



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
Ciencias Básicas e Ingeniería

CARACTERIZACIÓN *IN-VIVO*
DE LA ESPECTROMETRÍA DE
IMPEDANCIA COMO TÉCNICA
DE MONITOREO DE DAÑO
ISQUÉMICO TISULAR

Doctorado en Ciencias (Ingeniería Biomédica)

SALAH OTHMAN

Junio de 2003

UAM IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340, México, D.F.

SINODALES:

Asesor: Dr. Emilio Sacristán Rock

Dr. Joaquín Azpiroz Leehan

Dr. Tomás Aljama Corrales

Dra. Guadalupe Cleva Villanueva Lopez

Dr. Fernando Prieto Hernández



En el nombre de Dios,
el Clemente,
el Misericordioso...

Antes que nada doy alabanzas a Dios, quien me ha permitido llevar a buen término esta obra, la cual espero sea aplicada en beneficio de la humanidad.

Dedico con mucho cariño este trabajo al espíritu de mi Padre, a mi Madre, mis hermanas, mis hermanos y mis sobrinitos.

Agradezco a mis amigos árabes a Youssef Kanjo, Wassim al Asaad y a su Mamá, Rufaat al Osman y su esposa, Mohamad alRaie y su familia, Jihad Radwan, Mamduh Sayed y khalidun Taleb y su familia; con quien compartí mis nostalgias y mis tradiciones en México.

Agradezco a mis amigas y amigos mexicanos y en especial a mi querida Thania Irasima Ramírez Ortiz y a: Julia Espinosa Martínez, Norma A. Martínez Ventura, Silvia Hernández, Natalia Velásquez, Marisol Magaña, Xochitl Flores, César A.G. Díaz y a Roberto Duran "Omar al_maxiqui" y sus familias por su apoyo moral, aceptarme y recibirme en sus casas con generosidad y confianza.

Agradecimientos

Un agradecimiento al Dr. Emilio Sacristán Rock por su asesoría y apoyo científico y técnico para esta tesis, pero más que nada por su amistad y calidad humana.

Gracias a todos los profesores del Departamento de Ingeniería Biomédica de la UAM por sus enormes deseos de enseñar, en especial al maestro Miguel Cadena Méndez, al Dr. Tomás Aljama Corrales por su apoyo científico y al Maestro Oscar Yáñez por su ayuda en el procesamiento y el análisis de los datos.

Agradezco al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez (INCICH) de la ciudad de México, a los investigadores Pedro L. Flores Chávez y Oscar Infante Vázquez por su ayuda en los experimentos; a los técnicos Mario Pérez Sánchez, Florencio Hernández Lizardi y Porfiria Fernández M por la ayuda en la realización de las cirugías, a los doctores Verónica Graullera Rivera y Carlos A. Tena Betancourt por su ayuda en la preparación de los animales en el bioterio así como por el apoyo logístico para los experimentos.

Agradezco a la empresa INOVAMEDICA S.A. DE C.V por el financiamiento de los experimentos animales y su colaboración en el desarrollo de la última versión del prototipo instrumental. En especial agradezco a los ingenieros Javier Pinzón y Jazmín Aguado por su ayuda técnica y práctica para llevar a cabo la segunda versión del prototipo, así como su caracterización en los experimentos animales y a mi compañera en el doctorado Nohra Beltrán por su gran ayuda en la corrección de este manuscrito.

Agradezco a la Dra. Guadalupe Cleva Villanueva de la Escuela Superior de Medicina del IPN, México D.F. por su valiosa cooperación y apoyo en el desarrollo del protocolo animal y la discusión de los resultados.

Hago un agradecimiento especial a mi amigo y compañero en el laboratorio al M. en C. y muy próximamente Doctor a César Antonio González Díaz; Por su apoyo para llevar a buen término esta tesis gracias a su ayuda desde recordar a leer una resistencia hasta la última letra de correcciones en este manuscrito y por sus recomendaciones y ayuda en la caracterización en vivo del prototipo.

Mis mejores agradecimientos a los funcionarios de la Secretaría de Relaciones Exteriores Mexicana y en especial a la Licenciada Sandra Barón por su gran Calidad humana, su asesoría y apoyo durante mi estancia en México.

Agradezco al Gobierno de México, en especial a la Secretaría de Relaciones Exteriores, y al Gobierno de Siria en su Secretaría de Educación Superior por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de posgrado en México.

Salah Othman

1 Dic.02 México D.F.

Índice

| <u>Capítulo</u> | <u>página</u> |
|---|---------------|
| Agradecimientos | i |
| Índice | ii |
| Lista de graficas | v |
| Glosario | ix |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Identificación del problema | 1 |
| 1.1.1. Condición de choque y resucitación | 1 |
| 1.1.2. Detección choque y su tratamiento | 2 |
| 1.2. Objetivos | 5 |
| 1.3. Hipótesis y aproximación a la investigación | 6 |
| 2. Antecedentes | 7 |
| 2.1. La isquemia en el tejido | 7 |
| 2.1.1. La mucosa intestinal durante el estado de choque | 8 |
| 2.1.2. Medición indirecta del pH intramucoso por medio de tonometría gastro-intestinal | 8 |
| 2.1.3. Daño a la mucosa intestinal | 10 |
| 2.2. Técnicas para medición y monitoreo de isquemia y perfusión tisular | 11 |
| 2.2.1. Comparación de varias técnicas de medición y monitoreo de isquemia y perfusión del tejido | 12 |
| 2.2.2. Técnicas basadas en impedancia para el monitoreo de la isquemia y la perfusión del tejido | 13 |
| 2.3. Espectroscopía de impedancia | 14 |
| 2.3.1. Definición y principios de espectroscopía de impedancia | 14 |
| 2.3.2. Aplicación de la espectroscopía de impedancia a los tejidos biológicos | 15 |
| 2.4. Las propiedades eléctricas de los tejidos | 16 |
| Dispersión del tejido | 17 |
| Modelo eléctrico macroscópico del tejido | 18 |
| 2.5. Redes neuronales artificiales | 22 |
| 2.5.1. Red de procesamiento hacia adelante o retropropagación (Back Propagation) | 23 |
| 2.5.2. Red de cuantificación vectorial de aprendizaje (Learning Vector Quantization "LVQ" Networks) | 25 |
| 2.6. Resumen | 27 |
| 3. Diseño del hardware del espectrómetro de impedancia actual | 28 |
| 3.1. Descripción de los términos y principios básicos | 28 |
| 3.2. Diseño del sistema de espectrometría de impedancia | 30 |
| 3.2.1. Descripción de los módulos que componen el espectrómetro de impedancia | 30 |
| 3.2.2. Modulación y demodulación aplicada a espectroscopia de impedancia | 33 |
| 3.2.2.1. Amplitud modulada | 33 |
| 3.2.2.2. Demodulación | 35 |
| 3.2.3. Descripción general de la operación del espectrómetro de impedancia | 37 |
| 3.2.4. Descripción de la captura de datos y su recuperación por medio de la modulación y demodulación síncronas | 37 |
| 3.2.5. Descripción del muestreo de datos | 40 |
| 3.3. Características de diseño del hardware del espectrómetro | |

| | |
|---|-----|
| de impedancia | 43 |
| 3.3.1. Descripción de los módulos de fuente y medición de corriente | 43 |
| 3.3.2. Descripción del módulo de mezcladores | 52 |
| 3.3.3. Descripción del módulo de adquisición de datos | 56 |
| 3.3.4. Descripción del módulo de Aislamiento | 60 |
| 3.3.5. Resumen del modelo electrónico del espectrómetro y las ecuaciones matemáticas | 63 |
| 3.3.6. Calibración del sistema | 65 |
| 3.3.6.1. Calibración del hardware del espectrómetro de impedancia. | 65 |
| 3.3.6.2. Calibración la corriente de la fuente de corriente. | 65 |
| 3.3.6.3. Calibración de ganancia para los amplificadores de instrumentación | 66 |
| 3.3.6.4. Calibración Los multiplicadores | 68 |
| 3.3.6.5. Calibración de los filtros pasabanda | 68 |
| 3.3.6.6. Calibración de ganancia de los amplificadores operacionales de salida de ambos canales (señal del tejido y referencia) | 70 |
| 3.3.7. Diseño del software del espectrómetro de impedancia | 72 |
| 3.3.7.1. Medición de impedancias | 72 |
| 3.3.7.2. Calculo de la impedancia compleja | 73 |
| 3.3.7.2.1. Cálculo de amplitud | 73 |
| 3.3.7.2.2. Cálculo de fase por medio de la correlación | 73 |
| 3.3.8. Descripción del módulo de electrodos | 74 |
| 3.3.9. Módulo de Interfaz de Comunicación y Adquisición | 78 |
| 3.3.10. Software para Procesamiento y Almacenamiento de Datos | 81 |
| 3.3.10.1. Descripción General | 81 |
| 3.3.10.2. Diagrama de bloques funcional del sistema | 82 |
| 3.3.10.3. Panel de control principal | 83 |
| 3.3.10.4. Base de datos | 85 |
| 4. Estudio con animales | 87 |
| 4.1. Justificación del uso de los intestinos delgados en cerdos | 87 |
| 4.2. Protocol Experimental | 88 |
| 4.2.1. Descripción general del procedimiento experimental | 88 |
| 4.2.2. Resumen de los experimentos realizados | 92 |
| 4.2.3. Problemas Observadas Durante los experimentos | 92 |
| 5. Algoritmo para medir el Daño Isquémico tisular empleando los parámetros de espectroscopia de impedancia | 95 |
| 5.1. Desarrollo de un algoritmo para calcular el Nivel de Daño Isquémico en función de la acidosis del tejido. | 95 |
| 5.2. Normalización de los parámetros de la impedancia medida | 97 |
| 5.3. Modelo eléctrico característico para estimar la impedancia del tejido. | 98 |
| 5.3.1. Algoritmo para la extracción de los parámetros del modelo de impedancias | 102 |
| 5.3.2. Estimación de parámetros usando el algoritmo de descenso por gradiente | 103 |
| 5.3.3. Estimación de parámetros de un modelo con múltiples constantes de tiempos distribuidas | 105 |
| 5.4. Definición de los parámetros más característicos de espectroscopia de impedancia | 108 |
| 5.5. Red neuronal para clasificar el nivel de daño isquémico a partir | |

