} M Ω) con una ganancia de 76 db (6200) acoplado capacitivamente (C_1 y C_2) para eliminar los voltajes de desbalance a la entrada. La ganancia del circuito puede calcularse de la siguiente manera:

Para la entrada diferencial de alta impedancia formada por U1A y U1B, la ganancia en voltaje está dada por⁽¹⁸⁾:

$$E = 1 + \frac{2R}{r} (e_1 - e_2)$$

donde: E es la ganancia en voltaje, R es igual a $R_2 = R_3$, r es igual a R_1 , y $e_1 - e_2$ la diferencia de voltaje aplicado a la entrada del amplificador. Las resistencias R29 y R30 se utilizan para eliminar las corrientes de desbalance a la entrada.

La ganancia de la siguiente etapa constituida por U1C, el cuál se encuentra en configuración de amplificador diferencial está dada por⁽¹⁸⁾:

$$E = \frac{R'}{r'}$$

donde R' es igual a $R_7 = R_6$, y r' es igual a $R_5 = R_4$.

Así pues la ganancia total (E_t) del preamplificador está dada por⁽¹⁸⁾:

$$E_t = \left[1 + \frac{2R}{r} \right] \left[\frac{R'}{r'} \right] (e_1 - e_2)$$

2) Un par de filtros Sallen-Key de componentes iguales, cuyo diseño es bastante sencillo. La Q o factor de calidad del filtro es determinada por la ganancia del amplificador, la literatura recomienda para este tipo de filtro una $Q = 0.707^{(13)}$; valor que es determinado de acuerdo a la siguiente relación:

$$R_b = R_a (2 - 1/Q)$$

donde refiriéndose al esquemático ya sea al filtro pasabajos construido alrededor de U1A o al pasa altos con U1B, R_a es igual a $R_{12} = R_{17}$ y R_b es igual a $R_{11} = R_{16}$; despejando de esta relación tenemos que :

$$Q = \frac{1}{2 - \frac{R_b}{R_a}}$$

o en forma más general:

$$R_b = 0.586 R_a$$

Las frecuencias de corte son fácilmente determinadas de acuerdo a la siguiente relación⁽¹⁵⁾:

$$F_c = \frac{1}{2\pi RC}$$

donde refiriéndose nuevamente al esquemático R es cualquiera de los arreglos resistivos de ambos filtros, $R_{8A} + R_9$ y $R_{8B} + R_{10}$ para el filtro pasabajos; $R_{14A} + R_{13}$ y $R_{14B} + R_{15}$ para el filtro pasa altos. C es cualquier capacitor seleccionable de cualquiera de los dos filtros, esto es de $C_4 - C_6$ y de $C_7 - C_{12}$ para el pasabajos. De $C_{14} - C_{16}$ a $C_{17} - C_{23}$ para el pasaaltos.

Las frecuencias de corte para cada filtro són:

Para el filtro pasa altas :

1 Hz
10 Hz
100 Hz
300 Hz
480 Hz

y para el filtro pasa bajos:

.482 KHz
 1 KHz
 5 KHz
 10 KHz
 16 KHz

Ambos filtros poseen controles rotatorios dobles (R_8 y R_{14} en el esquemático) que permiten variar sus frecuencias de corte desde f_c hasta $.1f_c$.

3) Un filtro de 60Hz del tipo de ranura construido alrededor de U1D, el filtro está formado por un par de filtros tipo T, un pasa altas formado por C27, C28, R28. Y un pasabajos formado por R26, R27, C29 conectados en paralelo. La frecuencia de corte se determina por la ecuación (1) (21), cuando $R = R28$ es igual a 1/2 de R2 donde R2 es igual a $R26 = R27$, y $C = C26$ que es igual a 2 veces C2 donde C2 es igual a $C27 = C28$.

$$f_c = \frac{1}{2\pi RC} \quad (1)$$

La salida del preamplificador, es enviada al filtro pasa altos y la salida de este está conectada a un interruptor S4 el cual permite que la señal sea tomada directamente o a través del filtro de ranura de 60 Hz, la salida así obtenida es enviada al filtro pasabajos y la salida de este o la señal sin filtrar son seleccionables por medio de un interruptor rotatorio S2 hacia un par de amplificadores no inversores de ganancia variable y ajustable en los rangos de x10 y x100, la ganancia en voltaje de estos dos amplificadores diseñados alrededor de U2C y U2D se puede calcular mediante la siguiente relación:

$$E = 1 + R_a/R_b$$

donde en el esquemático R_a es igual a $R_{18} + R_{19}$, para uno de los amplificadores y a $R_{22} + R_{23}$ para el otro amplificador. En el caso de R_b esta es igual a R_{20} o a R_{21} para el amplificador construido con U2C; o bien a R_{24} o a R_{25} para el caso del amplificador construido alrededor de U2D.

Las salidas de estos amplificadores se envían a través de los capacitores C30 y C31 con el fin de eliminar los voltajes de desbalance presentes en estos amplificadores, C32 y C33 se emplean para derivar a tierra señales de alta

frecuencia. Ambos amplificadores, se utilizan, uno para alimentar la tarjeta de adquisición de datos y para poder observar la señal en un osciloscopio y el otro para alimentar el monitor de audio.

La forma en la cual se conectan los filtros, así como las frecuencias de corte asignadas a ellos permite realizar un ajuste del ancho de banda a muestrear permitiendo de esta forma obtener una ventana de muestreo en las cual se rechazan todas aquellas frecuencias que están por encima o por debajo de sus límites.

Finalmente se listan las características principales del módulo las cuales se obtuvieron por medio de mediciones realizadas sobre el:

Ancho de banda (en línea):	.1 Hz - 20 Khz
Ancho de banda(por filtros)	.1 Hz - 16 Khz
Ganancia mínima a 1 Khz:	80 db
Ganancia máxima a 1 Khz:	116 db
Rechazo en modo común:	89 db
Pendiente de atenuación de los filtros:	23 db/decada
Impedancia de entrada:	
En modo diferencial:	6.18 E16 Ohm
En modo unipolar:	1.24 E17 Ohm
Impedancia de salida, a máxima ganancia:	200 Ohm

USO DEL AMPLIFICADOR

Ver figura 9 para esta explicación.- Conéctese el amplificador a una fuente dual de voltaje regulado con un rizo menor a 1 mV, el valor del voltaje de alimentación puede ir desde ± 3.5 V hasta ± 18 V, aunque se recomiendan ± 12 V. El cable de alimentación se encuentra en la parte posterior del equipo con la etiqueta POWER.

La señal a amplificar es introducida por medio del cable de señal blindado (no ilustrado en la figura), que en uno de sus extremos, cuenta con terminales para conectores tipo banana, marcados como G1, G2 y GND, donde G1 y G2 son las entradas de señal y GND la referencia eléctrica para la señal; cuando se desee amplificar la señal proveniente de un sólo electrodo conectese la terminal G2 por medio de un cable corto a la terminal GND y estas al cuerpo de sujeto. La señal a amplificar es introducida por la terminal libre G1.

En el caso de amplificar señales empleando un segundo electrodo de referencia, conéctese este último a la entrada G2 y el de señal a la G1, el cuerpo del sujeto es conectado a la terminal GND. El otro extremo del cable cuenta con un conector tipo DIN que se utiliza para hacer la conexión eléctrica al amplificador en la entrada marcada como SEÑAL.

Sobre la entrada de señal se encuentra un interruptor marcado como 60 Hz, el cual permite conectar o desconectar

el filtro de ranura de 60 Hz, el uso de este filtro se recomienda sólo en el caso de que no sea posible eliminar con una adecuada instalación la interferencia debida a la línea de alimentación.

Se observan en el frente los controles de los filtros del amplificador, marcados como FILTRO BAJO y FILTRO ALTO y sus correspondientes controles para "desplazar" sus frecuencias de corte con las etiquetas 1F y .1F. Estos filtros se utilizan para seleccionar la ventana de muestreo, así por ejemplo, si se selecciona en el "filtro alto" una frecuencia de corte de 1 KHz (que en realidad sería la frecuencia de corte del filtro pasabajos) y en el "filtro bajo" una frecuencia de corte de 300 Hz (que es la frecuencia de corte del filtro pasaaltos) se tendría una ventana con un ancho de banda de 700 Hz, en la cual señales por encima o por debajo de esta banda serían rechazadas. Ahora bién el hecho de disponer de los controles giratorios para desplazar las frecuencias de corte permite el poder "cerrar" aun mas la ventana de trabajo para lograr una discriminación mejor de las frecuencias que pasen por la ventana de muestreo.

La perilla central con las etiquetas FIL. LIN. y GND permite seleccionar la señal preamplificada ya sea después de ser filtrada (posición FIL.) o sin serlo (posición LIN.), en la posición GND las entradas de los amplificadores de salida són aterrizadas.

Sobre la perilla selectora se halla el interruptor general de alimentación y también se encuentra un diodo LED que se enciende cuando el equipo está en operación.

La sección del frente marcada con la etiqueta GANANCIA permite seleccionar y ajustar la ganancia de los amplificadores de salida. Los interruptores con las etiquetas X10 y X100, permiten seleccionar la ganancia máxima de los amplificadores y los controles con las etiquetas MIN y MAX permiten ajustar la ganancia desde un valor mínimo de 2, hasta, el valor máximo seleccionado por lo interruptores. La señal amplificada está disponible en los conectores BNC marcados como SALIDA.