| | |
|--|-----|
| de los parámetros característicos de la impedancia tisular | 108 |
| 6. Resultados Experimental | 110 |
| 6.1. Resumen de los experimentos del modelo animal realizados | 110 |
| 6.2. Resultados de mediciones Hemodinámicas | 114 |
| 6.3. Resultados de mediciones de pHi | 116 |
| 6.4. Resultados del Algoritmo de calculo del Nivel de Daño Isquémico NDI | 117 |
| 6.5. Resultados de mediciones de espectroscopia de impedancia | 119 |
| 6.5.1. Representación de resultados en el dominio de tiempo | 119 |
| 6.5.2. Representación de Resultados en el dominio de frecuencia | 126 |
| 6.6. Resumen de Resultados de Mediciones de Espectroscopia de Impedancia | 129 |
| 6.7. Resultados del Modelo de impedancia propuesto para el tejido | 131 |
| 6.8. Análisis Estadísticos | 136 |
| 6.8.1. Análisis de Significancia | 138 |
| 6.8.2. Análisis de la significancia de los cambios espectrales para presentar el efecto de la oclusión y reperfusión sanguínea en el tejido bajo estudio | 150 |
| 6.9. Relación entre algunos parámetros de espectroscopia de impedancia y pHi <i>medidos en tejido intestinal vivo</i> . | 153 |
| 6.10. Relación entre algunos parámetros de espectroscopia de impedancia y NDI <i>calculado mediante el algoritmo propuesto en esta tesis</i> . | 155 |
| 6.11. Análisis de repetibilidad y estimaciones de generalización (Redes neuronales): estimando NpHi, NDI y Clase de cada espectro | 159 |
| 7. Discusiones | 162 |
| 7.1. discusión del diseño del espectrómetro de impedancia | 162 |
| 7.2. Discusión de los Resultados del Estudio Animal | 164 |
| 7.2.1. Discusión del protocolo animal | 164 |
| 7.2.2. Discusiones de los Resultados de mediciones Hemodinámicas | 165 |
| 7.2.3. Discusiones de los Resultados de Mediciones de Espectroscopia de Impedancia | 167 |
| 7.2.4. Discusiones de los Resultados del Algoritmo de calculo del Nivel de Daño Isquémico NDI | 170 |
| 7.2.5. Discusiones de Resultados del Modelo de impedancia propuesto para el tejido. | 171 |
| 7.2.6. Discusiones de los Análisis Estadísticos | 172 |
| 7.2.7. Discusiones de Resultados de los Análisis de repetibilidad y estimaciones de generalización (Redes neuronales): estimando NpHi, IDI y Clase de cada espectro. | 174 |
| 8. Conclusiones | 177 |
| 9. Trabajos futuros | 180 |
| 10. Referencias | 181 |
| 11. Anexos | 185 |
| 11.1. Anexo I, Los programas en el lenguaje MATLAB, para la estimación del modelo. | 185 |
| 11.2. Anexo II, Hoja de registro experimental- estudio espectral in vivo | 191 |
| 11.3. Anexo III, Programa de cirugías para realizar en el protocolo animal | 192 |
| 11.6. Anexo VI, Anexo VIII, Diagrama del circuito electrónico de segunda versión del espectrómetro de impedancia | 193 |

Lista de figuras

| <i>Figura</i> | <i>descripción</i> | <i>página</i> |
|---------------|---|---------------|
| 2.1. | Patogénesis de falla múltiple de órganos. | 9 |
| 2.2. | El grado de daño isquémico a la pared intestinal graficado contra la duración de la isquemia | 10 |
| 2.3. | Constante dieléctrica del tejido muscular, denominadas respectivamente dispersión α , β , y γ . | 19 |
| 2.4 | Diagrama típico de la impedancia compleja del tejido biológico. | 19 |
| 2.5. | Red de retropropagación típica. | 24 |
| 2.6. | Elemento típico de procesamiento en una red de retropropagación. | 25 |
| 2.7. | Esquema de una red de tipo cuantificación de vector de aprendizaje. | 26 |
| 3.1. | Sistema de cuatro electrodos para la medición de la impedancia compleja del tejido. | 29 |
| 3.2. | Sistema de medición de impedancia del tejido con cuatro electrodos Y las superficies equipotenciales. | 30 |
| 3.3. | Diagrama a bloques del espectrómetro de impedancia | 31 |
| 3.4. | El multiplicador como modulador balanceado. | 34 |
| 3.5. | Esquema del proceso de demodulación síncrona. | 35 |
| 3.6. | Ejemplo de Entradas y salidas de demodulación síncrona. | 36 |
| 3.7. | Las dos señales en la salida del instrumento. | 42 |
| 3.8. | Diagrama simplificado del circuito del módulo de corriente. | 43 |
| 3.9. | El AD7008 de Analog Devices. | 44 |
| 3.10. | Diagrama de bloques funcionales del AD7008 como un generador de señal senoidal de frecuencia programable. | 46 |
| 3.11. | El AD7008. Diagrama de conexiones externas. | 46 |
| 3.12. | Esquema de circuito de control de la fuente de corriente. | 47 |
| 3.13 | El sistema de fuente de corriente proporcional para el espectrómetro de impedancia basado en un amplificador de retroalimentación de corriente AD844 de Analog Devices. | 48 |
| 3.14. | Esquema de circuito de control de frecuencia y amplitud de corriente. | 49 |
| 3.15 | El sistema de control manual de la corriente utilizado. | 51 |
| 3.16. | Los mezcladores y sus componentes (moduladores y filtros pasabanda). | 52 |
| 3.17. | Diagrama detallado del circuito de modulación empleando el multiplicador AD539 de Analog Device. | 53 |
| 3.18. | Diagrama de los filtros pasabanda empleados. | 54 |
| 3.19. | Respuesta en frecuencia de los filtros pasabanda empleados. | 55 |
| 3.20. | El módulo de amplificadores operacionales de salida como acoplamiento entre el instrumento y el microcontrolador. | 56 |
| 3.21. | Sistema de interfase Entre AD600 y PIC, para un solo canal | 56 |
| 3.22. | Circuito de Control manual de Ganancia para las señales de salidas del espectro. | 57 |
| 3.23. | Circuito de la configuración usada para conectar el PIC con una PC | 58 |
| 3.24. | Esquema del sistema de Aislamiento del espectrómetro de impedancia. | 60 |
| 3.25. | Esquema del chip Aislador Digital ADuM1100AR de alta velocidad | 60 |
| 3.26. | Esquema del chip Para el asilamiento Análogo DCR01. | 61 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.27. | Esquema del Diagrama de interfase PC- PIC incluyendo el sistema de aislamiento digital del espectrómetro de impedancias. | 62 |
| 3.28. | Diagrama de bloques para el sistema de medición de impedancia compleja usando un puente de demodulación síncrona. | 63 |
| 3.29. | Diagrama de la fuente de corriente y su circuito de control. | 66 |
| 3.30. | Control manual de ganancia del amplificador AD600. | 67 |
| 3.31. | Control de ganancia de los amplificadores de instrumentación. | 67 |
| 3.32. | Diagrama detallado del circuito de calibración del multiplicador AD539 de doble canal. | 68 |
| 3.33. | El criterio de calibración de los filtros pasa banda.. | 69 |
| 3.34. | Funcionamiento del módulo de amplificadores de salida como acoplamiento entre el filtro pasa banda y el PIC. | 70 |
| 3.35. | Circuito de interfaz entre el espectrómetro y el convertidor analógico / digital del PIC16C773. | 71 |
| 3.36. | Esquema que muestra el diseño del electrodo usado para la construcción de la primera sonda. | 74 |
| 3.37. | Esquema que muestra el diseño del electrodo usado para la construcción de la segunda sonda. | 75 |
| 3.38. | Diagrama que muestra la sonda. | 75 |
| 3.39. | Diagrama que muestra las etapas de armas los cuatro electrodos en las sondas. | 76 |
| 3.40. | Diagrama del sistema usado para depositar una capa de AgCl. | 77 |
| 3.41. | Esquema del Módulo de Interfaz de Comunicación y Adquisición como caja negra. | 78 |
| 3.42. | Esquema de bloques de la Estructura Funcional del Módulo de Interfaz de Comunicación y Adquisición. | 79 |
| 3.43. | Diagrama de Bloques General(Interfaz Gráfica: Paneles de Control y Despliegue). | 82 |
| 3.44. | Panel de control principal. | 83 |
| 3.45. | Base de datos | 86 |
| 4.1. | Esquema propuesto del curso temporal del flujo sanguíneo en la Arteria Mesentérica Superior. | 88 |
| 5.1. | Relación entre pH-intramucoso y tiempo, para el cálculo del Nivel de daño isquémico propuesto. | 96 |
| 5.2. | Circuitos eléctricos equivalentes para la estimación tisular y de los fluidos del cuerpo. | 99 |
| 5.3. | Una curva típica de la impedancia compleja del tejido a todas las frecuencias. | 100 |
| 5.4. | Comparación entre espectro de amplitudes de impedancia medidas en tejido vivo y los calculados en el modelo | 101 |
| 5.5. | Modelo de tejido biológico con dos constantes de tiempo diferentes. | 101 |
| 5.6. | Modelo de tejido biológico con N constantes de tiempo diferentes. | 105 |
| 5.7. | Esquema del modelo de tejido biológico con 5 constantes de tiempo diferentes. | 107 |
| 6.1. | Resultados de promedios y desviaciones estándares del flujo sanguíneo en la arteria mesentérica superior. | 114 |
| 6.2. | Resultados de promedios y desviaciones estándares de las frecuencias cardíacas. | 114 |
| 6.3. | Resultados de promedios y desviaciones estándares de la Resistencia Vascular sistémica. | 115 |
| 6.4. | Resultados de promedios y desviaciones estándares de la Presión de | 115 |

| | | |
|-------|--|-----|
| | Oxígeno arterial. | |
| 6.5. | Resultados de promedio y desviaciones estándares de la Presión de bicarbonato arterial. | 115 |
| 6.6. | Mediciones típicas de pHi en tejido intestinal en cuatro experimentos con diferentes grupos. | 116 |
| 6.7. | Resultados de promediados y desviaciones estándares de los parámetros de pHi medidos e IDI calculados. | 117 |
| 6.8. | Comparación entre resultados de pHi medidos en tejido vivo y los Índices de Daño Isquémico correspondientes. | 118 |
| 6.9. | Resultados de impedancia en tejido intestinal en el grupo #1 (control). | 119 |
| 6.10. | Resultados típicos de impedancia en tejido intestinal en el grupo #2, de reperfusión después de 1 hora de oclusión. | 120 |
| 6.11. | Resultados típicos de impedancia en tejido intestinal en el grupo #3, de reperfusión después de 2 horas de oclusión. | 121 |
| 6.12. | Resultados típicos de impedancia en tejido intestinal en el grupo #4, de oclusión total durante 240 minutos. | 122 |
| 6.13. | Comparaciones entre amplitudes de impedancia medidas en dos diferentes experimentos del mismo grupo experimental. | 124 |
| 6.14. | Comparaciones entre amplitudes de impedancia medidas en dos sondas de la misma generación y del mismo experimento. | 125 |
| 6.15. | Espectros de impedancia compleja en el plano Nyquist registrados a cinco instantes de tiempo de cuatro experimentos de grupos diferentes. | 126 |
| 6.16. | Espectros de amplitudes y fases registrados a cinco instantes de tiempo | 128 |
| 6.17. | Los promedios y desviaciones estándares de las amplitudes y fases a frecuencia 68129 Hz, separadas por grupo. | 129 |
| 6.18. | Comparación entre los promedios y desviaciones estándares de amplitudes y fases de todos experimentos, separadas por grupo. | 130 |
| 6.19. | Esquema del modelo de tejido biológico con 5 constantes de tiempo diferentes utilizado. | 131 |
| 6.20. | Comparaciones en el plano Nyquist entre mediciones en tejido intestinal y parámetros calculados en el modelo correspondiente. | 132 |
| 6.21. | Comparaciones espectrales entre parámetros medidos en tejido intestinal y parámetros calculados en el modelo correspondiente. | 133 |
| 6.22. | Comparaciones espectrales entre las amplitudes de impedancia medidos en tejido intestinal y las primeras cuatro resistencias estimadas del modelo tisular correspondiente. | 134 |
| 6.23. | La correlación entre resistencias estimadas en el modelo, y las mediciones del pHi correspondientes. | 153 |
| 6.24. | La correlación entre las amplitudes medidas en el tejido intestinal y las mediciones del pHi correspondientes. | 153 |
| 6.25. | La correlación entre las reactancias calculadas de las mediciones de amplitudes y fases medidas en el tejido intestinal y las mediciones del pHi correspondientes. | 154 |
| 6.26. | La correlación entre resistencias estimadas en el modelo y los Índices de Daño Isquémico calculados del pHi correspondientes. | 155 |
| 6.27. | La correlación entre las amplitudes medidas en el tejido intestinal y los Índices de Daño Isquémico calculados del pHi correspondientes. | 155 |
| 6.28. | La correlación entre las reactancias calculadas de las mediciones de | 156 |

| | | |
|-------|--|-----|
| | amplitudes y fases medidas en el tejido intestinal y los Índices de Daño Isquémico calculados del pHi correspondientes. | |
| 6.29. | Comparaciones entre pHi y amplitudes medidas en tejido intestinal vivo durante 240 minutos en cuatro experimentos diferentes. | 157 |
| 6.30. | Comparaciones entre Índices de daño isquémico (IDI) calculados, y amplitudes medidas en tejido intestinal en cuatro experimentos diferentes. | 158 |

Glosario

| <i>Termino</i> | <i>descripción</i> | <i>página</i> |
|-----------------------------|---|---------------|
| Isquemia | Se produce cuando el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno no son suficientes para satisfacer las necesidades metabólicas del tejido. | 1 |
| Choque | El suministro de oxígeno cae por debajo de la demanda energética de los tejidos del cuerpo. | 1 |
| Daño isquémico | Se genera cuando el consumo de oxígeno es limitado por el suministro, se presenta metabolismo anaeróbico, evacuación celular insuficiente y reducción del volumen extracelular. | |
| Choque compensado | Cuando la respuesta autonómica del individuo es capaz de sostener variables hemodinámicas como presión arterial media y gasto cardiaco a pesar de una situación patológica sostenida. | 1 |
| Choque descompensado | Cuando la situación patológica ha sobrepasado la capacidad autonómica del individuo, e incluso puede superar los actos de reanimación del médico tratante, por lo cual conduce a una sub-fase final, llamada irreversible, cuando el individuo ha entrado en falla orgánica multisistémica. | 1 |
| Reperusión | Ocurre cuando se restablece el flujo sanguíneo al tejido. | |
| Resucitación o compensación | Solo se puede completar cuando toda evidencia de la mala oxigenación del tejido defectuoso se haya eliminado. | 1 |
| O ₂ ER | tasa de consumo de oxígeno | 2 |
| SVO ₂ | Saturación de oxígeno en la sangre venosa | 2 |
| DO ₂ | Índice de suministro de oxígeno | 2 |
| PO ₂ | Presión parcial de oxígeno | 2 |
| pCO ₂ | Presión parcial de dióxido de carbono | 4 |
| pHi | pH intramucoso | 2 |
| DC | Corriente directa | 5 |
| PC | Computadora personal | 5 |
| LPS | Lipopolisacárido | 8 |
| Dispersión α | Constante dieléctrica del tejido muscular como función de la frecuencia (1 KHz o menos) | 11 |
| Dispersión β | Se presenta para frecuencias por encima de la región de dispersión α (mayor a 1 KHz). | 11 |
| Dispersión γ | Aparece a frecuencias muy altas (más de 100 MHz). | 11 |
| Y | la admitancia de los tejidos | 16 |
| M | Módulo de los tejidos | 16 |
| ϵ | la constante dieléctrica de los tejidos | 16 |
| RNAs | Las Redes Neuronales Artificiales | 22 |
| LVQ | Red neuronal tipo cuantificación vectorial de aprendizaje (Learning Vector Quantization) | 22 |
| AM | Amplitud modulada | 33 |
| FM | Frecuencia modulada | 33 |
| PM | Fase modulada | 33 |
| Ec | Señal portadora en la entrada del multiplicador | 33 |
| Em | Señal moduladora | 33 |
| Vo | La señal en la salida del multiplicador que es producto de Ambas entradas, portadora y moduladora | 33 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| ω_c | frecuencia portadora | 34 |
| ω_m | la frecuencia moduladora | 34 |
| E _{cp} | es el valor pico de la señal portadora | 34 |
| E _{mp} | es el valor pico de la señal moduladora | 34 |
| FPB | Filtro pasa banda | 35 |
| AD7008 | Circuito integrado de Analog Devices, modulador digital y generador de señales sinusoidales. | 43 |
| DAC | Convertidor de señales analógicas a datos digitales | 43 |
| AD844 | Amplificador de retroalimentación de corriente de Analog Devices | 48 |
| AD600 | Amplificador de ganancia programable. | 50 |
| mezcladores | se componen de un modulador y un filtro pasa banda | 52 |
| AD539 | Multiplicador análogo | 53 |
| IDI | Índice de Daño Isquémico. | 96 |
| NDI | Nivel de Daño Isquémico. | 96 |
| INCICH | Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez de la ciudad de México | 102 |
| AMS | Arteria mesentérica superior. | 114 |
| FC | Frecuencia Cardíaca. | 114 |
| RVS | Resistencia Vascular Sistémica | 115 |
| N _{pHi} | Nivel de pHi | 138 |
| A215 | Amplitud de la impedancia medida en tejido vivo a frecuencia 215 HZ. | 139 |
| A1000000 | Amplitud de la impedancia medida en tejido vivo a frecuencia 1000000 HZ. | 139 |
| F215 | Fase de la impedancia medida en tejido vivo a frecuencia 215 HZ. | 139 |
| F1000000 | Fase de la impedancia medida en tejido vivo a frecuencia 1000000 HZ. | 139 |
| A215_N | Amplitud Normalizada de la impedancia a frecuencia 215HZ. | 139 |
| A1000000_N | Amplitud Normalizada de la impedancia a frecuencia 1000000HZ. | 139 |
| F215_N | Fase Normalizada de la impedancia a frecuencia 215HZ. | 139 |
| F1000000_N | Fase Normalizada de la impedancia a frecuencia 1000000HZ. | 139 |
| RESI215 | La Resistencia a frecuencia 215HZ. | 139 |
| RESI1000000 | La Resistencia a frecuencia 1000000HZ. | 139 |
| REACT215 | La Reactancia a frecuencia 215HZ. | 139 |
| REACT1000000 | La Reactancia a frecuencia 1000000HZ. | 139 |
| PROMAMPI | Promedio de amplitudes en la primera década | 139 |
| PROMAMPII | Promedio de amplitudes en la segunda década | 139 |
| PROMAMPIII | Promedio de amplitudes en la tercera década | 139 |
| PROMAMPIV | Promedio de amplitudes en la cuarta década | 139 |
| RESI_I | Promedio de las Resistencias la primera década | 139 |
| RESI_II | Promedio de las Resistencias en la segunda década | 139 |
| RESI_III | Promedio de las Resistencias la tercera década | 139 |
| RESI_IV | Promedio de las Resistencias en la cuarta década | 139 |
| REACT_I | Promedio de las Reactancias en la primera década | 139 |
| REACT_II | Promedio de las Reactancias en la segunda década | 139 |
| REACT_III | Promedio de las Reactancias la tercera década | 139 |
| REACT_IV | Promedio de las Reactancias en la cuarta década | 139 |
| PDAMPI_II | Pendiente de amplitudes entre la primera y segunda década | 139 |

| | | |
|---------------|---|-----|
| PDAMPI_III | Pendiente de amplitudes entre la primera y tercera década | 139 |
| PDAMPI_IV | Pendiente de amplitudes entre la primera y cuarta década | 139 |
| PDAMP1I_III | Pendiente de amplitudes entre la segunda y tercera década | 139 |
| PDAMP1I_IV | Pendiente de amplitudes entre la segunda y cuarta década | 139 |
| PDAMP1I_IV | Pendiente de amplitudes entre la tercera y cuarta década | 139 |
| PDRESII_II | Pendiente de Resistencias entre la primera y segunda década | 139 |
| PDRESII_III | Pendiente de Resistencias entre la primera y tercera década | 139 |
| PDRESII_IV | Pendiente de Resistencias entre la primera y cuarta década | 139 |
| PDRESIII_III | Pendiente de Resistencias entre la segunda y tercera década | 139 |
| PDRESIII_IV | Pendiente de Resistencias entre la segunda y cuarta década | 139 |
| PDRESIII_IV | Pendiente de Resistencias entre la tercera y cuarta década | 139 |
| PDREACTI-II | Pendiente de Reactancias entre la primera y segunda década | 139 |
| PDREACTI_III | Pendiente de Reactancias entre la primera y tercera década | 139 |
| PDREACTI_IV | Pendiente de Reactancias entre la primera y cuarta década | 139 |
| PDREACTII_III | Pendiente de Reactancias entre la segunda y tercera década | 139 |
| PDREACTII_IV | Pendiente de Reactancias entre la segunda y cuarta década | 139 |
| PDREACTIII_IV | Pendiente de Reactancias entre la tercera y cuarta década | 139 |
| RAMP1 | La primera resistencia en el modelo estimada desde los datos de las Amplitudes medidos en el tejido | 139 |
| RAMP2 | La segunda resistencia en el modelo estimada desde los datos de las Amplitudes medidos en el tejido | 139 |
| RAMP3 | La tercera resistencia en el modelo estimada desde los datos de las Amplitudes medidos en el tejido | 139 |
| RAMP4 | La cuarta resistencia en el modelo estimada desde los datos de las Amplitudes medidos en el tejido | 139 |
| RAMP5 | La quinta resistencia en el modelo estimada desde los datos de las Amplitudes medidos en el tejido | 139 |
| RAMP6 | La sexta resistencia en el modelo estimada desde los datos de las Amplitudes medidos en el tejido | 139 |
| RCOMPX1 | La primera resistencia en el modelo estimada desde los datos complejos de la impedancia del tejido | 139 |
| RCOMPX2 | La segunda resistencia en el modelo estimada desde los datos complejos de la impedancia del tejido | 139 |
| RCOMPX3 | La tercera resistencia en el modelo estimada desde los datos complejos de la impedancia del tejido | 139 |
| RCOMPX4 | La cuarta resistencia en el modelo estimada desde los datos complejos de la impedancia del tejido | 139 |
| RCOMPX5 | La quinta resistencia en el modelo estimada desde los datos complejos de la impedancia del tejido | 139 |
| RCOMPX6 | La sexta resistencia en el modelo estimada desde los datos complejos de la impedancia del tejido | 139 |
| A215_M | Amplitud calculada en el modelo del tejido a frecuencia 215HZ. | 139 |
| A31623_M | Amplitud calculada en el modelo del tejido a frecuencia 31623HZ. | 139 |
| A1000000_M | Amplitud calculada en el modelo del tejido a frecuencia 1000000HZ. | 139 |
| F215_M | Fase calculada en el modelo del tejido a frecuencia 215 HZ. | 139 |
| F1000000_M | Fase calculada en el modelo del tejido a frecuencia 1000000HZ. | 139 |

Capítulo 1

1. Introducción

1.1. Identificación del problema

La posibilidad de determinar la viabilidad de un tejido se presenta como un área de gran importancia en el ambiente clínico. Para este propósito muchos procedimientos han sido desarrollados y sin embargo, por una variedad de razones, en la práctica los médicos todavía utilizan aspectos visuales y mediciones de temperatura para evaluar dicha viabilidad. Debido a esto y conforme pasan los años, el interés de desarrollar una técnica universal eficiente y confiable para valorar la viabilidad del tejido ha aumentado. Un ejemplo clásico en donde la estimación de este aspecto es de importancia extrema es la condición de *choque* y la subsecuente *resucitación* en terapia intensiva.