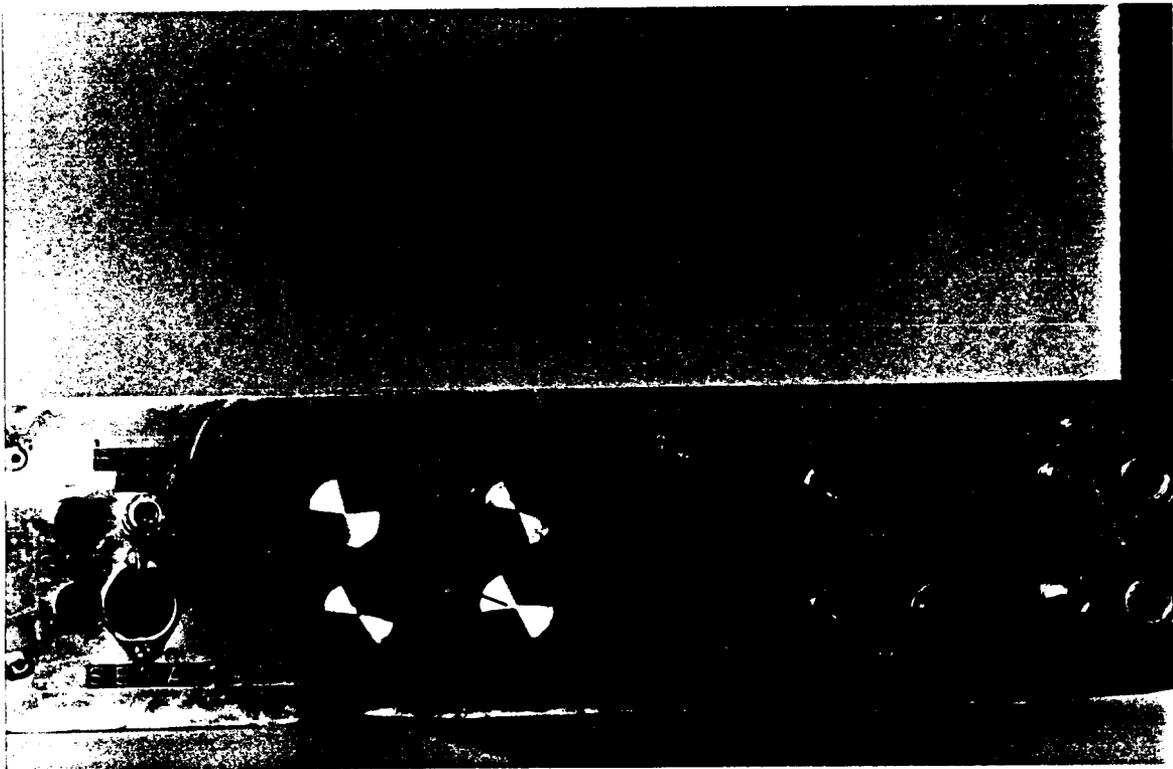
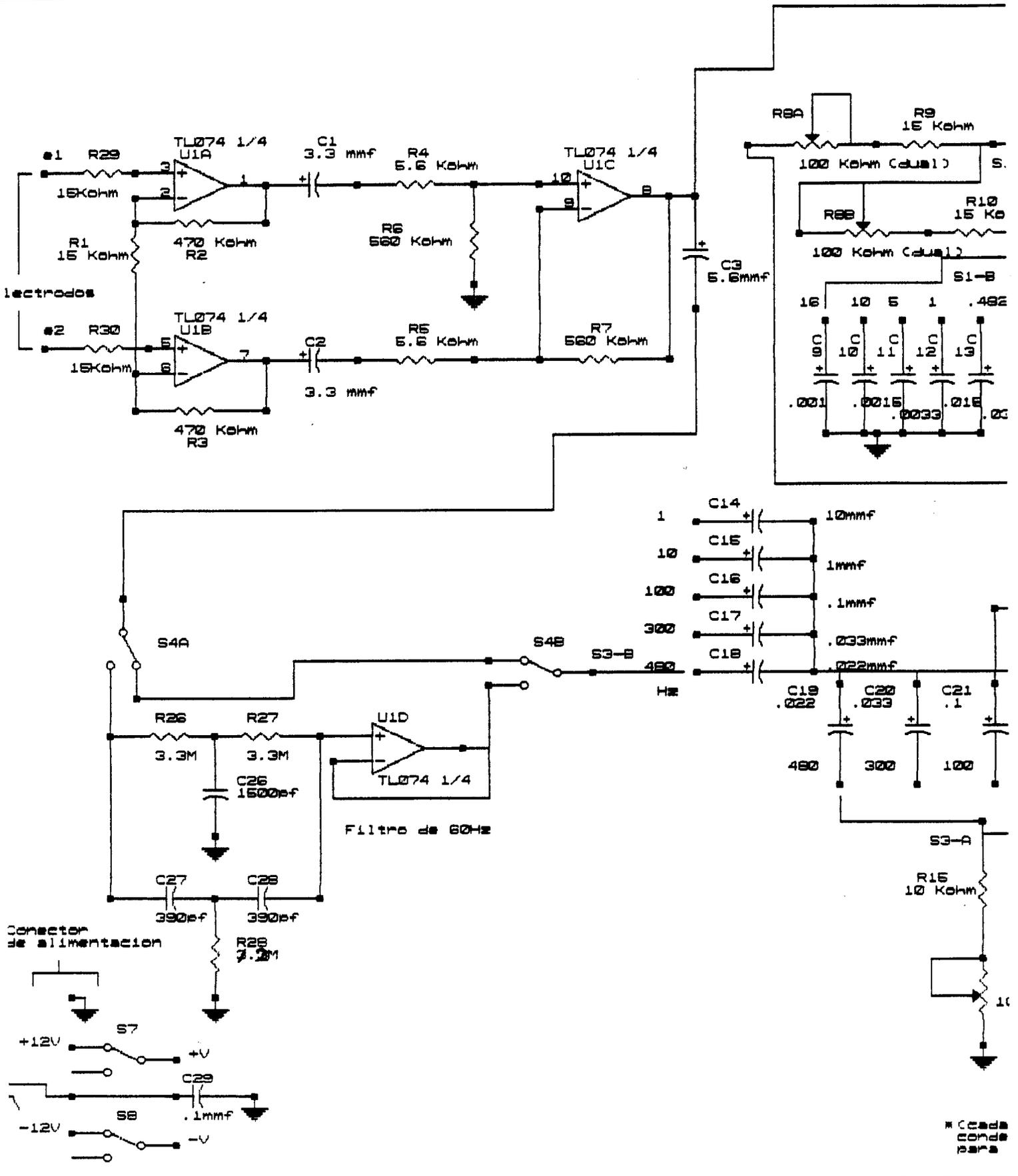
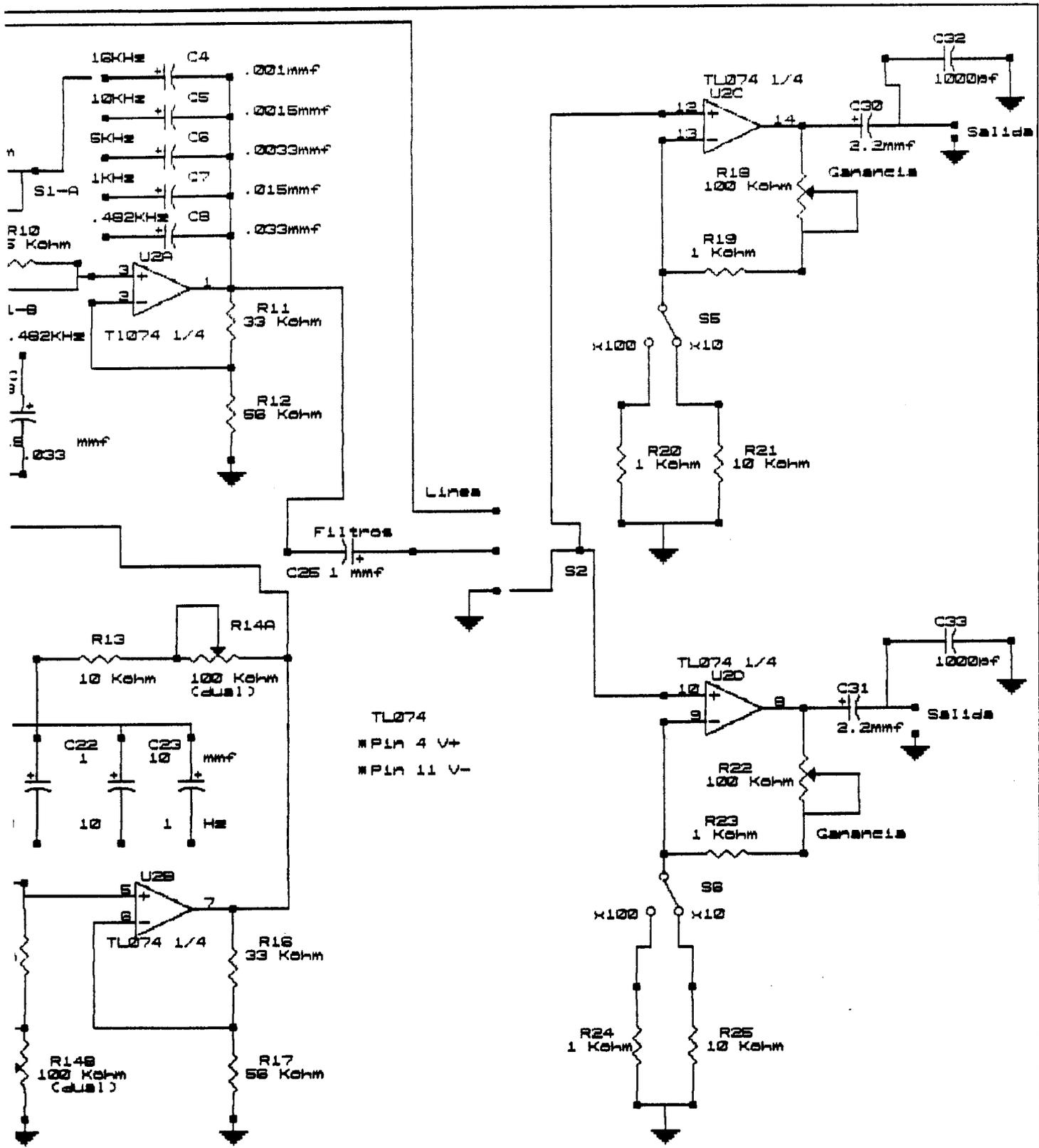


FIGURA 9 AMPLIFICADOR Y FILTRO PARA REGISTRO
EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE ACCION

En la siguiente página se encuentra impreso el
diagrama eléctrico del amplificador.





TL074
 *PLA 4 V+
 *PLA 11 V-

Se debe pin con un condensador de .1mmf (a desacopleo)

Francisco J. Heredia L.		
Size	Document Number 01	REV
8	Amplificador y filtro para detección extracelular de potenciales de acción	
Date:	February 25, 1990	Sheet 1 of 1

10.0 APENDICE E.

TARJETA DE ADQUISICION DE DATOS DE 8 BITS

10.1 Tarjeta de adquisición de datos.- Esta tarjeta fue diseñada alrededor de un par de circuitos integrados de National Semiconductor, un convertidor analógico digital (A/D) de 8 bits, el ADC 0804, y un convertidor digital analógico (D/A) también de 8 bits: DAC 0830. Ambos integrados tienen salidas el primero y entradas el segundo de tipo triestado, por lo cual pueden conectarse directamente al bus de la computadora.

Las etapas que componen esta tarjeta són:

1) Circuito decodificador de los puertos en los cuales se encuentran situados el A/D y el D/A

2) Circuito buffer bidireccional del bus de datos de la tarjeta.

3) Etapa analógica/digital.

4) Etapa digital/analógica.

1) Etapa decodificadora de los puertos del A/D y del D/A.

Esta etapa tiene como fin el decodificar los puertos 1000-1008 (3E8-3EF) para la etapa del convertidor A/D y el puerto 1016 (3F8) para la etapa del convertidor D/A.

Con referencia al esquemático los circuitos integrados utilizados para la decodificación de los puertos son el U1 que es un 74LS30 una compuerta NAND de ocho entradas que es conectada a las direcciones +A3 y de la +A5 a la +A9 del bus de la PC (el signo + significa que la dirección es activa en alto) así como a la señal -AEN (el signo - significa que la señal es activa en bajo) address enable, la cual es activa cuando el CPU coloca una dirección de memoria en el bus respectivo, esta señal es generada por pasar AEN a través de una compuerta inversora U2A 74LS04 con lo cual el 7430 responderá a las direcciones de puertos 3F8-3FF (1016-1023) y 3E8-3EF (1000-1007), y su salida es utilizada para habilitar el buffer bidireccional de la tarjeta U5 un 74LS245.

La misma salida del 7430 es combinada con la dirección -A4 generada a través del inversor U2B, en una compuerta OR U3A, para generar la señal de habilitación del convertidor digital a analógico: -D/A (en el esquemático las señales activas en bajo aparecen con un guión en la parte superior).

Y la misma salida del 7430 es combinada con +A4 en la OR U3B para generar la señal de habilitación del convertidor analógico digital: -A/D.

La señal -A/D es utilizada para habilitar el decodificador U4 74LS138 el cual en conjunto con las señales +A0 a +A2 permite decodificar las direcciones 1001 a 1007 (3E9-3EF) activas en bajo, de estas direcciones se utilizan la 1001 (3EF) como dirección de habilitación de lectura de dato y la 1002 (3EA) como dirección de habilitación del puerto utilizado para sensar el fin de conversión del A/D, y las otras se encuentran disponibles.

También son necesarias las señales de escritura y lectura en puerto: -IOW y -IOR respectivamente, las cuales son bufereadas a través de las compuertas OR U3D y U3C, esto se hace con el fin de que las señales en la ranura de expansión de la computadora nunca sobrepasen las especificaciones de IBM de mas de dos cargas TTL por línea⁽¹⁹⁾.

La señal bufereada de -IOR es utilizada para controlar la dirección del flujo de datos a través de U7.

2) Circuito buffer bidireccional del bus de datos.

En el esquemático es el circuito integrado U7: 74LS245, un buffer bidireccional triestado cuya entrada de habilitación -G es controlada por la señal -BOARD o de habilitación de tarjeta, esto con el fin de sacarla del modo triestado en el momento de direccionar la tarjeta y hacer esta última "presente" al bus de la ranura de expansión de la computadora. La dirección del flujo de datos de la tarjeta hacia la PC y viceversa es controlada por la señal -IOR conectada a la terminal DIR de U7 así, cuando IOR es activa los datos pasan desde B1-B8 hacia A1-A8 esto es del bus interno de datos de la tarjeta al bus de datos de la computadora.

3) Etapa analógica digital.