En la última década se ha confirmado el papel crítico que juega el daño isquémico de la mucosa gastrointestinal en el desarrollo de falla orgánica múltiple en pacientes en shock [2]. La importancia de la mucosa radica en que este tejido es el primero en ser afectado por los mecanismos compensados del cuerpo ante una insuficiencia sistémica en el suministro de oxígeno. Una vez que este tejido se desintegra, llegan a la circulación sanguínea mediadores de depresión cardiovascular, endotoxinas y bacterias las cuales agravan mucho la condición de shock y llevan a la falla orgánica múltiple. Isquemia en la mucosa gastrointestinal ocurre en más de 56% de los pacientes en cuidados intensivos, y ha sido relacionado con 80% de las muertes³. En los últimos años se han desarrollado y evaluado varias terapias enfocadas a evitar o limitar los efectos negativos del daño isquémico en la mucosa^{4,5}. Estas terapias han demostrado un alto potencial para reducir la mortalidad y morbilidad en este tipo de pacientes, sin embargo pueden tener un efecto negativo si se aplican fuera de tiempo. En este proyecto se propone que un método mínimamente invasivo para determinar la condición de la mucosa puede ser utilizado para guiar la terapia, y que de esta manera se logra una mejora significativa en la efectividad del tratamiento y por lo tanto en la supervivencia de este tipo de pacientes. Este método utiliza una sonda gástrica que permite obtener un espectro de impedancia eléctrica de la mucosa y que este último permite identificar el nivel de daño tisular. Ya se tiene un primer prototipo del instrumento en evaluación.

1.1.1 Condición de choque y resucitación

La condición de choque se define como aquella en la cual el suministro de oxígeno cae por debajo de la demanda energética de los tejidos del cuerpo. Se caracteriza por falta de oxígeno, consumo de oxígeno dependiente del suministro, y metabolismo anaeróbico con sobreproducción de ácido láctico y bióxido de carbono. El choque se divide en fase compensatoria, o compensable, cuando la respuesta autonómica del individuo es capaz de sostener variables hemodinámicas como presión arterial media y gasto cardíaco a pesar de una situación patológica sostenida, y fase no compensada, o no compensable, cuando la situación patológica ha sobrepasado la capacidad autonómica del individuo, e incluso puede superar los actos de reanimación del médico tratante, por lo cual conduce a una sub-fase final, llamada irreversible, cuando el individuo ha entrado en falla orgánica multisistémica. La resucitación (compensación) solo se puede completar cuando toda evidencia de la mala

oxigenación del tejido defectuoso se haya eliminado. Una gran proporción de pacientes sometidos a cirugía mayor o que se encuentran en terapia intensiva y que parecen adecuadamente resucitados de acuerdo al criterio convencional presentan una deficiencia de oxígeno o acidosis en el tejido y en realidad se encuentran por definición aún en estado de choque o incompletamente resucitados. Sin embargo se trata de un choque en fase compensatoria que no siempre es un choque manifiesto. [2]

En el paciente que presenta un estado de choque compensado, la presión sanguínea, producción de orina, perfusión cutánea y gases sanguíneos suelen ser normales. La insuficiente oxigenación del tejido durante el choque compensado se hace difícilmente evidente mediante un examen clínico, ya que se concentra en los órganos espláncnicos, y especialmente en la mucosa intestinal. La importancia de la falsa naturaleza del choque compensado en cuanto a un diagnóstico correcto recae no solamente en su presencia en pacientes de cirugía mayor o de enfermedad crítica, sino también en la mortalidad con la cual se asocia, y para la cual en particular la oxigenación defectuosa de la mucosa intestinal parece ser la principal razón. [2]

La importancia de detectar tempranamente el choque radica en la reducción de la mortalidad y/o costos de los hospitales debidos al esfuerzo 'hiper-resucitativo' que previene el choque compensado en pacientes sometidos a cirugía mayor [2].

A continuación se discuten las razones por las cuales el choque se concentra en los órganos espláncnicos y especialmente en la mucosa gastrointestinal, las técnicas de detección, y la forma en que éstas contribuyen a disminuir la tasa de mortalidad para pacientes de cuidado intensivo. Por último, se consideran algunas estrategias para prevenir y revertir los efectos del choque compensado en la mucosa intestinal y se examinan sus consecuencias.

1.1.2. Detección del choque, y su tratamiento

Las variables tradicionales medidas para valorar la suficiencia de la terapia de "resucitación" (pulso, presión sanguínea, producción de orina, perfusión cutánea y análisis de gases sanguíneos) permiten únicamente la detección de estados hipotensivo del choque, pero no la del estado de choque compensado. Las mediciones globales de aporte de oxígeno, tasa de su consumo, razón de extracción (O_2ER), saturación venosa mixta (SVO_2) y lactato sanguíneo han sido utilizadas para demostrar la inadecuada oxigenación del tejido durante el choque. Sin embargo, estas mediciones son pobremente sensibles y nada específicas a la adecuada oxigenación del tejido durante el choque compensado, la cual se presenta en algunos tejidos y no en otros. Además, es difícil, si no imposible, especialmente en casos de septicemia, determinar qué tan adecuada es la oxigenación del tejido utilizando mediciones relativas, como el DO_2 (índice de suministro de oxígeno), o absolutas, como la medición de lactato sanguíneo, producto de más de una variable [3].

Por otro lado, la medición regional de PO_2 en la piel o el tejido subcutáneo y del pH intramucoso en el intestino son más sensibles a la insuficiencia de oxigenación del tejido en estado de choque hemorrágico y resucitación que mediciones globales del suministro de oxígeno [2]. La PO_2 en la piel o el tejido subcutáneo es una medida sensible y continua (aunque relativa) del suministro de oxígeno para estos tejidos, pero no permite determinar cuál de ellos es capaz de extraer y utilizar el oxígeno en cantidad tal que satisfaga sus necesidades metabólicas, especialmente durante una

septicemia. Sin embargo, la medición del pH intramucoso en el intestino realizada indirectamente mediante un tonómetro TRIP intraluminal [2] provee una medición regional absoluta de la suficiencia de oxigenación del tejido en la región del cuerpo que se ve afectada durante el choque compensado [5].

El cuidado del paciente crítico en peligro de choque puede incluir una gran gama de medidas preventivas y reactivas. Antes que nada es importante prevenir o limitar una situación de isquemia en la mucosa mediante técnicas de resucitación hemodinámica agresiva, vasodilatadores para aumentar la perfusión local, oxigenación intraluminal y reducción de los requerimientos de oxígeno, eliminando focos de pus y/o enfriando el tejido. El peligro debido a las bacterias normales en el lumen intestinal puede ser reducido por tratamiento antibiótico, lavado intestinal y limpieza de focos de infección. La auto-digestión de la pared intestinal puede prevenirse mediante la reducción del pH luminal y la remoción o inhibición de proteasas pancreáticas. Una vez que el daño isquémico ha llegado a cierto punto es importante prevenir daño adicional por reperfusión y radicales libres mediante eliminadores farmacológicos de estos radicales y la limitación gradual de la perfusión [10]. Es importante mantener también la habilidad de los tejidos dañados para repararse a través de una nutrición parenteral adecuada y reinicio temprano de nutrición enteral. Finalmente, es importante reconocer el potencial letal de la mucosa dañada y no intentar salvar tejidos de viabilidad dudosa, dando preferencia al aislamiento y extirpación de éstos cuando sea necesario [3].

En resumen, hace falta una técnica instrumental de bajo costo, que sea aplicable universalmente, no invasiva, poco compleja, continua, eficiente, precisa, que monitoree cuantitativa y rápidamente la viabilidad de la mucosa intestinal, que pueda también aplicarse a otros tejidos biológicos que presenten problemas clínicamente significativos y generales. Sus soluciones deben ser originales y aplicables para un gran número de situaciones, no deben ser triviales y deben presentar ventajas sobre aquellas obtenidas mediante métodos existentes. Podemos concluir que este es un problema interesante y complejo, y que sus soluciones requieren un enfoque científico completo.

La espectroscopía de impedancia ya ha sido utilizada ya por varios investigadores para detectar cambios causados por isquemia en tejidos biológicos^{6,7}, pero hasta ahora nadie ha intentado hacer mediciones de impedancia en la mucosa gastrointestinal in situ. Métodos de monitoreo han sido desarrollados para detectar hipoperfusión, hipoxia e isquemia local en la mucosa, entre los que destaca la tonometría gastrointestinal que permite calcular de forma indirecta el pH intramucoso (pHi), para detectar isquemia en este tejido, la cual se ha vuelto una técnica de reconocido valor clínico⁸. Sin embargo, no es suficiente para guiar la terapia, el detectar la presencia de isquemia; cuando la mucosa ya se encuentra isquémica, es necesario poder determinar el grado de daño ocasionado.

En esta investigación se propone el desarrollo de un sistema basado en espectrometría de impedancia para monitorear la permeabilidad iónica e integridad de las paredes celulares de la mucosa, al igual que el volumen sanguíneo tisular a fin de determinar el grado de daño isquémico.

Se ha escogido una técnica basada en los principios de espectroscopía de impedancia para resolver el problema principal de la investigación por las siguientes razones:

- Las mediciones de impedancia no son dañinas para el tejido y pueden realizarse de forma no invasiva, no interfieren con la operación de otros aparatos clínicos y su sensibilidad no está limitada a tejidos subcutáneos, sino que se pueden también emplear para tejidos enteros. Los electrodos de medición de impedancia y en general todo el sistema de medición son fáciles de armar y manejar.
- nuestros resultados preliminares muestran cambios en los espectros de impedancias en el tejido corresponden a niveles de daño diferentes. También varias investigaciones han demostrado que la impedancia de un tejido isquémico tiene algunas propiedades diferentes comparado con tejidos no isquémicos.

La aplicación de técnicas de espectroscopía de impedancia para mediciones de daño isquémico en la mucosa intestinal es una metodología original. Expandirá el conocimiento existente en el campo de los estudios de la isquemia.

1.2. Objetivos

El objetivo principal de esta línea de investigación es el desarrollo y evaluación de un nuevo dispositivo de monitoreo tisular para pacientes en estado crítico en peligro de choque y falla orgánica múltiple. En los últimos años se ha reconocido la importancia de los tejidos viscerales, y en especial de la mucosa intestinal, en el proceso de descompensación por choque. Se han desarrollado métodos de monitoreo para determinar las condiciones del flujo sanguíneo, pH, pO_2 , y pCO_2 , para detectar la hipoperfusión, hipoxia e isquemia local en la mucosa. Sin embargo lo más importante a determinar para diagnosticar y guiar la terapia no es la presencia de isquemia, sino la viabilidad del tejido y el daño isquémico ocasionado. En particular, es importante poder determinar si el daño de la mucosa es irreversible y si se ha perdido su función protectora, permitiendo el paso de bacterias al sistema circulatorio.

Objetivos específicos

Ya se ha desarrollado un primer prototipo del espectrómetro de impedancia que se propone. Sin embargo, falta aún mostrar que los espectros de impedancia son reproducibles y capaces de diferenciar las etapas del daño isquémico.