Está constituida por los siguientes circuitos:

- a) Convertidor analógico digital.
- b) Circuito de reloj para el convertidor.
- c) Fuente de voltaje de referencia del convertidor.
- d) Sumador algebraico de voltaje de entrada.
- e) Fuente de voltaje de referencia para el sumador.
- f) Circuito de puerto de fin de conversión.
- g) Circuito de entrada de alta impedancia.

a) Convertidor A/D .- Se utilizó un circuito integrado ADC 0804 de 8 Bitios con salidas triestado⁽¹¹⁾ de National Semiconductor que trabaja por aproximación sucesiva. El circuito no requiere ajuste de zero, la referencia de voltaje puede ser ajustada para permitir codificar a través de los 8 bits cualquier voltaje pequeño. Presenta una resolución de 8 bits, un error total de ± 1 LSB (bit menos

significativo). Otras características del integrado pueden consultarse ampliamente en el Linear Data Book de National Semiconductor. El convertidor es controlado por software a través de los puertos 1000, 1001 y 1002, y las señales de escritura (IOW) y lectura (IOR) en puerto; así para iniciar una conversión se le da al computador la orden de escribir en el puerto 1000 por ejemplo, un cero, esta cifra no tiene importancia. Al hacerlo la señal A/D se habilita poniendo un bajo o cero lógico en la entrada de CS del convertidor simultáneamente la computadora habilita la señal de escritura lo cual pone en bajo la terminal WR del convertidor con lo que se tienen las condiciones para iniciar una conversión. El final de la conversión es sentido a través del puerto 1002 (el integrado U6) esta parte es explicada con detalle en la sección f). Al concluir la conversión el dato digitalizado es tomado por darle la orden al computador que lea en el puerto 1001, nuevamente la señal A/D se hace activa poniendo un bajo en la entrada CS del convertidor y la señal proveniente del puerto 1001 se hace activa haciendo la entrada RD del convertidor baja con lo que se tienen las condiciones para leer el dato. El dato es pasado por el bus interno de la tarjeta hacia el bus de datos de la PC a través de U7.

b) Circuito de reloj⁽²⁰⁾. - Fue construido alrededor de tres inversores U2C, U2D y U2E. R1, R2 junto con C1 forman un lazo de retroalimentación con una constante de tiempo determinada por sus valores. De esta manera se obtiene un circuito oscilador cuya frecuencia es determinada por estos componentes. El funcionamiento del circuito es el siguiente: Al conectar la alimentación al circuito C1 se descarga, y asumiendo que la salida 8 de U2D está en nivel lógico bajo entonces la salida 6 de U2C está en un nivel lógico alto así habrá un flujo de corriente a través de R1 y R2 donde la corriente que circule por R1 cargará a C1 en un tiempo determinado por la constante RC que ellos forman, cuando C1 alcance por la carga acumulada un nivel lógico alto unos 2 voltios típico, la entrada 5 de U2C estará en un alto y su salida 6 pasará a un bajo lo cual provocará al estar conectada a la entrada 9 de U2D que la salida 8 de esta última inversora pase a un alto, con esto se completa un medio ciclo de reloj, ahora C1 descargará a través de R2 en un tiempo determinado por la constante RC que ellos forman cuando C1 se ha descargado la entrada 5 de U2C se pasa nuevamente a un nivel lógico bajo lo cual provoca finalmente que la salida 8 de U2D pase a un nivel lógico bajo, con esto se completa el otro medio ciclo de reloj. U2E maneja la carga presentada por la entrada de reloj del A/D evitando una carga excesiva en el circuito oscilador que pudiera alterar su frecuencia. Finalmente en base a la descripción anterior podemos calcular la frecuencia a la cual el circuito oscilará mediante la siguiente relación inferida:

$$F_{o.c.} \approx \frac{1}{(R_1 + R_2)C_1 + 3T_p}$$

donde $F_{o.c.}$ es la frecuencia de oscilación y T_p es el retardo de la compuerta, típicamente unos 10 ns para una LS. Para el circuito mostrado en el esquemático:

$$F_{o.c.} \approx \frac{1}{(1 + 1 \times 10^3)330 \times 10^{-12} + 3(10 \times 10^{-9})}$$

$$F_{o.c.} \approx 1.45 \text{ MHz.}$$

c) Fuente de voltaje de referencia del convertidor.- Está construida alrededor de un circuito integrado U8 de voltaje de referencia el LM336 de 5V. R3 limita la corriente que entra al integrado a 2.6 mA. Los diodos D1 a D4 junto con los resistores R4 a R6 forman un lazo de estabilización a las variaciones de temperatura y permiten por medio de R5 ajustar el voltaje de referencia a 5.000 V.

R7 junto con R8 un variable de 20 vueltas forman un divisor de tensión para una referencia de 2.500 V. R9 y R10 similarmente forman un divisor de voltaje para la referencia de 1.250 V. Así se dispone de dos rangos de voltaje de entrada para el A/D, los cuales son seleccionables por medio del interruptor tipo DIP SW1.

d) Sumador algebraico.- Está constituido por R11 y R12. R11 está conectada a una fuente de referencia idéntica a la del convertidor A/D. R12 Recibe el voltaje de entrada a ser digitalizado. El nodo formado por R11 y R12 es el punto de voltaje de entrada al convertidor A/D. El circuito presenta al convertidor un voltaje en su entrada igual al valor de la referencia seleccionada cuando se aplica un voltaje de 0 V a la entrada de la tarjeta, esto hace que el A/D presente como salida un 127 (la mitad del máximo valor que puede manejar en forma digital) el cual mediante manejo de software es mostrado como 0.00 V. Así, si el voltaje de entrada es positivo se añade al voltaje presente en el nodo y si es negativo se resta de él, de esta manera, si es muestreado un voltaje positivo de amplitud igual a la referencia, este voltaje se suma al voltaje de la referencia y el convertidor muestra a su salida un 255 lo cual es por software interpretado y desplegado como el voltaje máximo positivo; por el contrario si el voltaje a muestrear tiene una amplitud negativa igual al voltaje de referencia este voltaje se resta del de referencia dando 0 V a la entrada del convertidor y este muestra a su salida un 0 lo cual por software es desplegado como el voltaje negativo máximo; así

se pueden manejar tanto voltajes positivos como negativos cuya máxima amplitud es determinada por los voltajes de referencia del sumador y del convertidor.

e) Fuente de referencia para el sumador.- Este circuito es idéntico al circuito de referencia del convertidor A/D y está constituido por U9, R13, D5 a D8, R14 a R16 . R17 y R18, R19 y R20, las diferentes tensiones de referencia son seleccionables por medio de SW2.

f) Circuito de puerto de fin de conversión.- Lo constituye U6 un 74LS244 que es un buffer de ocho bits, al cual sus entradas de habilitación 1G y 2G le son controladas por la señal del poste 13, -Y2, proveniente del decodificador U4, esta señal corresponde al puerto 1002. Las entradas al buffer con excepción de la correspondiente al bit menos significativo (1A1) son conectadas a tierra y a la entrada 1A1 se conecta la señal de interrupción INT proveniente del A/D, de esta forma es posible sensar cuando éste ha concluido la conversión. Así cuando la conversión está en proceso, INT está en alto y si se lee el puerto 1002, U6 pondrá a su salida un 1, cuando la conversión ha concluido INT pasa a bajo y al leer el puerto 1002 se obtendrá a la salida de U6 un 0. La señal de INT se encuentra disponible para conectarla a las entradas de interrupción IRQ2, IRQ3, e IRQ5 de la PC en el bus de las ranuras de expansión, a través del interruptor SW4.

g) Circuito de entrada de alta impedancia.- Consiste en un amplificador operacional TLO71 en configuración de seguidor de voltaje. El TLO71 se escogió por las siguientes características: tiene entradas J-Fet de muy alta impedancia, bajo ruido, baja distorsión, muy baja corriente de polarización a la entrada, y es de fácil adquisición en el comercio. El voltaje de desbalance a la entrada es anulado por medio de R22. R21 evita que la entrada del operacional quede flotante y en consecuencia que el operacional se sature.

Finalmente se listan a continuación las características principales de la sección de adquisición de señales analógicas:

1) Alta impedancia de entrada ya que las señales son recibidas por un amplificador operacional con entradas J-Fet en configuración de seguidor de voltaje.

2) Rango de entrada de la señal: ± 5.0 , ± 2.5 AC o DC, seleccionable por interruptores internos.

3) Máxima frecuencia de la señal de entrada: 2.5 Khz, controlándose la tarjeta con lenguaje de alto nivel.

4) Máxima resolución:

Rango	Resolución
5.00 V	10 mV.
2.50 V	5 mV

4) Etapa digital analógica.

Está constituida por los siguientes circuitos:

- a) Convertidor digital analógico (D/A).
- b) Fuente de voltaje de referencia.
- c) Circuito buffer.

a) Convertidor digital analógico.- Se utilizó un DAC 0830 convertidor de 8 bits de National Semiconductor, el cual posee un máximo error en su linealidad del 0.05%, un tiempo de actualización de la corriente de salida de 1 μ s, presenta entradas triestado por lo cual es fácilmente interfaceado con el bus de la computadora; el circuito tiene capacidad de entradas en línea, bufereadas y doblemente bufereadas. Para mayores detalles del integrado puede consultarse el Linear Data Book de National Semiconductor. Con referencia al esquemático el convertidor se encuentra alambrado para operación bufereada de sus entradas, esto es el dato es cargado a un "latch" (retenedor de datos) e inmediatamente convertido a una corriente, la cual permanece constante mientras no se actualize la palabra digital en la entrada del convertidor. El convertidor es controlado por las señales -D/A e -IOW, así cuando se quiere escribir un dato en forma analógica se le dice a la computadora que escriba ese dato en el puerto 1016 esto provoca que la señal -A/D se haga activa poniendo un bajo en la entrada CS del chip y simultaneamente la señal -IOW proveniente del bus de la computadora se hace activa poniendo un bajo en la entrada WR1 del convertidor con lo cual se tienen las condiciones necesarias para que el convertidor capture el dato (lo cargue a su "latch" interno) que se encuentra presente en ese momento en el bus de datos; el dato digital ya almacenado es inmediatamente convertido a una corriente I_{out} de valor directamente proporcional al producto del voltaje de referencia del convertidor y la palabra digital a la entrada:

$$I_{out1} = \frac{V_{ref}}{15K\Omega} \times \frac{\text{Digital Input}}{256}$$

donde V_{ref} es el voltaje de referencia en el pin 8, $15 K\Omega$ es el valor nominal de la red resistiva interna y Digital Input es el dato de entrada en base decimal. Existe en este convertidor una segunda salida I_{out2} que provee una corriente proporcional al complemento de la entrada digital:

$$I_{out2} = \frac{V_{ref}}{15K\Omega} \times \frac{255 - \text{Digital Input}}{256}$$

Debido a la necesidad de manejar salidas de voltajes bipolares y con el fin de simplificar la circuitería asociada, el convertidor es usado con su red resistiva en configuración de selectora de voltaje (Voltage Switching Configuration) (1). El voltaje de referencia es aplicado a una de las salidas de corriente I_{out1} para código binario o a I_{out2} para binario complementario y el voltaje de salida es tomado en el pin 8 V_{ref} . La salida del convertidor es ahora un voltaje V_{out} en función del código digital aplicado y en un rango dado por la siguiente relación:

$$0V < V_{out} < \frac{255}{256} V_{ref}$$

o bien :

$$V_{out1} = \frac{D_{10}}{256} V_{ref} \quad (1)$$

donde D_{10} es la palabra digital de entrada, escrita en base decimal. Dado que la salida del convertidor es ahora un voltaje podría utilizarse directamente pero la impedancia de la salida es alta por lo que un amplificador operacional es recomendable para disminuirla y aislar el circuito.

b) Fuente de voltaje de referencia.- Es un circuito similar al utilizado para la etapa de conversión de A/D, excepto que solamente se utilizan los voltajes de referencia de 2.500 V y de 1.280 V ya que es necesario que exista una diferencia de tensión de por lo menos 9 V entre el voltaje de alimentación y el voltaje de referencia para disminuir al

máximo errores de linealidad y ganancia dentro del convertidor. El circuito está formado por U12, R23 a R26, D9 a D12 y por R27 - R28 y R29 - R30.

c) Circuito buffer.- El voltaje generado en el poste 8 del convertidor es utilizado como entrada a un amplificador diferencial de ganancia unitaria U13 construido alrededor de un amplificador operacional TL071 (seleccionado por sus características anteriormente discutidas en el inciso g de la etapa de conversión analógica a digital); R33 es un multivuelta y se utiliza para cancelar el voltaje de desbalance a la entrada del operacional. Para un voltaje $V_{i.n.1}$ aplicado a la entrada inversora del operacional R31 y R32 forman un lazo de retroalimentación y fijan la ganancia en voltaje a la salida del mismo ($V_{o.ut.}$) de acuerdo a la siguiente relación:

$$V_{o.ut.} = - \frac{R2}{R1} V_{i.n.1}$$

si $R2 = R31$ y $R1 = R32$ y ambas son iguales entonces por simplificación:

$$V_{o.ut.} = - V_{i.n.1} \quad (2)$$

para un voltaje de entrada $V_{i.n.2}$ aplicado a la entrada no inversora del operacional la ganancia de voltaje viene dada por:

$$V_{o.ut.} = \left(1 + \frac{R2}{R1}\right) V_{i.n.2}$$

y $R2, R1$ son los mismos resistores mencionados, por lo que simplificando:

$$V_{o.ut.} = 2 V_{i.n.2} \quad (3)$$

donde $V_{i.n.2}$ es el voltaje proveniente del poste 8 del convertidor.