Los objetivos generales que se proponen para este proyecto son:

1. Diseñar y construir un espectrómetro de impedancia basado en una computadora personal portátil. El instrumento será capaz de medir la impedancia tisular en un dado rango de frecuencias de interés (100 Hz a 1 MHz).
2. Realizar una evaluación cualitativa del instrumento funcionando in vivo buscando detectar en los espectros los diferentes niveles de daño isquémico.
3. Desarrollar un algoritmo para calcular el nivel de daño isquémico en función de la acidosis del tejido.
4. Desarrollar un modelo eléctrico característico para estimar la impedancia del tejido en el rango de frecuencias de interés.
5. Desarrollar una red neuronal para clasificar los niveles de daño isquémico a partir de los parámetros característicos de la impedancia tisular.

1.3. Hipótesis y aproximación a la investigación

Para esta investigación se han planteado cinco hipótesis centrales:

- (a) Las mediciones de espectroscopía de impedancia compleja del tejido en un rango de frecuencias dado (100 Hz a 1 MHz) pueden proveer datos que en su estructura reflejan información sobre la isquemia y el nivel de daño isquémico en el tejido, y que pueden ser afectados por algunas variables (tales como la geometría del tejido, la concentración de electrolitos, la temperatura, etc.).
- (b) Es posible desarrollar un algoritmo que emplee los datos complejos del espectro de impedancia del tejido para estimar cualitativa y cuantitativamente los niveles absolutos de daño isquémico en el tejido.
- (c) Las mediciones de impedancia en tejido vivo a diferentes niveles de isquemia y daño isquémico pueden ser aproximadas por medio de un modelo matemático y eléctrico del tejido.
- (d) Se puede identificar un conjunto de parámetros espectrales que tengan mucha sensibilidad a las variaciones de los factores fisiológicos influenciados por la isquemia y el daño isquémico.
- (e) Las redes neuronales artificiales pueden ser usadas para establecer una correlación cuantitativa entre el nivel de daño isquémico y/o el pH del tejido (el cual es la mejor medición disponible para la isquemia) y los espectros de la impedancia en este tejido. También, puede ser la mejor herramienta para construir un sistema de clasificación y reconocimiento de patrones.

En este trabajo se pretende probar estas hipótesis desarrollando un instrumento de medición de impedancia compleja del tejido sobre el rango de frecuencias señalado. Este instrumento debe tener parámetros de operación fácilmente ajustables (como la selección de frecuencias de impedancia, la amplitud de corriente de excitación aplicada al tejido, etc.). Debe, por otro lado, ser un instrumento portátil, para lo cual operará con una batería. Debe también cumplir las normas de seguridad para funcionar en un ambiente clínico: ser certero, seguro, simple de usar y de bajo costo. Los datos mediante él obtenidos deben almacenarse, analizarse y presentarse en una computadora personal utilizando los programas apropiados. La computadora debe recibir los datos de las mediciones desde el instrumento a través de una tarjeta de adquisición. El sistema de *software* deberá hacer dos cosas principalmente: monitorear la isquemia y medir el nivel de daño en el tejido.

Capítulo 2

2. Antecedentes

En esta sección, se presentan cinco conceptos fundamentales para esta investigación:

- 1) Isquemia del tejido.
- 2) Técnicas de medición y monitoreo de isquemia y reperfusión del tejido.
- 3) Propiedades eléctricas del tejido.
- 4) Espectroscopía de impedancia.
- 5) Redes neuronales artificiales

La información relevante se basa en trabajos producidos por diversos investigadores, y se presenta de una manera concisa, como base para la investigación.

2.1. La isquemia en el tejido

Como se señaló, el objetivo de este proyecto es desarrollar un instrumento para la medición y caracterización de la isquemia y el daño isquémico subsecuente y debido a ello es importante entender completamente su fisiopatología, los parámetros involucrados que deben medirse, y cuáles de éstos cambian con el tiempo o el agravamiento de la condición y cuáles son constantes.

El término '*isquemia*' se refiere a la condición en la cual el flujo sanguíneo no es suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de un tejido. Cuando el surtido de nutriente y oxígeno para un tejido se reduce o detiene por algún tiempo, el tejido entra en isquemia. Al reducir el suministro de oxígeno, el metabolismo de las células se vuelve anaeróbico, con la consecuente producción de ácido láctico y reducción de energía celular. Además, el desalojo de los productos de deshecho como agua, iones, y bióxido de carbono, se hace más lento o se detiene por completo. En isquemia leve (de tiempo corto o suministro disminuido pero no ausente) todos los cambios mencionados son reversibles; si la isquemia se intensifica, se hacen irreversibles, el tejido utiliza toda la energía almacenada y muere.

El daño isquémico se caracteriza por consumo de oxígeno limitado al suministro, metabolismo anaeróbico, evacuación celular insuficiente y reducción del volumen extracelular. La acumulación de ácido láctico y ácido carbónico (por exceso de CO₂) produce caída del pH. Después de un período de isquemia se produce acumulación de iones y aumento en la osmolaridad intracelular. La isquemia también se caracteriza por incremento en la permeabilidad de las membranas que induce edema en el tejido y una reducción de los procesos activos de transporte.

La *reperfusión* es el proceso en el que se restablece el flujo sanguíneo al tejido. Todos los parámetros regresarán a sus valores normales si la reperfusión se da en un corto período de tiempo (de 15 a 30 minutos) post isquemia. Entre mayor sea el período de isquemia, mayor es el daño tisular y la severidad del choque, debido a acumulación de la enzima xantina oxidasa, la cual, ante la reoxigenación causada por la reperfusión, genera radicales libres derivados del oxígeno. Estos radicales son destructores altamente efectivos de tejido y aceleran la destrucción de la barrera mucosa.

A continuación se discuten varios de los efectos que la isquemia temprana tiene en la mucosa intestinal, cambios en el equilibrio del metabolismo corporal y cambios fisiopatológicos en el tejido isquémico, en particular los cambios que ocurren en el pH tisular.

2.1.1. La mucosa intestinal durante el estado de choque

Se definió el *estado de choque* como una condición crítica durante la cual el suministro de oxígeno cae por debajo de la demanda energética de los tejidos. La importancia de los órganos espláncnicos en el choque radica en que estos órganos son el blanco principal de cualquier insuficiencia en el suministro de oxígeno, ya que los mecanismos compensatorios del cuerpo favorecen y protegen la perfusión del corazón y el cerebro, y secundariamente de los músculos esqueléticos. En particular la mucosa gastrointestinal se ve comprometida tan pronto se presenta la irregularidad en cualquier otra parte del cuerpo. Luego, esta mucosa contribuye en forma crítica a la progresión del choque y la subsecuente falla múltiple de órganos al mermarse su función vital como barrera protectora. La figura 2.1 ilustra la patogénesis de falla múltiple de órganos, y el papel fundamental de la mucosa en este proceso [4].

El daño a las membranas permite en primera instancia el paso de endotoxinas, en particular el lipopolisacárido (LPS). Más adelante se promueve la translocación de bacterias enteras a la circulación linfática y portal, y a la cavidad peritoneal. El daño también expone a la pared intestinal a procesos de autodigestión y úlceras.

La probabilidad de falla múltiple de órganos y muerte se encuentra directamente relacionada con este daño isquémico.

2.1.2. Medición indirecta del pH intramucoso por medio de tonometría gastrointestinal

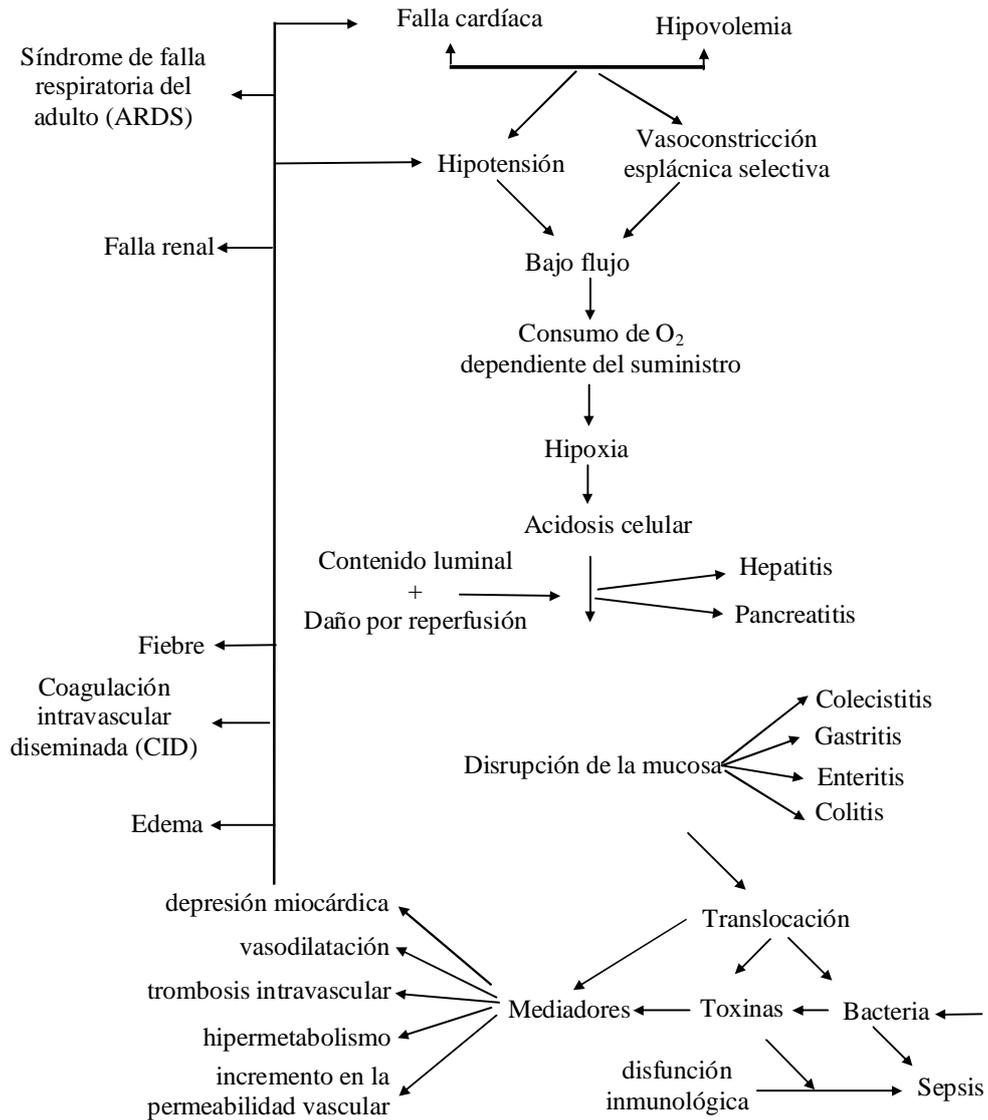
La medición indirecta del pH intramucoso, calculada a partir de la PCO_2 en el fluido luminal y la concentración de bicarbonato en la sangre arterial, se fundamenta en el conocimiento de que la PCO_2 en la mucosa se equilibra con la PCO_2 en el fluido luminal y puede ser deducida a partir de ésta. Por otro lado, también depende del hecho de que se asume que la concentración de bicarbonato en el tejido es aproximadamente aquella que se deriva para ésta de la sangre arterial. La medición es entonces un reflejo más preciso del pH de las capas superficiales de la mucosa que de las capas profundas. La PCO_2 del fluido luminal se encuentra en equilibrio con la PCO_2 del tejido. La medición indirecta del pH intramucoso se correlaciona estrechamente con mediciones hechas directamente con la micropipeta de pH, pero tiende a subestimar la severidad de la acidosis tisular presentes a bajo flujo y especialmente en el estado en el que no hay flujo debido a la diferencias entre la cantidad de bicarbonato arterial y del tejido [10-13]. El método indirecto no daña los tejidos y no tiene sensores que requieran recalibración [13].

El único método que ha demostrado valor para este tipo de pacientes y ha encontrado un uso clínico regular es la medición indirecta del pH intramucoso (pHi), por tonometría gástrica o colónica. Este método, desarrollado por Fiddian-Green [5,6], utiliza una sonda intestinal que lleva un globo de silicona en la punta distal, con una pared muy delgada y permeable a gases. El globo se infla con 2.5 ml de solución salina, una vez localizado en el estómago o colon. La presión parcial de CO_2 se equilibra rápidamente con la del tejido de la mucosa por difusión. Después de un

tiempo de equilibrio la muestra de solución salina es sustraída y analizada en un gasómetro junto con una muestra de sangre arterial. El pHi (pH intramucoso) es calculado usando la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pHi = 6.1 + \log [HCO_3^-] / \alpha(PCO_2)$$

donde α representa la solubilidad del CO_2 en plasma ($\alpha = 0.03$), 6.1 es el llamado pKa, valor de pH en el que se equilibran las concentraciones de $[H_2CO_3]$ y $[HCO_3^-]$. Un pHi por debajo del pH normal de 7.35 indica isquemia en la mucosa.



Causas y efectos de la isquemia esplácnica

Fig. 2.1. Patogénesis de falla múltiple de órganos y papel fundamental de la mucosa intestinal durante la isquemia. Reproducido y traducido de "Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure" [4]

2.1.3. Daño a la mucosa intestinal

En experimentos hechos con cerdos, se observó que un descenso del pH intramucoso produce un aumento de la permeabilidad mucosa [15]. El incremento de la permeabilidad de la mucosa durante la isquemia se desarrolla antes de presentarse cualquier evidencia histológica de daño a la mucosa [14]. Puede también seguir un desarrollo de la evidencia endoscópica e histológica del daño mucoso, cuya severidad se incrementa con la intensidad y duración de la liberación de ácidos intramucosos que le antecede. El desarrollo de los ácidos intramucosos puede preceder al desarrollo de estas evidencias macroscópicas del daño mucoso y a toda evidencia clínica de la isquemia intestinal por muchas horas y aún días [2].

El daño isquémico en la mucosa comienza en las capas superficiales y se extiende progresivamente al interior [14]. Los músculos constituyen la última parte de la pared intestinal en ser afectada, por tanto no muestran evidencia de daño tisular hasta que se exponen a oclusiones vasculares totales por varias horas. El infarto transmural ocurre después de al menos 8 horas de isquemia severa. (Figura 2.2) [14]. Para pacientes en estado crítico, un grado bajo de isquemia no oclusiva de la mucosa puede persistir por días o semanas sin convertirse en infarto transmural. Para el caso de pacientes con isquemia crónica, grados bajos de isquemia de la mucosa pueden también persistir por meses sin convertirse en infarto siempre y cuando la isquemia se limite a las capas superficiales de la mucosa y la tasa de incremento de la destrucción celular en la región sea igual a la tasa de incremento de células renovadas y reconstruidas a partir de secciones no isquémicas [2].

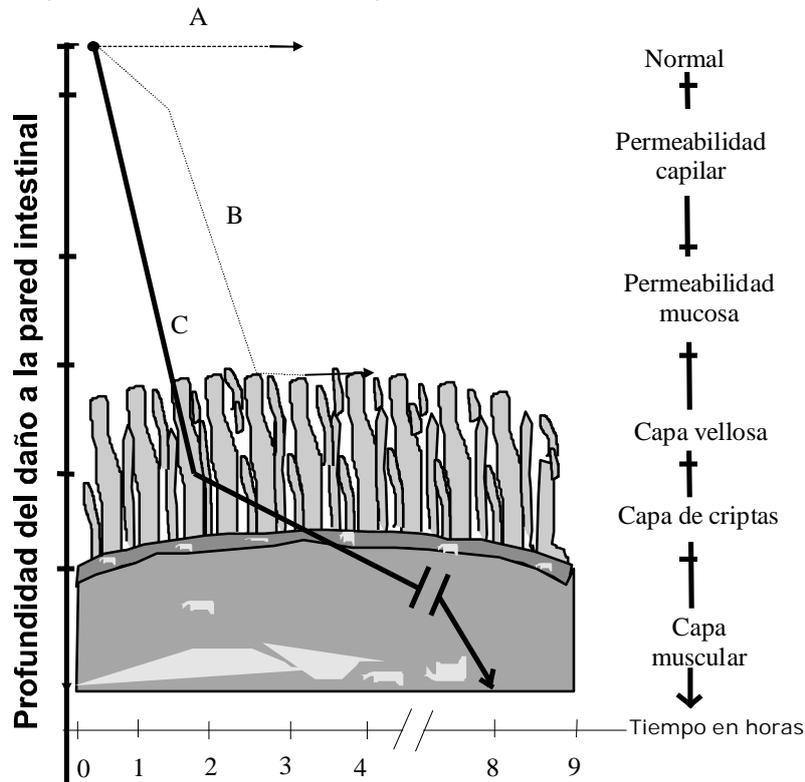


Figura 2.2. El grado de daño isquémico a la pared intestinal graficado contra la duración de la isquemia. Las tres curvas (A, B y C) representan oclusiones vasculares. Reproducido y traducido de Haglund et al [14].

La mucosa intestinal es especialmente susceptible a los radicales libres derivados del oxígeno liberados por la reoxigenación de la mucosa hipóxica [15]. El grado del daño por reperfusión es también una función de la severidad de la acidosis intra mucosa presente antes de la reperfusión [16]. Ni el daño por reperfusión ni el incremento en la permeabilidad de la mucosa suceden sin una previa acidosis intra mucosa. La severidad del daño por reperfusión inducida por shock en animales se atenúa al prevenir dicha reperfusión por medio de inhibidores de la xantina oxidasa como el *allopurinol*, o por quelantes de radicales libres como la superóxido dismutasa.

2.2. Técnicas para medición y monitoreo de isquemia y perfusión tisular [1]

Para el desarrollo de este proyecto es importante conocer la instrumentación y los sistemas existentes utilizados para la evaluación clínica de la isquemia. Para desarrollar el mejor instrumento posible, tenemos que conocer los principios sobre los cuales las técnicas existentes se basan, sus ventajas y sus desventajas. Este material se presenta a continuación.

Existen muchos métodos disponibles que pueden ser utilizados para medir y/o monitorear la isquemia y la perfusión del tejido, sin embargo, la mayoría de ellos no son convenientes para nuestra aplicación. Para poder seleccionar y aplicar una técnica óptima para nuestro caso, podemos referirnos a Dunn [18] y Jones [19], quienes definen las características de un sistema 'ideal' para monitorear la isquemia y perfusión de tejido transplantado:

1. *inofensivo para el paciente*
2. *no invasivo o mínimamente invasivo*
3. *certero y confiable (sensible y específico)*
4. *que proporcione una respuesta rápida a los cambios en la perfusión*
5. *de sencilla utilización para poder ser empleado por todo el personal*
6. *aplicable a todos tipos de tejido transplantado*
7. *capaz de dar lecturas discretas o continuas a lo largo de un monitoreo constante prolongado*
8. *que proporcione resultados objetivos (cuantificables) y repetibles*
9. *capaz de distinguir entre problemas venosos y arteriales*
10. *barato*
11. *estable durante estudios largos (con una duración de varios días)*
12. *portátil*

En esta sección se describen brevemente diferentes métodos para la medición y/o monitoreo de la isquemia y la perfusión, y se comparan en forma crítica contra otros métodos, describiendo sus ventajas y desventajas. Los sistemas de monitoreo basados en métodos de impedancia se describen con más detalle al final del capítulo.

2.2.1. Comparación de varias técnicas de medición y monitoreo de isquemia y perfusión del tejido [1]

Los métodos para medir y monitorear la isquemia y perfusión del tejido pueden dividirse en dos categorías: monitoreo directo de la perfusión y monitoreo de las consecuencias de variación en la perfusión. Los monitores de perfusión directos se basan en diferentes mecanismos: el efecto Doppler ultrasónico y lúminico usando láser, barrido dúplex, teñido por resina fluorescente, la fotopletismografía, la angioscopía, la arteriografía, y mediciones de impedancia. La mayoría de estos métodos se utilizan para tejidos superficiales y no sirven para el tejido gastrointestinal.

- *Doppler Ultrasónico:* Para esta técnica, una sonda miniatura de Doppler ultrasónico se implanta quirúrgicamente alrededor de la arteria de suministro principal del tejido monitoreado. Este método tiene varios severos inconvenientes: se requiere de otro procedimiento quirúrgico para remover la sonda, ésta puede ser mal colocada, la punta de la sonda puede producir oclusión arterial, y además, este método no posee sensibilidad para distinguir entre diversos grados de oclusión venosa.
- *Doppler lúminico usando Láser:* Utiliza un rayo láser para detectar de forma no invasiva el flujo sanguíneo en las áreas cutáneas del tejido. La sonda puede medir flujo únicamente hasta una profundidad de uno a dos milímetros, lo cual no es suficiente para reflejar el flujo a través de todo el tejido, y no es fácil utilizarlo para monitoreo en la mucosa.
- *Barrido dúplex:* Posee un dispositivo de Doppler ultrasónico más sofisticado que incorpora un generador convencional de imágenes de ultrasonido de *modo B*. Este generador de imágenes localiza las venas o arterias subcutáneas de interés y la instrumentación Doppler determina la velocidad del flujo. Es una técnica no invasiva, pero adolece de la mayoría de las desventajas del Doppler convencional.
- *Teñido por resina fluorescente:* Una resina fluorescente se administra de forma intravenosa al paciente. Diez o veinte minutos después, ésta se ha distribuido uniformemente a través de las partes del cuerpo que presentan el fenómeno de perfusión. En ese momento, si la piel se expone a luz ultravioleta, la resina emite una luz fluorescente. Su intensidad depende de la cantidad de resina en cada punto en particular, la cual a su vez depende de la perfusión. La más grande limitación de este método es que no es una técnica continua ni cuantitativa. Es necesaria una poca de habilidad y experiencia para poder evaluar los resultados.
- *Fotopletismografía:* Se basa en el fenómeno de reflexión y absorción de luz por el flujo sanguíneo al hacer pasar un haz luminoso a través del tejido. Este método no es invasivo, pero no sirve en la mucosa.
- *Angioscopía microvascular por fibra óptica:* Es una técnica endoscópica en la cual se utiliza una fibra óptica delgada para ver la estructura de los vasos sanguíneos. Esta técnica permite una penetración real en los vasos, y es apropiada para la evaluación de resultados de cirugía, sin embargo, es totalmente invasiva, y no puede ser usada para aplicaciones de monitoreo.
- *Arteriografía:* Es una técnica de imagenología de rayos-X, en la cual un material contrastante se inyecta en el flujo sanguíneo, pudiendo así observar, registrar y analizar su patrón de flujo. Esta es una técnica invasiva, la cual requiere mucho equipo y por tanto no puede ser usada para monitoreo a pie de cama.

La segunda categoría, la cual se refiere a los métodos de monitoreo de isquemia por medio de las consecuencias de la perfusión incluye: método termométrico, mediciones de PO₂ transcutáneo, mediciones de pH y espectroscopía de impedancia.