Combinando las ecuaciones (2) y (3) obtenemos que el voltaje a la salida del amplificador $E_{o.ut.}$ viene dado por:

$$E_{out} = 2 V_{in2} - V_{in1} \quad (4)$$

Consideremos ahora el aplicar una palabra en binario, un 128 el cuál de acuerdo a la ecuación (1) se traduce en un voltaje cuyo valor es :

$$V_{out1} = \frac{128}{256} 2.5 \text{ V}$$

$$V_{out1} = 1.25 \text{ V} = V_{in2}$$

donde 2.5 V es uno de los dos voltajes de referencia seleccionables por SW3. Estos 1.25 V son aplicados a la entrada no inversora del operacional; y dado que un extremo de R32 está conectado permanentemente a la fuente de referencia y aplicando este voltaje V_{in1} a la entrada inversora, tenemos que la tensión de salida será de acuerdo a la ecuación (4):

$$E_{out} = 2(1.25 \text{ V}) - 2.5 \text{ V}$$

$$E_{out} = 0 \text{ V}$$

Si ahora se introduce un código binario, un 255, entonces $V_{in2} = 2.5 \text{ V}$, $V_{in1} = 2.5 \text{ V}$ y salida será de:

$$E_{out} = 2(2.5 \text{ V}) - 2.5 \text{ V}$$

$$E_{out} = 2.5 \text{ V}$$

Y si se introduce un cero en binario, entonces $V_{in2} = 0 \text{ V}$ y $V_{in1} = 2.5 \text{ V}$ y la salida será de:

$$E_{out} = 2(0 \text{ V}) - 2.5 \text{ V}$$

$$E_{out} = -2.5 \text{ V}$$

De esta forma puede observarse el como es posible manejar voltajes de salida bipolares con entradas en código binario simple.

Finalmente se listan las características más sobresalientes de la etapa D/A:

1) Capacidad de manejo de señales bipolares.

2) Máxima amplitud de la señal escrita:
seleccionable en: ± 1.28 V. y ± 2.5 V

2) Frecuencia máxima de escritura: 555 Khz.

3) Máxima resolución:

± 1.25 V 10 mV.

± 2.5 V 20 mV.

10.2 OPERACION DE LA TARJETA DE ADQUISICION.

La tarjeta es insertada en cualquier ranura de expansión de un computadora PC compatible, en éste trabajo se usaron una DENKI CORONA y una ELEKTRA, ambas de 4.77 Mhz. Las señales a ser digitalizadas o bien las reconvertidas a su forma analógica están disponibles en los conectores bananas marcados como Vin y Vout en la escuadra de soporte de la tarjeta, que queda visible en la parte trasera de la computadora.

La tarjeta es controlada totalmente por software (ver apéndice F, para referencia), en lo referente a la adquisición de los datos y la frecuencia a muestrearlos, así como en la reconversión de datos de digital a análogo.

El rango de señales a manejar se selecciona de la siguiente forma:

Selección del rango de voltaje de entrada.- Este es seleccionado por medio de los interruptores SW1 y SW2 de acuerdo a la siguiente tabla:

	SW1	SW2
Rango ± 5 V:		
Posición		
1	Fuera	Puesto
2	Puesto	Fuera
3	Fuera	Fuera
4	Fuera	Fuera

Rango ± 2.5 V:

Posición		
1	Fuera	Fuera
2	Fuera	Puesto
3	Puesto	Fuera
4	Fuera	Fuera

Rango de voltajes de escritura.- Són seleccionados por medio de SW3 de acuerdo a la siguiente tabla:

SW4

Rango \pm 2.5 V:

Posición

1	Puesto
2	Fuera
3	Fuera
4	Fuera

Rango \pm 1.28 V:

Posición

1	Fuera
2	Puesto
3	Fuera
4	Fuera

Para un funcionamiento confiable de la tarjeta se recomienda calibrarla al instalarla en la computadora, el procedimiento se explica a continuación:

Calibración:

Etapa analógica.- Ajustese según la siguiente tabla:

Ajuste	Punto de prueba	Voltaje
R5	PP1	5.000 V
R10	PP2	1.250 V
R8	PP3	2.500 V
R15	PP4	5.000 V
R18	PP5	2.500 V
R20	PP6	1.250 V

Los ajustes de los puntos de prueba deben realizarse seleccionando cada referencia de voltaje con el fin de que los divisores de tensión tengan presente la carga normal de trabajo.

Cortocircuite la entrada de voltaje de la tarjeta y ajuste R22 para una lectura de 0.000 V en el pin 6 de U10.

Etapa digital.- Ajústese según la siguiente tabla:

Ajuste	Punto de prueba	Voltaje
R25	PP7	5.000 V
R30	PP8	2.500 V
R28	PP9	1.250 V

Nuevamente estos ajustes deben realizarse seleccionando cada referencia de voltaje a fin de que los divisores de voltaje tengan presente la carga normal de trabajo.

Envíe al convertidor una orden de escritura de 0.00 V, puede usarse el programa de demostración en el apéndice F y ajústese R33 para una salida de 0.00 V.

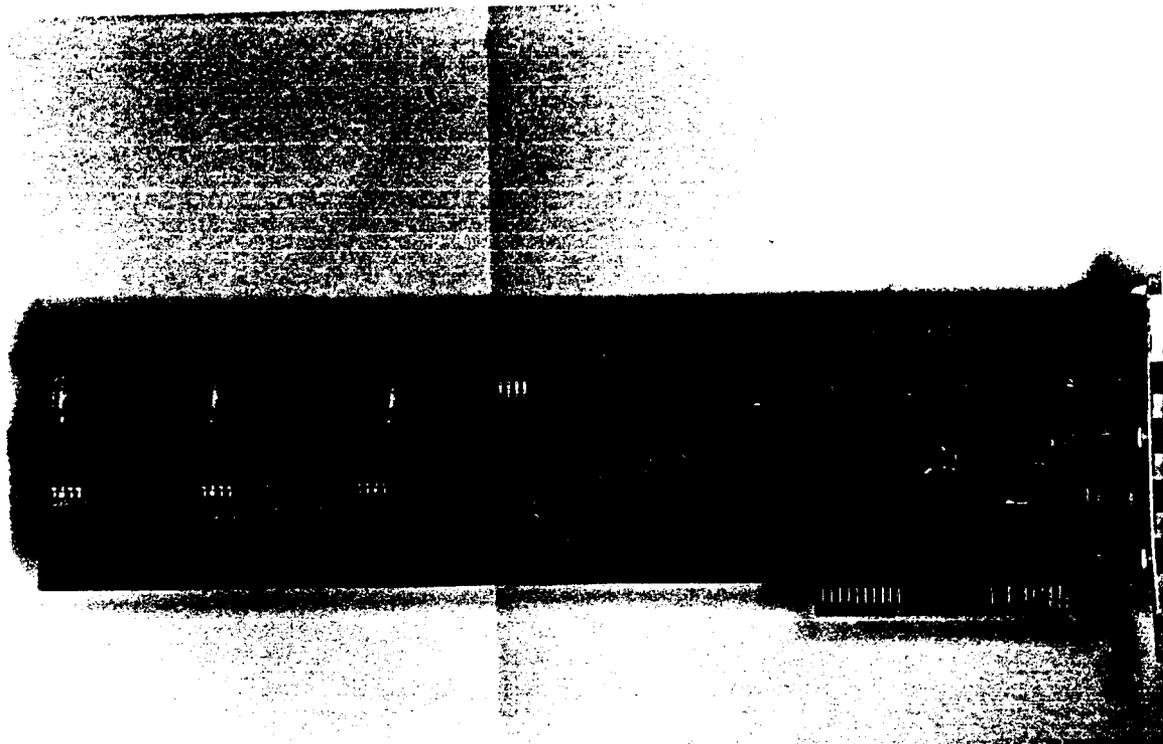


FIGURA 10A TARJETA DE ADQUISICION DE 8 BITS.- Vista del lado de componentes.