- *Monitor termométrico:* Mide la temperatura del tejido. Este método es simple, pero tiene muchas limitaciones: su respuesta es muy lenta, el tejido puede ser calentado o enfriado por fuentes externas, no sirve para la mucosa intestinal, etc. A pesar de estos problemas, este método se utiliza en muchas clínicas debido a su ya mencionada simpleza,
- *Medición de la PO_2 transcutáneo:* Se han obtenido mediciones exitosas mediante monitoreo no invasivo de isquemia [7]. La PO_2 es un indicador muy sensible a la circulación local y se usa para la detección temprana de la isquemia.[1] Sin embargo, este método solamente puede ser usado para tejido subcutáneo, y no necesariamente detecta daño isquémico.
- *Mediciones de pH:* Han demostrado una mejor capacidad de monitoreo. Se pueden implementar microelectrodos de pH en el tejido de interés y estos indican el valor objetivo de isquemia en el tejido [18,23]. La debilidad de este método es que es invasivo y que requiere de calibración al empezar un proceso de monitoreo tomando una muestra de sangre y midiendo su pH con un analizador de gases.

2.2.2. Técnicas basadas en impedancia para el monitoreo de la isquemia y la perfusión del tejido

Tres grupos de investigadores han proporcionado las mediciones de impedancia para el monitoreo de la perfusión continua y directa del tejido. Concannon et al [20] midieron la impedancia del tejido a una sola frecuencia utilizando para ello un electrodo de cuatro agujas implantado en tejido muscular. Mostraron así que la impedancia cambia con el flujo pulsátil de sangre presente en la muestra de tejido. Cuando ocurre una oclusión arterial este componente pulsátil de impedancia desaparece. En el caso de oclusión venosa la amplitud del componente pulsátil de la impedancia disminuye. Harrison et al [21] reportaron resultados similares. En este caso midieron la impedancia del tejido utilizando el mismo método pero con electrodos de cuatro hilos mucho más pequeños, colocados de manera invasiva sobre la superficie del tejido [22,23,24]. Ambos investigadores propusieron técnicas basadas en impedancia las cuales sufren de varios severos inconvenientes: son invasivas, no proporcionan mediciones absolutas de la isquemia y la perfusión, no pueden detectar oclusiones en arterias y/o venas pequeñas, la oclusión venosa es difícil de detectar en general, y no pueden proporcionar una medición cuantitativa de la isquemia del tejido.

Por último, no hay que olvidar el trabajo de Ristic [1], cuyo objetivo era la evaluación del daño isquémico mediante espectroscopía de impedancia y mediciones en tejido muscular, y cuyos resultados aseguran que la espectroscopía de impedancia puede evaluar el nivel de daño tisular.

2.3. Espectroscopía de impedancia

El objetivo de este proyecto es desarrollar un instrumento basado en los principios de espectroscopía de impedancia y por ello es importante presentar primero sus fundamentos, ventajas, desventajas y limitaciones. El material requerido para obtener el entendimiento básico en esta área se presenta en esta sección. Primero se define la espectroscopía de impedancia y se discuten sus principios. Mas adelante se presentan ejemplos de sus aplicaciones relevantes para nuestro proyecto.

Las mediciones de impedancia eléctrica se han utilizado para estudiar sistemas biológicos desde fines del siglo pasado. La mayoría de los estudios realizados incluyen mediciones de impedancia compleja de diferentes tejidos o células en suspensión [7-9, 20-37]. Para ello y para el análisis de los datos obtenidos, surgió un nuevo campo denominado 'espectroscopía de impedancia.

2.3.1. Definición y principios de espectroscopia de impedancia

Podemos aceptar la definición de espectroscopía de impedancia como aquella dada por Macdonald [22] y Ristic [1]: "Espectroscopía de impedancia es un término general que sublima la medición de pequeñas señales eléctricas lineales y el análisis subsecuente de su respuesta para producir información útil acerca de las propiedades fisicoquímicas de un sistema". La espectroscopía de impedancia tiene dos componentes: métodos de medición y técnicas para analizar e interpretar los resultados.

Los métodos de medición en este caso son técnicas para caracterizar la impedancia compleja de un material en un determinado rango de frecuencias. La espectroscopía de impedancia no se limita a mediciones de impedancia. Se puede también medir admitancia compleja, constantes dieléctricas, etc. Sin embargo, aunque las mediciones son en principio simples, en la práctica presentan complicaciones debido a muchas razones. El rango de frecuencias de medición puede extenderse sobre varios ordenes de magnitud (en algunos casos involucrando mas de doce ordenes), y por otro lado, los valores de la impedancia pueden también abarcar varios ordenes de magnitud en el rango de frecuencias de interés (debido a los componentes resistivos y capacitivos del material). La operación de los electrodos utilizados como interfaz con el material de interés depende del voltaje de corriente directa (DC) entre los electrodos y el material. El sistema de medición debe proveer y controlar este voltaje DC. Todos estos factores combinados hacen que la medición fluctúe mucho. Un diagrama a bloques de un sistema de medición de impedancia se muestra en la figura 3.3.

El análisis e interpretación de los datos obtenidos es necesario para la caracterización del material estudiado. La primera etapa consiste generalmente en un análisis de los espectros de frecuencia de los datos obtenidos. El análisis gráfico lleva al experimentador a formarse una idea sobre la estructura física y los procesos que se presentan en el material.

Existen otras formas visuales en que pueden presentarse los datos. Las gráficas de impedancia contra frecuencia (espectro) que ya hemos mencionado son frecuentemente útiles en los casos en donde el material medido es en general conductivo. En casos no-conductivos, los espectros de admitancia y de constante dieléctrica son mas útiles. Si la impedancia medida tiene propiedades capacitivas más que inductivas, resulta de mayor utilidad graficar la reactancia negativa ($-Im\{Z\}$) como función de la resistencia ($Re\{Z\}$) en el plano complejo (en un gráfico de Nyquist). También son muy útiles las gráficas tridimensionales en donde la admitancia imaginaria se grafica contra la admitancia real y contra el logaritmo de la frecuencia (o el logaritmo de la admitancia imaginaria se grafica contra el logaritmo de la inmitancia

real y contra el logaritmo de la frecuencia). Estas gráficas 3D permiten una mejor comprensión de los datos medidos y, además, los eventuales errores en las mediciones son más fáciles de detectar.

Para la caracterización completa del material, es necesario estimar los parámetros del sistema a partir del conjunto de los datos medidos. Las gráficas obtenidas pueden ser utilizadas únicamente para estimar algunos parámetros pero en general se requiere la obtención de parámetros con mayor precisión. Esto es posible únicamente si se obtiene un modelo matemático de la respuesta del material medido. En ese caso, los datos medidos pueden adaptarse al modelo utilizando algunas técnicas de regresión u otras como por ejemplo la '*adaptación compleja no lineal de datos por mínimos cuadrados*' de Ristic [1]. Esta técnica estima parámetros del modelo y su desviación estándar, y determina como pueden los datos adaptarse al modelo. Una vez calculados los parámetros del modelo es posible encontrar los parámetros del sistema para lograr una caracterización completa del material.

2.3.2. Aplicación de la espectroscopía de impedancia a los tejidos biológicos

Una gran cantidad de investigaciones se han realizado para caracterizar las propiedades eléctricas fundamentales del tejido. Algunos resultados de mediciones de impedancia para diferentes tejidos y células en suspensión pueden encontrarse en diversas publicaciones [1, 7-9, 20-38]. Estos trabajos nos llevan a varias conclusiones. La conclusión más relevante es que los conocimientos existentes no nos permiten utilizar la impedancia de materiales biológicos para la caracterización y diferenciación efectiva del tejido. La impedancia depende de muchos factores como la estructura del material biológico, la concentración de iones, la cantidad de agua, el volumen y geometría del material biológico, los procesos fisiológicos, la temperatura de la muestra, el tipo de mediciones, y el tipo de electrodos empleados. La impedancia medida en el mismo material biológico puede tener diferentes valores si cualquiera de estos factores varía, haciendo que la desviación estándar de la impedancia medida sea muy grande como para poder hacer una diferenciación correcta del tejido.

La aplicación de los principios de la espectroscopía de impedancia permite una mejor caracterización de los materiales biológicos. Las mediciones de espectroscopía de impedancia son más precisas que otras mediciones de impedancia porque se miden sobre un rango de frecuencias y a partir de los datos obtenidos se extrae un modelo matemático del material medido. Los parámetros del sistema que se extraen así poseen un menor nivel de ruido y son más precisos. Además existen un gran número de parámetros adecuados para la caracterización de materiales y, por el contrario, para las simples mediciones de impedancia, solamente los componentes resistivos y capacitivos del material, medidos a una sola frecuencia, se utilizan para la caracterización. Otra ventaja es que los parámetros extraídos del sistema no dependen de la frecuencia de medición. La espectroscopía de impedancia nos permite seleccionar las frecuencias a las cuales la impedancia del material se ve influida por los mecanismos de relajación de interés (ver '*dispersión del tejido*' en la sección 2.4) y extraer esos parámetros en particular.

Un trabajo importante sobre caracterización y modelado matemático del tejido ha sido realizado por Ristic [1]. En él se investigaron las características de impedancia de tumores en ratones durante cambios histológicos progresivos producidos por hipertermia. Por otro lado, aplicaron la espectroscopía de impedancia para la caracterización y modelado matemático de eritrocitos humanos [38].

La espectroscopía de impedancia puede también ser utilizada para estudiar los cambios de volumen compartamental del cuerpo [24]. La impedancia del tejido a baja frecuencia se ve influenciada únicamente por la impedancia del fluido extracelular, mientras que la impedancia del tejido a alta frecuencia se ve influenciada por la impedancia de los fluidos intracelular y extracelular. Algunos parámetros de alta y baja frecuencia pueden utilizarse para estimar la razón de los volúmenes de fluido intracelular y extracelular.

2.4. Las propiedades eléctricas de los tejidos

Para desarrollar nuestro instrumento, es necesario conocer lo que va a medir, el rango de valores de interés, etc. Para desarrollar un algoritmo de estimación del nivel de isquemia, es necesario familiarizarnos con el tipo de cambios inducidos en las propiedades eléctricas de los tejidos. A continuación se presenta la teoría requerida.

La conducción de corriente eléctrica en el tejido biológico se realiza por medio de iones como portadores de carga predominantes. Las propiedades eléctricas más comunes para la caracterización del tejido son:

La impedancia eléctrica (Z), la admitancia (Y), el Módulo M, y la constante dieléctrica (ϵ):

$$Z = R + jX$$

$$Y = G + jC = 1/Z$$

$$M = M' + jM'' = j\omega Z$$

$$\epsilon = \epsilon' - j\epsilon'' = Y / j\omega$$

en donde:

- R es la impedancia DC del tejido, la parte real de la impedancia compleja
- X es la reactancia del tejido, la parte imaginaria de la impedancia compleja
- G es la conductancia DC del tejido; la parte real de la admitancia compleja, y C es la susceptancia del tejido la parte imaginaria de la admitancia compleja;
- M' es la parte real del módulo M
- M'' es la parte imaginaria del módulo M
- ϵ' es la parte real de la constante dieléctrica ϵ
- ϵ'' es la parte imaginaria de la constante dieléctrica ϵ

Se han realizado muchas investigaciones sobre las propiedades eléctricas del tejido biológico. La mayoría de los trabajos se relacionan con las propiedades eléctricas *pasivas* medidas utilizando estímulos de baja intensidad aplicados de forma en que se cumple con la ley de Ohm. Para estímulos de alta intensidad las propiedades eléctricas de los tejidos se presentan como función de la densidad de corriente. Es decir, sus respuestas se hacen no lineales. No se han publicado muchas investigaciones sobre las limitaciones de linealidad del tejido biológico. El umbral de linealidad depende del sistema específico y puede no ser estable. Generalmente, esto también depende de la frecuencia de los estímulos aplicados (el umbral se encuentra a menor impedancia a bajas frecuencias). Podemos decir que aproximadamente el tejido tiene características eléctricas con una densidad de corriente de excitación menor a 1 mA/cm² a 10 Hz [1,32,38].