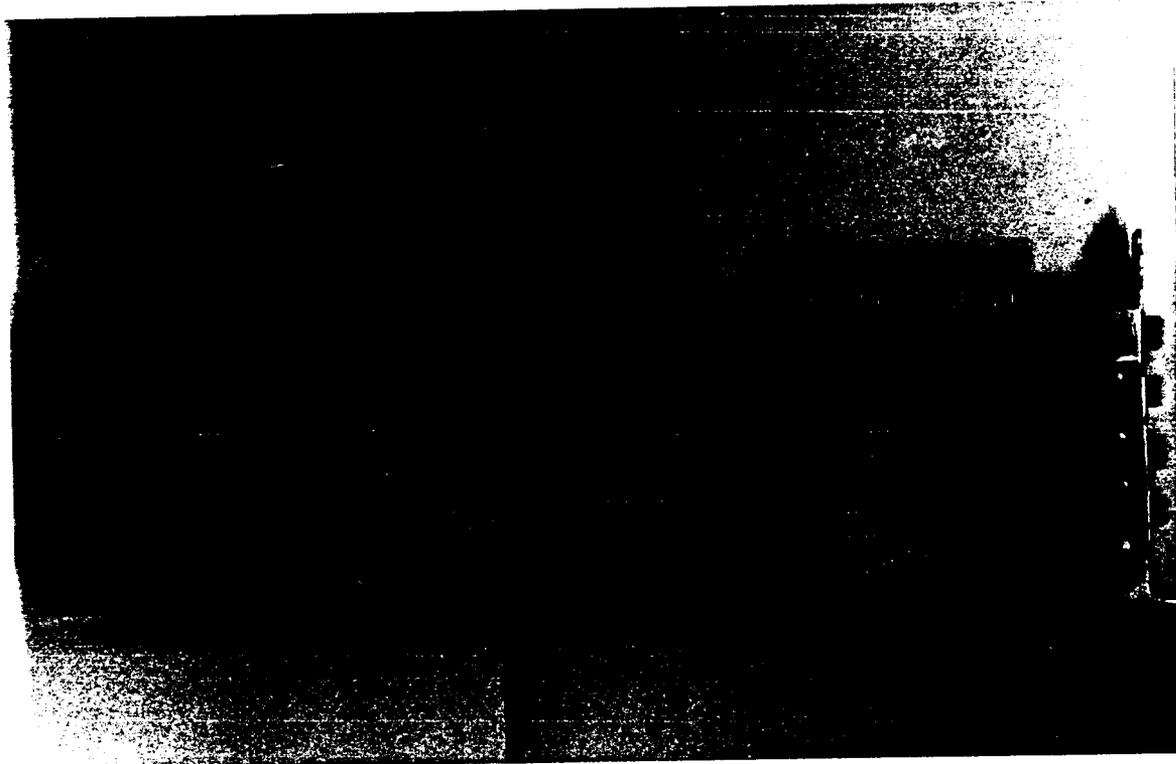
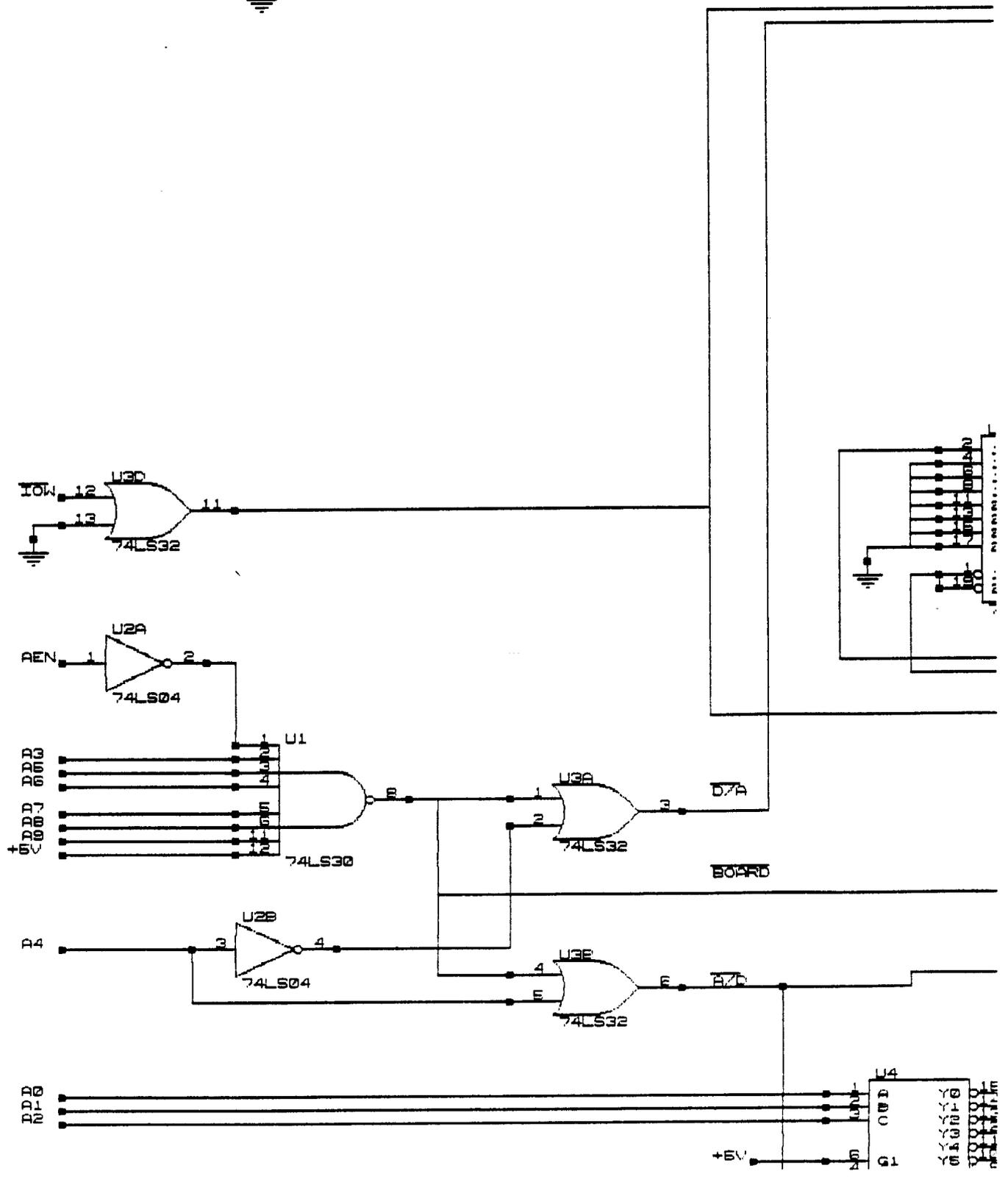
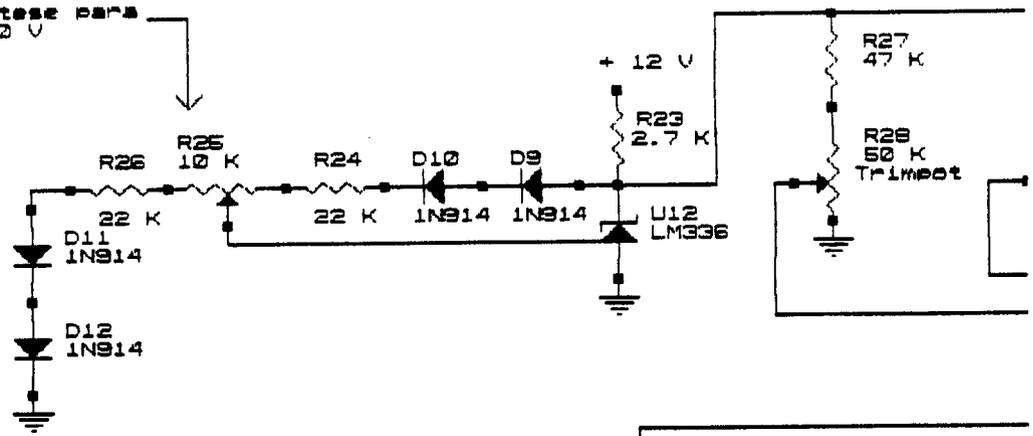
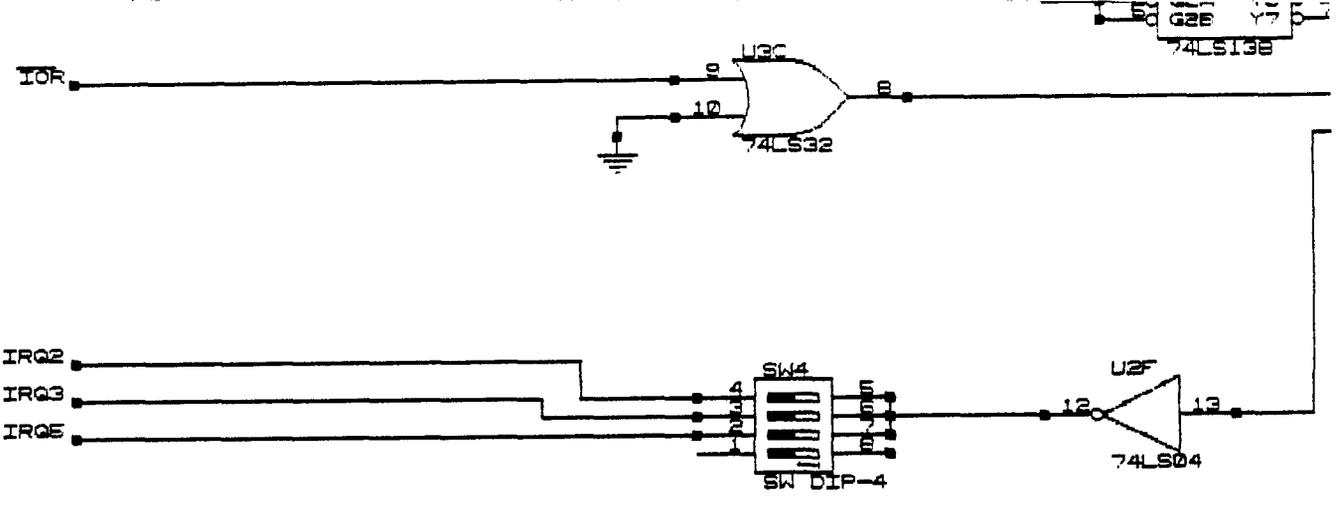


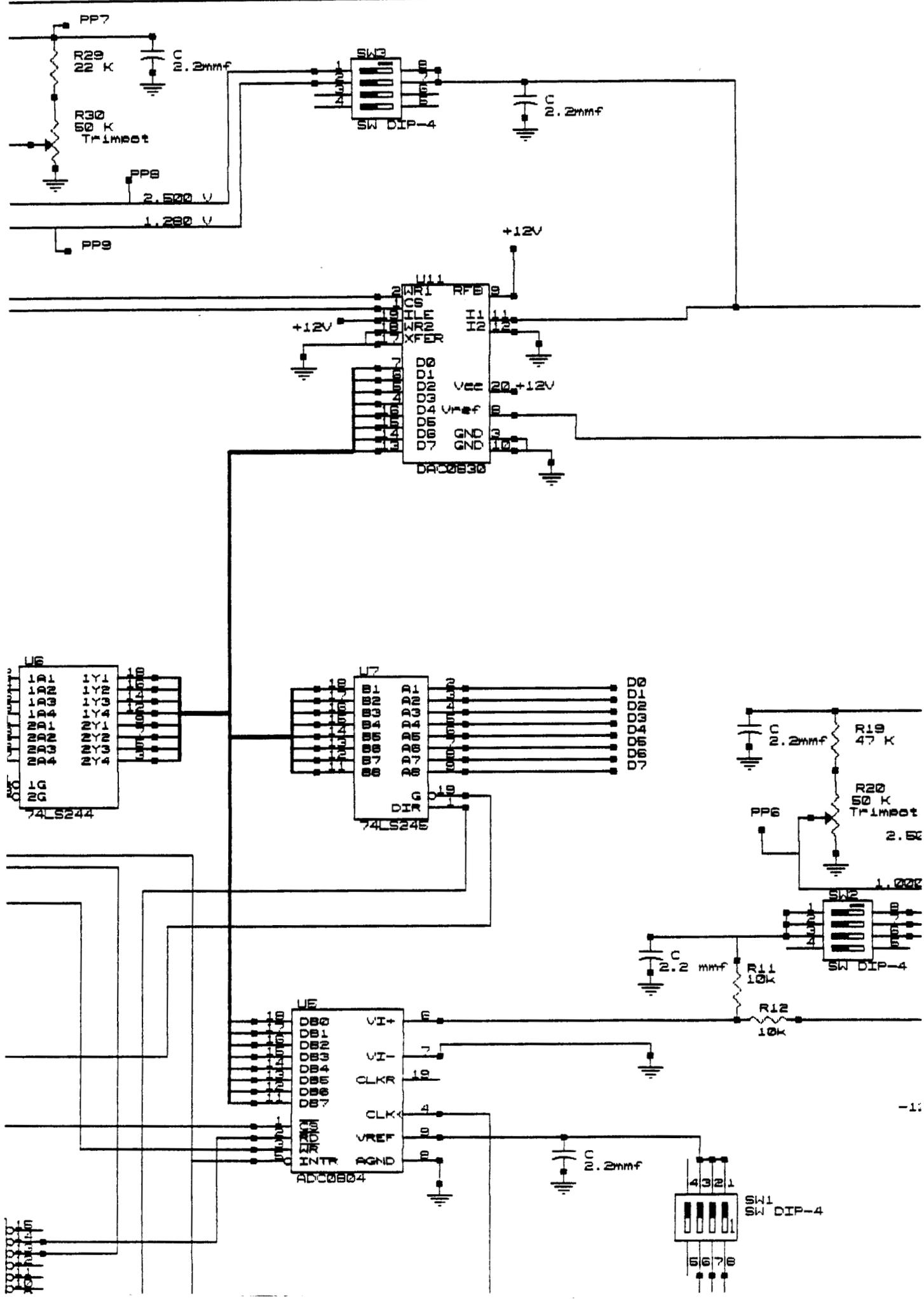
FIGURA 10B TARJETA DE ADQUISICION DE 8 BITS.- Vista del lado de soldaduras.

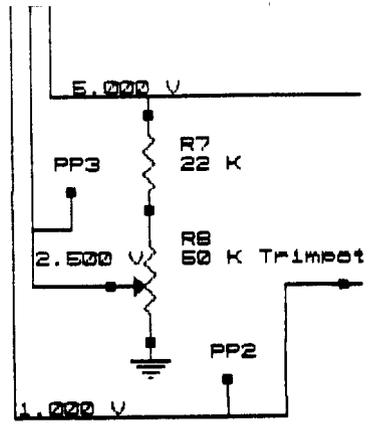
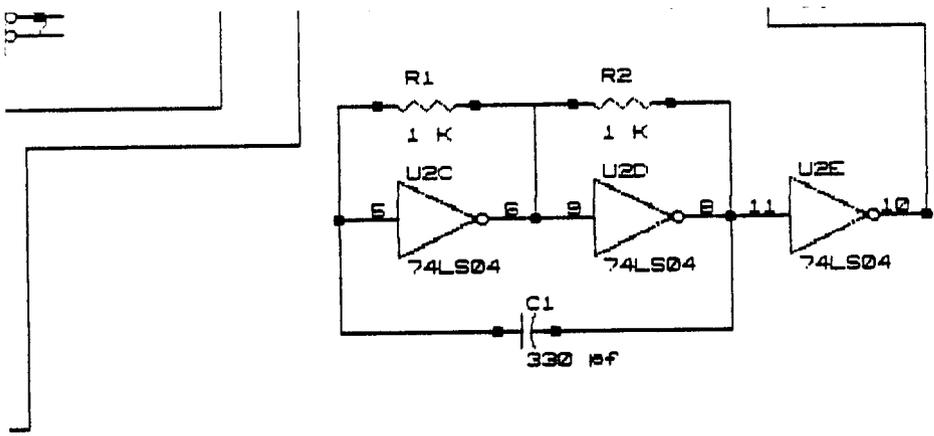
En la siguiente pagina se encuentra impreso el diagrama eléctrico de la tarjeta.

Adjustable Data
5.000 V



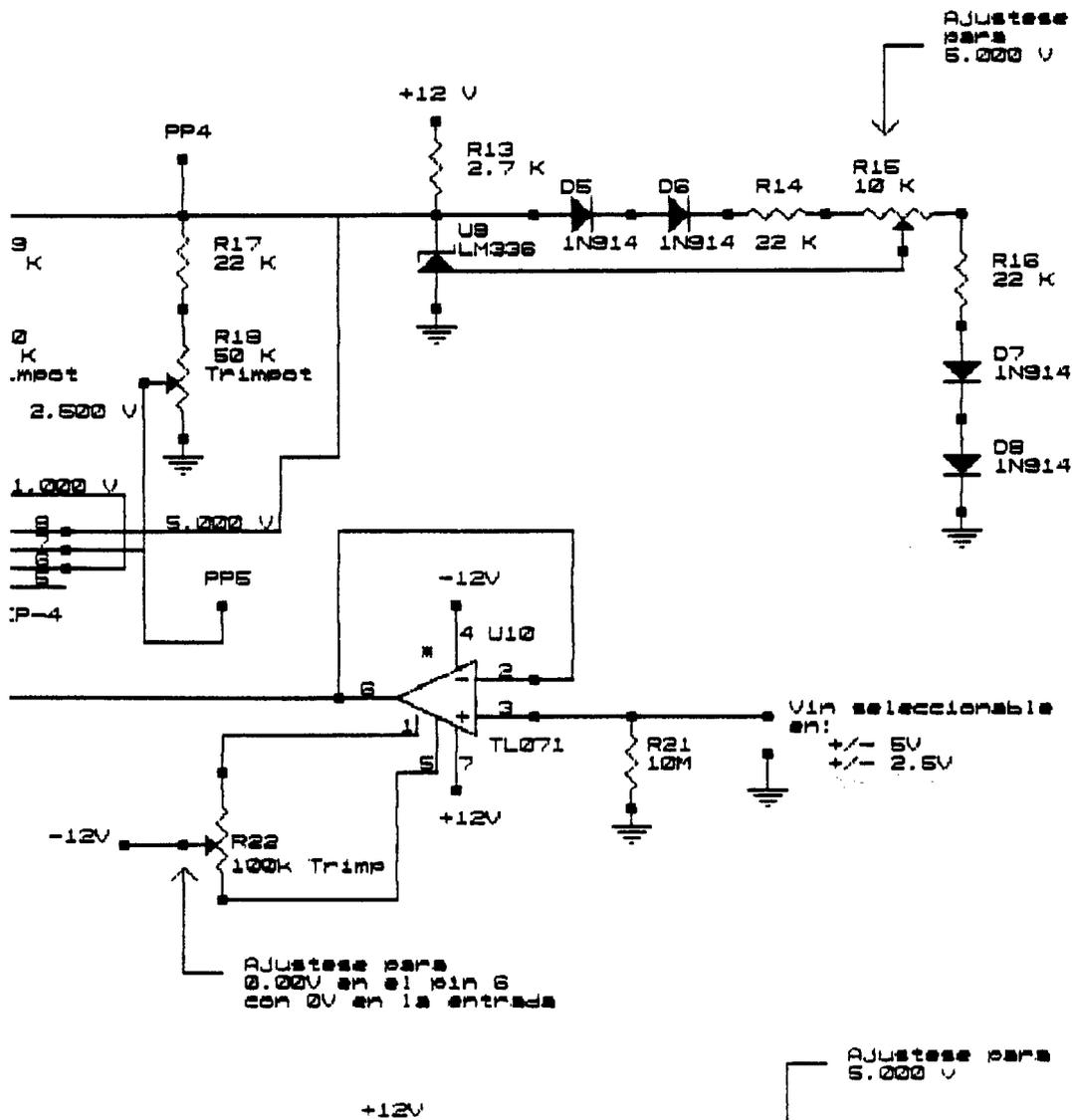
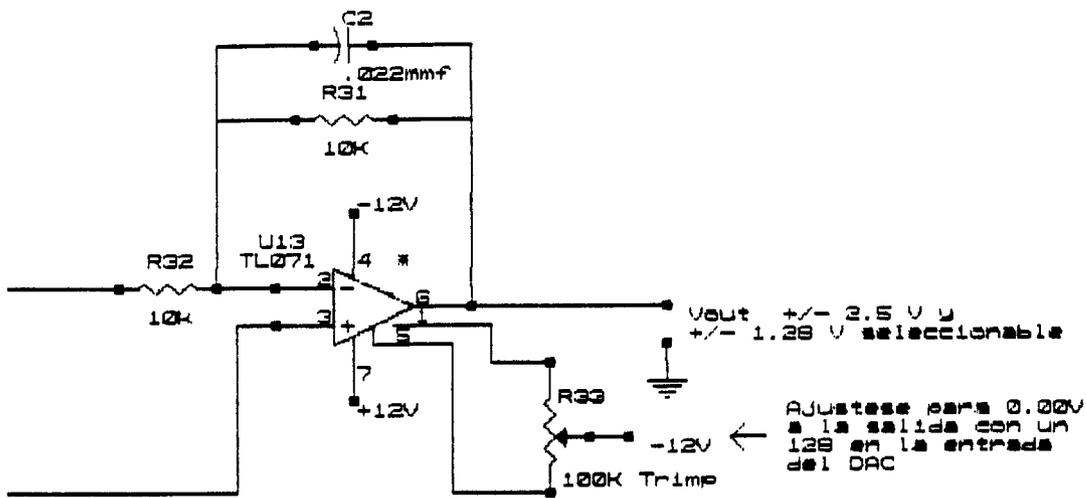


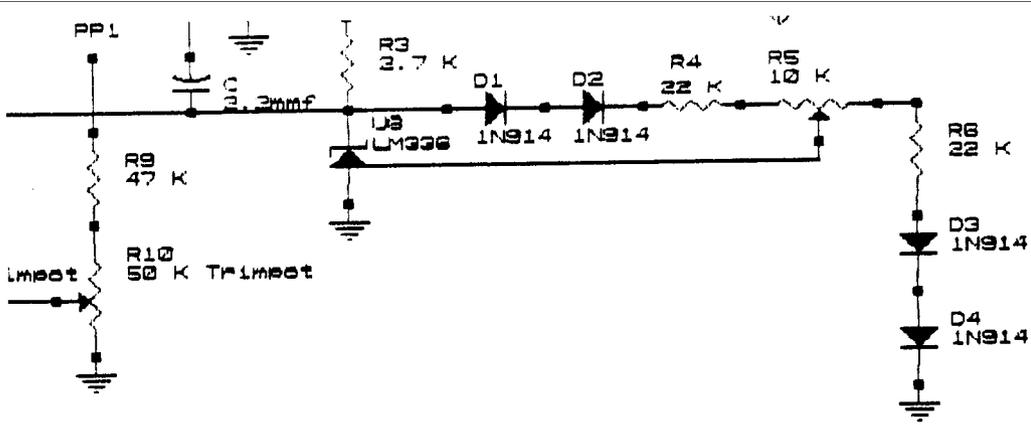




* Pines 4 y 7 con un condensador de 2.2mmf a tierra

- Nota: Los integrados digitales con un condensador de .1mmf entre Vcc y gnd





U.N.A.M Fac. de Ciencias		
Lab. de cibernética		
Francisco J. Heredia L.		
Title		
Tarjeta de adquisición de datos		
Size	Document Number	REV
C	18	
Date: February 28, 1990 Sheet 1 of 1		

11.0 APENDICE F.

PROGRAMAS EMPLEADOS

A continuación se encuentran listados los programas en PASCAL utilizados para evaluar el funcionamiento de la tarjeta de adquisición y para la captura de los datos.

El primer programa listado llamado TEST8.PAS fue utilizado para evaluar y calibrar la tarjeta.

El segundo programa llamado CAPTURA.PAS fué utilizado para la adquisición de los potenciales de acción en el experimento.

El tercer programa listado es ESCRIBE.PAS que se utiliza para desplegar en pantalla los archivos capturados o parte de ellos, también tiene la opción de enviar lo desplegado a la sección de conversión de digital a análogo de la tarjeta de adquisición.

PROGRAMA TEST8.PAS

Este programa permite evaluar el funcionamiento de la tarjeta de adquisición de datos, su utilización es muy simple:

Cuando se corre el programa aparece un menu inicial que contiene las siguiente opciones:

Adquisición y Escritura Analógica

1. Lectura analógica
2. Escritura analógica
- Q. Salir

Al teclear el número o la letra de la opción y presionar ENTER se entra a cualquiera de las dos primeras opciones o se sale del programa.

a) En la opción de lectura analógica (1), la computadora envía el siguiente mensaje:

Voltaje de referencia a emplear (2.5, 5) ?

El usuario debe teclear cual de los dos voltajes de referencia está empleando y presionar enter para que el valor sea reconocido. Como paso siguiente la computadora borra la pantalla e inicia el despliegado de una línea a la mitad de la pantalla que se desplaza de izquierda a derecha y sobre la cual se superimpone el voltaje que la tarjeta está leyendo, dando la apariencia de una pantalla de

osciloscopio muy sencilla, en la parte superior de la pantalla aparece un mensaje:

Voltaje es:

A continuación del cual se despliega el valor en voltios de la señal leída.

b) En la opción de escritura analógica la computadora envía inicialmente el mensaje:

Voltaje de referencia (1.28,2.5) ?

Y nuevamente el usuario debe teclear el dato, a continuación el siguiente mensaje es desplegado:

Archivo a escribir (Signal [1-8].dat) ?

Se teclaea el nombre del archivo y se presiona ENTER, debe tenerse cuidado al teclear el nombre, ya que el programa carece de rutina de captura de errores por lo que si el dato es incorrecto el programa se aborta. Los archivos solicitados por este programa son del tipo entero, y contienen datos que permiten generar señales cuadradas y triangulares de distinto periodo y que pueden observarse en la salida Vout de la tarjeta con un osciloscopio.

Finalmente a continuación se da un listado del programa TEST8.PAS escrito en lenguaje PASCAL versión 3.01:

```

program prueba_de_direccionamiento;

const
  select_DA      = $03F8; {puerto 1016, accesa el convertidor
  digital analogo}
  select_AD      = $03E8; {puerto 1000, accesa el convertidor
  analogo digital}
  sensa_eoc      = $0002; {constantes a sumar a select_AD
  para accesar la}
  lee_AD         = $0001; {lectura de fin de conversion y del
  dato}
  set_AD        = $0000;

var
  archivo          : file of integer;
  inchar           : char;
  eoc,y2,x2,volt2  : integer;
  dato,lectura,k   : integer;
  volt,referencia  : real;
  d,f              : array [1..512] of integer;
  e                : array [1..512] of real;
  i                : 1..300;
  nombre           : string[15];

```

```

Procedure LecturaAnalogica; {Rutina de adquisicion de datos}
begin
  clrscr;
  write('voltaje de referencia a emplear (2.5, 5)? ');
  readln(referencia);
  REPEAT
    clrscr;
    k:=0;
    graphcolormode;
    writeln('Voltaje es: ');
    REPEAT
      port[select_AD]:=set_AD; {Arranca el convertidor}
      repeat {Sensa cuando}
        eoc:= port[select_AD+sensa_eoc]; { se ha completado}
      until eoc=1; { la conversion}
      IF NOT Keypressed THEN
        BEGIN
          dato:= port[select_AD+lee_AD]; {Lee el dato del
          convertidor}
          volt:=(dato*referencia)/256-referencia/2; {Convierte
          el dato en binario a su valor en voltios}
          plot(k,ROUND(99+volt*-10),1);
          k:=k+1;
          gotoxy(15,1);
          write(volt:2:2);
        END;
      UNTIL (k=319) or Keypressed;
    UNTIL keypressed;
  end;

```

```

Procedure EscrituraAnalogica; {Rutina de escritura de datos}
BEGIN
  REPEAT
    CLRSCR;
    writeln('Voltaje de referencia (1.28, 2.5) ? ');
    readln(referencia);
    writeln;
    writeln('Archivo a escribir(Signal[1-8].dat) ? ');
    readln(nombre);
    assign(archivo,nombre);
    RESET(ARCHIVO);
    BEGIN
      FOR i:= 1 TO 512 DO
        BEGIN
          READ(archivo,lectura);
          d[i]:=lectura;
        END;
      CLOSE(archivo);
    END;
    BEGIN
      y2:=0;
      x2:=0;
      FOR i:= 1 TO 512 DO

```

```

        BEGIN
            IF d[i]>y2 then y2:=d[i]; {Determina los valores
maximo y minimo
            IF d[i]<x2 then x2:=d[i];    del archivo leido}
            END;
        END;
        BEGIN
            FOR i:= 1 TO 512 DO
                BEGIN
                    e[i]:=d[i]*((2*referencia)/(y2-x2));    {Escala
cada elemento del archivo}
                END;
            END;
            BEGIN
                FOR i:= 1 TO 512 DO
                    BEGIN
                        volt:=e[i]*100;
                        f[i]:= round((volt/referencia+1)*128);    {Se
convierte el valor a binario}
                    END;
                END;
                REPEAT
                    FOR i:= 1 TO 512 DO
                        BEGIN
                            dato:=f[i];
                            port[select_DA]:= dato;    {Se escribe el
archivo en el A/D}
                        END;
                    UNTIL KEYPRESSED;
                    writeln('Salir?(s o S)');
                    read (kbd,inchar);
                    until inchar in ['s','S'];
                end;

begin {Programa principal}
repeat
    clrscr;
    gotoxy(25,7);
    writeln('ADQUISICION Y ESCRITURA ANALOGICA');
    gotoxy(20,10);
    writeln('seleccione función:  1. LECTURA ANALOGICA');
    gotoxy(20,11);
    writeln('                        2. ESCRITURA ANALOGICA');
    gotoxy(20,12);
    writeln('                        Q. SALIR          ');

    repeat
        read(kbd,inchar);
        until inchar in ['1','2','q','Q'];
        clrscr;

        case inchar of
            '1' : LecturaAnalogica;
            '2' : EscrituraAnalogica;

```

```

end;

until inchar in ['q','Q'];
end.

```

PROGRAMA CAPTURA.PAS

Este programa controla la tarjeta para la captura de datos y permite desplegar esos datos en pantalla y guardarlos en archivos de elementos enteros con la terminación .DAT. El máximo número de muestras que se pueden capturar son 20,000 y la frecuencia de adquisición es la máxima que la tarjeta alcance dependiendo de la velocidad de la computadora utilizada, en una computadora con un CPU corriendo a 4.77 Mhz la frecuencia de muestreo es de aproximadamente 5 Khz.

Al correr el programa la computadora despliega la siguiente pregunta:

Voltaje de referencia a emplear (2.5, 5)?

Se tecléa el valor y la computadora despliega una pantalla que emula un osciloscopio (la misma que en la sección lectura de analógica del programa TEST8.PAS). Para salirse de esta rutina se presiona cualquier tecla (de preferencia al principio del despliegue de la línea de base o cerca del final, seguidamente la computadora envía el siguiente mensaje:

Presione C para continuar

Al presionar C o c la computadora despliega el siguiente mensaje:

Presione ENTER para iniciar la captura de datos

Al presionar ENTER los datos son capturados y almacenados en un vector de 20,000 elementos, la captura de datos puede suspenderse por presionar cualquier tecla o bien esta concluye al llenarse el espacio asignado a los datos.

Al concluir la captura el siguiente mensaje es desplegado:

Se grafican los datos (S/N)?

En caso de teclear S o s la computadora despliega lo siguiente:

Se capturaron n datos

(Donde n es el número de datos capturados, máximo 20,000)

Cuantos datos se despliegan ?

Aquí el usuario tecléa el número de datos que desea observar y presiona ENTER. El siguiente paso es que la computadora borra la pantalla y despliega los n datos escogidos, estos permanecen en pantalla hasta que se presione cualquier tecla, al hacerlo la computadora despliega:

Salir (S/N) ?

Lo cual en caso de teclear S o s, es para continuar con el despliegado de un numero diferente de datos capturados o bién en caso de N o n, salirse de esta rutina. Al salir de esta rutina el siguiente mensaje es desplegado:

Se guardan los datos en archivo (S/N) ?

Si los datos examinados son de interés entonces se tecléa S o s y se presiona enter. Como resultado de esto la computadora despliega el siguiente mensaje:

Nombre del archivo a escribir ?

El usuario tecléa el nombre del archivo (máximo ocho caracteres) sin extensión, el programa automáticamente agrega la extensión .DAT y seguidamente se escriben los datos capturados.

Al finalizar la escritura del archivo se despliega el siguiente mensaje:

Concluir (S/N) ?

Pregunta que en caso de teclearse una respuesta afirmativa S o s, da por terminado el programa, en caso contrario el programa es reiniciado desde el principio. A continuación se da el listado el programa CAPTURA.PAS escrito en PASCAL versión 3.01:

```
program captura;
```

```
const
select_AD      = $03E8; {puerto 1000, accesa convertidor
analogo digital}
sensa_eoc     = $0002;  {constantes a sumar a select_AD
para accesar los}
lee_AD        = $0001;  {puertos de fin de conversion y
dato}
set_AD        = $0000;
EJEX          = 319;
```

```

var
archivo                               : file of integer;
inchar, respuestal, respuesta2        : char;
nombre                                : string[20];
k, n, datos, eoc                      : INTEGER;
tmp2                                  : array[1..20000] of integer;
tmp                                    : array[1..20000] of byte;
color                                  : BYTE;
MAX, MIN, l                            : integer;
FacDeEscY, Y2, FacdeEscX, referencia, lectura : real;
f                                       : BOOLEAN;
volt                                    : REAL;

```

```

Procedure LecturaAnalogica;           {Rutina que despliega los
datos que se leen}
begin
  clrscr;
  l:=0;
  graphcolormode;
  writeln('Voltaje es: ');
  REPEAT
    IF NOT Keypressed THEN
      BEGIN
        port[select_AD]:=set_AD; {Arranca el convertidor}
        repeat {Checa cuando se}
          eoc:= port[select_AD+sensa_eoc]; { ha concluido la}
        until eoc=1; { conversion}
        lectura:= port[select_AD+lee_AD]; {lee el dato}
      END;
    IF NOT Keypressed THEN
      BEGIN
        volt:=(lectura*referencia)/256-referencia/2;
        {convierte el dato en binario a voltios y lo escala}
        plot(l,ROUND(99+volt*-10),1);
        l:=l+1;
        gotoxy(15,1);
        write(volt:2:2);
      END;
    UNTIL Keypressed OR (l=319);
  IF Keypressed THEN f:=FALSE;
end;

```

```

Procedure CAPTURA; {Rutina de adquisicion de datos}
begin
  clrscr;
  n:=1;
  WRITELN('Capturando datos');
  WRITELN;
  WRITELN('Presione ENTER para concluir la captura' );
  repeat
    port[select_AD]:=set_AD; {Arranca el convertidor}
  REPEAT {Sensa cuando}

```

```

        eoc:=port[select_AD+sensa_eoc];      { se ha concluido}
        UNTIL eoc=1;                          { la conversion}
        tmp[n]:= -1*port[select_AD+lee_AD];   {toma el dato y lo
almacena como elemento de un vector}
        n:=n+1;
        until keypressed OR (n=20000);
end;

```

```

procedure GRAFICA; {Despliega n datos de los datos ya
capturados}

```

```

BEGIN
  REPEAT
    CLRSCR;
    WRITELN('Se capturaron ',n,' datos');
    WRITELN;
    WRITE('Cuantos datos se despliegan? ');
    READLN(datos);
    MAX:=0;
    MIN:=0;
    FOR k:=1 TO datos DO
      BEGIN
        IF tmp[K] > MAX THEN      {Encuentra el valor maximo
y minimo}
          MAX:=tmp[K];          {de el grupo de datos a
desplegar}
        IF tmp[K] < MIN THEN     {del total de datos
capturados}
          MIN:=tmp[K];
      END;
    GRAPHCOLORMODE;
    FacDeEscY := 180/(max - min);
    FacDeEscX := ejeX/datos;
    FOR k:=1 to datos DO
      PLOT(ROUND(FacdeEscX*(k-
1)),ROUND(facDeEscY*(tmp[K]-min)),1);
    READLN;
    TEXTMODE(3);
    WRITE('Salir (S/N)? ');
    READ(KBD,respuesta1);
    UNTIL respuesta1 IN ['S','s'];
  END;

```

```

procedure ESCRIBE; {Almacena en un archivo en disco los
datos }

```

```

BEGIN
  WRITELN;
  WRITE('Nombre del archivo a escribir? ');
  READLN(nombre);
  ASSIGN(archivo,nombre+'.dat');
  REWRITE(archivo);
  WRITELN;
  WRITELN('Escribiendo el archivo: ',nombre+'.DAT');
  FOR K:=1 TO n DO
    BEGIN

```

```

        tmp2[k]:=round(tmp[k]/1);
        WRITE(archivo,tmp2[k]);
    END;
CLOSE(archivo);
END;

BEGIN    {Programa principal}
REPEAT
    CLRSCR;
    WRITE('Voltaje de referencia a emplear (2.5, 5 )? ');
    READLN(referencia);
    f:=TRUE;
    WHILE F DO
    LecturaAnalogica;
    textmode(3);
    WRITELN('Presione C para continuar ');
    REPEAT
    READ(KBD,inchar);
    UNTIL inchar IN ['c','C'];
    clrscr;
    WRITELN('Presione ENTER para iniciar la captura de
datos');
    READLN;
    CAPTURA;
    WRITELN;
    WRITE('Se grafican los datos? (S/N) ');
    READ(KBD,respuesta1);
    IF respuesta1 IN ['s','S'] THEN
    BEGIN
    GRAFICA;
    END;
    WRITELN;
    WRITE('Se guardan los datos en archivo? (S/N) ');
    READ(KBD,respuesta2);
    IF respuesta2 IN ['s','S'] THEN
    BEGIN
    ESCRIBE;
    END;
    WRITELN;
    WRITE('Concluir? (S/N) ');
    read (kbd,inchar);
    until inchar in ['s','S'];
END.

```

PROGRAMA ESCRIBE.PAS

Este programa permite desplegar en pantalla los archivos capturados con el programa CAPTURA.PAS, pudiéndose desplegar todo el archivo o partes específicas del mismo, junto con el desplegado en pantalla aparecen el nombre del archivo, así como también de qué elemento inicial a qué elemento final se encuentran desplegados.

El programa inicia desplegando la siguiente pregunta:

Nombre del archivo a leer ?

El nombre con extensión es tecleado y el programa lee el archivo. Posteriormente son desplegados los siguientes mensajes:

El archivo consta de n elementos
(donde n es el número de elementos que forman el archivo leído)

Se grafica del elemento ?

Aquí el usuario teclea el elemento inicial a desplegar y presiona ENTER, seguidamente se despliega el siguiente mensaje:

Hasta el elemento ?

Teclee el dato final a considerar en la graficación. Después de ser introducido este dato la computadora borra la pantalla y los n elementos escogidos del archivo son desplegados en pantalla, junto con el nombre del archivo del cual fueron leídos, así como también cual es el elemento inicial y final desplegados. El desplegado permanece en pantalla hasta que se presione cualquier tecla, seguidamente se despliega:

Salir (S/N) ?

Para en caso de N o n, o cualquier otra tecla, desplegar otra parte del archivo, o en caso de S p s abandonar esta rutina. Al salir de esta rutina el siguiente mensaje es desplegado:

Se envían al D/A los datos (S/N) ?

En caso afirmativo el grupo de datos que fueron desplegados al último en la rutina de graficación son escalados y enviados a reconversión analógica a través de la tarjeta de adquisición. La computadora al entrar a esta rutina despliega el siguiente mensaje:

Enviando datos, presione ENTER para salir

La señal estará presente en la salida Vout de la tarjeta mientras no se presione ENTER, al hacerlo se concluye esta rutina y el siguiente mensaje es desplegado:

Se guardan como archivo los datos graficados (S/N) ?

En caso afirmativo los datos desplegados al último en la rutina de graficación son guardados en un archivo cuyo

nombre es proporcionado por el usuario al desplegarse el siguiente mensaje:

Nombre del archivo a escribir ?

Los datos son almacenados en un archivo de tipo entero y con la extensión .DAT; al concluir la escritura del archivo el siguiente mensaje es desplegado:

Concluir (S/N) ?

Donde una respuesta afirmativa da por concluida la ejecución del programa y cualquier otra respuesta da lugar al reinicio del programa.

A continuación se da el listado del programa ESCRIBE.PAS escrito en PASCAL versión 3.01:

```

PROGRAM ESCRIBE;
CONST
  EJEX                = 319;
  select_DA          = $03F8;
VAR
  dato,k,n,referencia      :INTEGER;
  archivo,archivo3        :FILE OF integer;
  tmp                      : array[1..20000] of integer;
  color                    :BYTE;
  nombre,nombre2          :STRING[20];
  MAX,MIN,inicio,ultimo   :integer;
  FacDeEscY,Y2,FacdeEscX  : real;
  existe                  : BOOLEAN;
  respuesta                : CHAR;

procedure lee; {lee los elementos de un archivo}
BEGIN
  CLRSCR;
  REPEAT
    WRITE('Nombre del archivo a leer? ');
    READLN(nombre);
    ASSIGN(archivo3,nombre);
  {$I-}
  RESET(archivo3);
  {$I+}
  IF (IOresult = 0) THEN
    existe := TRUE ELSE existe := FALSE;
  UNTIL existe= TRUE;
  CLRSCR;
  WRITELN('Leyendo el archivo: ', nombre);
  k:=0;
  WHILE NOT EOF(archivo3) DO
    begin
      READ(archivo3.dato);
      tmp[k] := dato
    end
  end

```

```

        k:=k+1;
    end;
end;

procedure grafica;          {Despliega en pantalla n elementos
del archivo leido}
BEGIN
REPEAT
    WRITELN;
    WRITE('El archivo consta de ',k,' elementos');
    WRITELN;
    WRITE('Se grafica a partir del elemento? ');
    READLN(inicio);
    WRITELN;
    WRITE('Hasta el elemento? ');
    READLN(ultimo);
    GRAPHCOLORMODE;
    WRITELN('Archivo: ',nombre);
    WRITE('Del elemento ',inicio,' al ',ultimo);
    MAX:=0;
    MIN:=0;
    FOR n:=inicio TO ultimo DO
        BEGIN
            IF tmp[n] > MAX THEN
                MAX:=tmp[n];
            IF tmp[n] < MIN THEN
                MIN:=tmp[n];
        END;
        FacDeEscY := 180/(max - min);
        FacDeEscX := ejeX/(ultimo-inicio);
        FOR n:=inicio to ultimo DO
            PLOT(ROUND(FacdeEscX*(n-inicio)),ROUND(facDeEscY*(tmp[n]-
min)),1);
        READLN;
        TEXTMODE(3);
        WRITE('Salir de rutina de graficacion (S/N)? ');
        READ(KBD,respuesta);
        UNTIL respuesta IN ['S','s'];
    END;

Procedure escribe;        {Envia a puerto D/A los datos
graficados}
BEGIN
CLRSCR;
WRITELN ('Enviando datos, presiones ENTER para salir');
WRITELN;
    REPEAT
        FOR k:=inicio TO ultimo DO
            port[select_DA]:= tmp[k];
        UNTIL KEYPRESSED;
END;

procedure guarda;
BEGIN

```

```

WRITELN;
WRITE('Nombre del archivo a escribir? ');
READLN(nombre2);
ASSIGN(archivo,nombre2+'.dat');
REWRITE(archivo);
WRITELN;
WRITELN('Escribiendo el archivo: ',nombre2+'.DAT');
  FOR K:=inicio TO ultimo DO
    WRITE(archivo,tmp[k]);
CLOSE(archivo);
END;

BEGIN {inicia programa principal}
REPEAT
lee; {Se llama al procedimiento de lectura de archivos}
grafica; {Se llama al procedimiento de graficado}
WRITELN;
WRITE('Se envian al D/A los datos (S/N)? ');
READ(KBD,respuesta);
  IF respuesta IN ['s','S'] THEN
escribe {Se llama el procedimiento de escritura al puerto
D/A}
  ELSE
    WRITELN;
    WRITE('Se guardan como archivo los datos graficados
(S/N)? ');
    READ(KBD,respuesta);
    IF respuesta IN ['s','S'] THEN
      guarda; {Se llama al procedimiento de guardar datos en
archivo}
WRITELN;
WRITE('Concluir (S/N)? ');
  READ(KBD,respuesta);
UNTIL respuesta IN ['s','S'];
END.

```

En la siguiente página se encuentra impresa la pantalla que el programa ESCRIBE.PAS despliega al dársele los n elementos que se desean observar en pantalla.

Archivo: test.dat
Del elemento 1 al 400

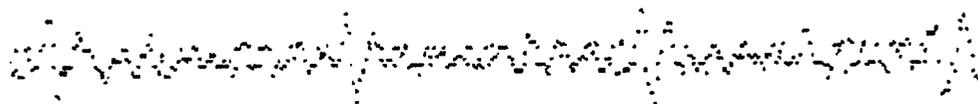


IMAGEN DESPLEGADA EN PANTALLA POR EL PROGRAMA ESCRIBE.PAS

12.0 APENDICE G

FUENTE DE ALIMENTACION DEL AMPLIFICADOR DE POTENCIALES

Para ella se utilizó una fuente de voltaje dual, de ± 12 V 1A, del laboratorio de cibernética, a la cual se le hicieron las siguientes modificaciones:

Se le cambiaron los capacitores de filtro de los rectificadores, los cuales eran orginálmente de 2000 μ F, por unos de 10,000 μ F; ésto con el fin de disminuir el voltaje de rizo a menos de 1 mV.

Se montaron en el chasis un par de conectóres DIN hembra, para poder conectar a uno de ellos el cable blindado de alimentación del amplificador de potenciales

Y se le cambió el cable de alimentación por uno dotado de una clavija con tierra física, a fin de que el chasis del amplificador de potenciales estuviera adecuadamente referido a tierra física.

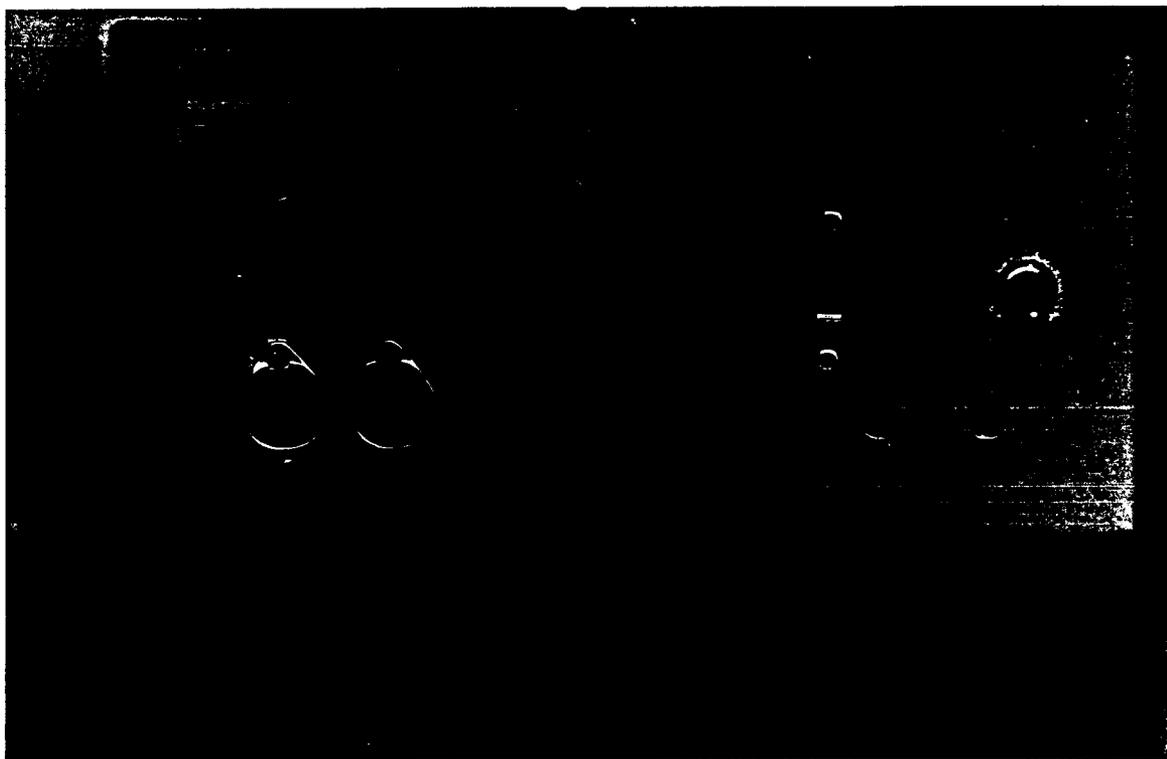


FIGURA 11 FUENTE DE ALIMENTACION DEL AMPLIFICADOR
DE POTENCIALES

13.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1) VANDER A., SHERMAN J., LUCIANO D., "Fisiología Humana". Mc Graw Hill, 1978. Pags 101-130.
- 2) GUYTON A.C., "Fisiología Humana". Edit. Interamericana, 1987. Pags 79-88
- 3) Handbook of Physiology "The Nervous System". American Physiological Society, Volume 1, Part 1.
- 4) STEVENS C. F., " The Neuron, In The Brain ". A Scientific American Book, W.H. Freeman and Co. 1979. pags 13-25
- 5) ABELES M., "Local Cortical Circuits, an electrophysiological study ". Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1982. Pags 6-7.
- 6) THOMPSON R. F. , PATTERSON M. M., "Bioelectric Recording Techniques". Academic Press New York, 1973. Pags. 139-140 y 153-155.
- 7) MIRABENT D. J., RABAGLIATTI J. E. L., GARCIA C. P., "Física para ciencias de la vida" . McGraw Hill; series Schaum. 1986. Pags 251-258.
- 8) ESPINOSA E. I., " Neurocibernética: Fisiología y modelos matemáticos de la neurona". Revista Ingeniería, Facultad de Ingeniería de la UNAM. Enero-Marzo de 1977. Pags 88-99.
- 9) SCHADE J.P., DONALD H. F., " Neurología Básica". Editorial: El manual moderno. Octubre de 1975. Pags 152-162
- 10) GERSTEIN G. L., BLOOM, M.J., ESPINOSA E. I., EVANCZUK, S. Y TURNER, M., " Design of a Laboratory for Multineuron Studies". IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics., Vol 13; No. 5, September/October 1983.
- 11) "Linear Data Book". National Semiconductor. 1982. Pags. 10-22 a 10-25.
- 12) "Linear Circuits Data Book". Texas Instrument. 1984. Pags. 3-125 a 3-133.
- 13) STOUT D. F., "Handbook of Operational Amplifiers Circuit Design". Mc Graw Hill Hand Books. Capitulo 4.
- 14) PHELPS R. S., " 750 Practical Electronics Circuits". Tab. Books 1983. Pags 98-99.
- 15) MIMS III F. M., "Engineer's Mini-note Book Op-Amp Circuits". Siliconcepts Books 1985, First Edition. Pags 40-41.

16) " An improved process for insulating metal microelectrodes". Journal of Electrophysiological Techniques, Frederick Haer & Co., Marzo 1976; Volumen 5, No.2.

17) PASAHOW E., "Electrónica: manual práctico de referencias". Mc Graw Hill 1986. pags 129-130.

18) DEBOO G., BURROUS C., "Integrated Circuits And Semiconductor Devices: Theory and Application". Mc Graw Hill 1985. Second edition. Capitulo 4.

19) MURRAY S., RICHARD L. S., "The IBM Personal Computer From Inside Out". Addison-Wesley Publishing Comp. 1988. Fifth edition. Capítulos 6 y 12.

20) CIARCIA S., " Build an analog to digital converter ". Byte, January 1986. Pags 105-116.

21) DIEFENDERFER A. J., " Instrumentación electrónica ". Editoriál Interamericana, 1987. Pags 233-235 y 413-414.

22) CIARCIA S., "Computers on the brain Part 1". Byte, June 1988. Pags 273-281.

23) CIARCIA S., "Computers on the brain Part 2". Byte, July 1988. Pags 289-296.

24) KÖNIG J. F., KLIPPEL R. A., "The rat brain An stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem". The Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1963.