Dispersión del tejido

Las características eléctricas de los tejidos biológicos son dependientes de la frecuencia. En la figura 2.3 se muestra un ejemplo típico de la constante dieléctrica del tejido como una función de la frecuencia. Existen tres regiones de dispersión (α , β , y γ), cada una correspondiente a un mecanismo de relajación en particular [1,32]. Una curva similar puede trazarse para la impedancia o la resistencia.

Dispersión α : La dispersión α aparece a frecuencias relativamente bajas (1 KHz o menos). Depende de muchos factores fisiológicos (como la concentración de electrolitos en el tejido). Es la consecuencia de varios mecanismos. Se cree que los tres mecanismos siguientes son los más significativos:

- *mecanismo de compuerta*: la membrana celular puede tener poros responsables del intercambio iónico entre el interior y el exterior.
- *estructura de la membrana celular*: la membrana puede estar constituida de al menos dos capas de moléculas diferentes (como lípidos o proteínas).
- *conductancia superficial debido a la atmósfera iónica*: Existe una atmósfera iónica alrededor de las células la cual puede causar procesos de relajamiento.

La dispersión α es muy difícil de medir en los tejidos musculares. Ocurre a frecuencias muy bajas (típicamente menores a 10 Hz) y el cambio en impedancia es menor a 1 o 2%. [1]

Dispersión β : La dispersión β se presenta para frecuencias por encima de la región de dispersión α (mayor a 1 KHz). Este comportamiento de dispersión se debe a la estructura celular del tejido, y su constante dieléctrica mayor a frecuencias bajas se debe a la membrana de la célula. Relativamente, esta dispersión es fácil de determinar para el tejido muscular. Típicamente, su frecuencia central se encuentra dentro del rango de 10 KHz a 50 KHz, y el cambio en la impedancia es del 40 al 60%.

Dispersión γ : La dispersión γ aparece a frecuencias muy altas (más de 100 MHz). A estas frecuencias, las propiedades eléctricas del tejido están determinadas por su cantidad de agua y de electrolitos, así como de su contenido de proteína. La conductancia del tejido se incrementa rápidamente a más de 1 GHz y su constante dieléctrica se decrementa a más de 3 GHz. Ambos efectos se deben al comportamiento del agua a altas frecuencias. Una correcta medición de la impedancia *in vivo* a estas frecuencias es muy difícil de lograr.

La mayoría de las investigaciones en esta área se han realizado para determinar las propiedades eléctricas del tejido *in situ*. El comportamiento de las dispersiones α y β en relación con el tiempo, después de un ataque de isquemia, ha sido investigado [25] y se derivaron algunas conclusiones:

- Después de los cambios iniciales debido a la isquemia, la conductividad del tejido es dependiente del tiempo durante las

primeras veinticuatro horas después de la obtención de la muestra de tejido. Posteriormente la conductividad empieza a incrementarse hasta que ocurre un colapso casi completo de la estructura celular del tejido.

- La resistencia a frecuencia altas (mayores a aquellas de la región de dispersión β) no es muy significativa para la isquemia y la posterior degradación y muerte del tejido. Esta independencia se debe a la condición de las membranas celulares en la cual los flujos intracelular y extracelular se igualan casi por completo debido a su comparable fuerza iónica.
- Los pequeños cambios dependientes del tiempo en la resistencia a altas frecuencias indica una diferencia pequeña entre los valores de resistencia interna y externa, los cuales no pueden ser mantenidos durante el rompimiento de las células.
- En el tejido la dispersión α termina mas rápido que la dispersión β . Además, la dispersión α depende estrechamente de las condiciones bajo las cuales se conserva la muestra.

La dispersión α es más sensible que la dispersión β a varios procesos fisiológicos, como consecuencia de los diferentes mecanismos de relajamiento. Por ello, la dispersión β es mas adecuada para determinar las propiedades eléctricas del tejido isquémico.

Modelo eléctrico macroscópico del tejido

Se han establecido algunos algoritmos básicos para analizar las propiedades eléctricas del tejido a partir de las mediciones experimentales de sus propiedades. Las mediciones de impedancia compleja de tejidos muestran un único comportamiento cuando la reactancia en serie equivalente del tejido se grafica en el plano de impedancia compleja como una función de la resistencia en serie equivalente (ver figura 2.4). Esta gráfica tiene la forma de un *bucle*, el cual es el arco menor de un círculo cuyo centro se mantiene por debajo del eje real de la impedancia. Tiene un cruce de frecuencia por cero en R_0 y otro cruce de frecuencia en infinito R_∞ . La depresión en el centro del arco por debajo del eje real se expresa en términos de un ángulo $\alpha\pi/2$.

Varios experimentos han demostrado que la concordancia de los datos experimentales con el diagrama circular es excelente y que la reproducibilidad de los datos obtenidos para diversos tejidos también es muy buena [8,24,38].

Cole y Cole propusieron una expresión empírica para modelar la impedancia [25]:

$$\begin{aligned} \varepsilon &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_0 + \varepsilon_\infty) / (1 + (j\omega\tau_0)^{(1-\alpha)}) \\ Z &= R + jX = R_\infty + (R_0 - R_\infty) / (1 + (j\omega T_0)^\alpha \end{aligned}$$

en donde τ_0 es la constante de tiempo característica. Estas expresiones tienen un gran parecido con un circuito RC en paralelo. Sin embargo, el parámetro que los diferencia es α . Para circuitos eléctricos RC $\alpha=1$, pero para tejidos biológicos α tiene un valor de (0.7). Esto causa que el centro del círculo de la figura 2.4 se mueva hacia abajo del eje real.

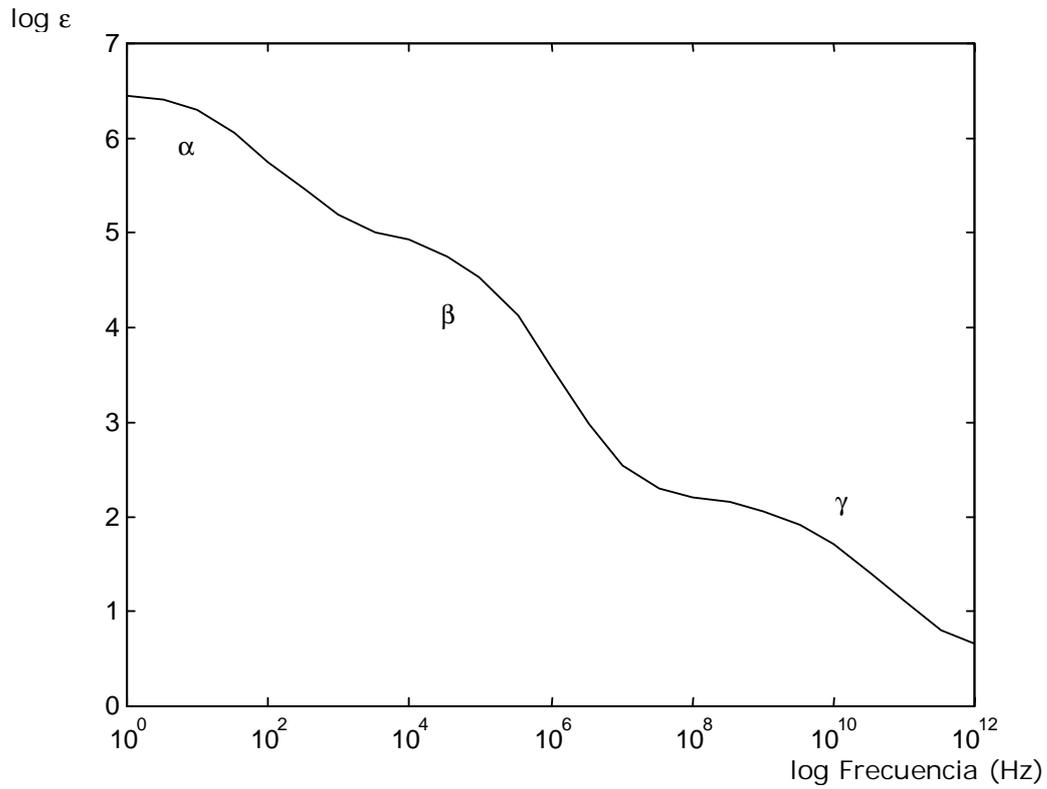


Figura 2.3. *Típica constante dieléctrica del tejido muscular como función de la frecuencia. Se identifican tres etapas principales de decaimiento, denominadas respectivamente dispersión α , β , y γ . Traducida y reproducida de [1, 32].*

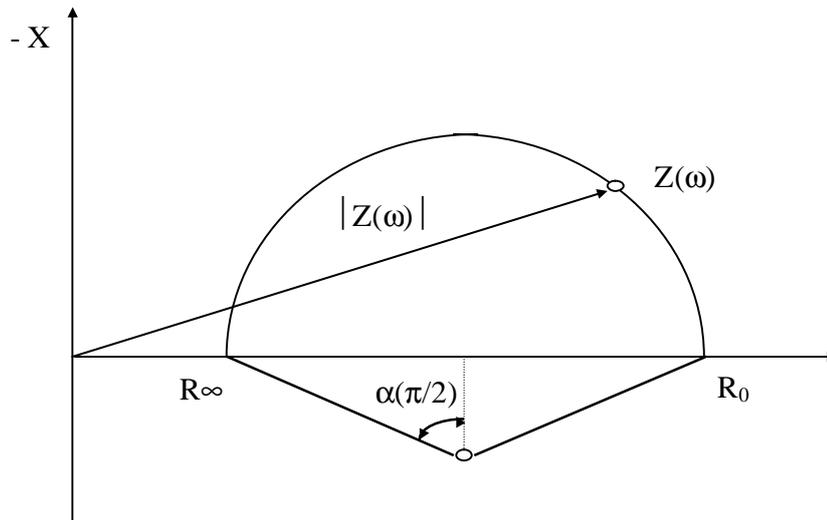


Figura 2.4. *Un diagrama típico de reactancia negativa del tejido ($-X$) graficado contra la resistencia del tejido (R). La impedancia compleja del tejido biológico tiene la forma de un bucle en el que las frecuencias crecen de derecha a izquierda. R_0 es la resistencia a frecuencia cero y R_∞ es la resistencia a frecuencia infinita. La depresión del centro del arco se expresa como un ángulo $\alpha\pi/2$. [1, 8, 25]*

Se han desarrollado varias hipótesis para explicar este comportamiento de la impedancia, sin embargo, ninguna teoría ha sido aceptada en forma unánime. La explicación mayormente aceptada asume que la impedancia de la membrana celular tiene un ángulo de fase constante. Así, muchas membranas celulares podrían representarse por una combinación de capacitancia y resistencia dependientes de la frecuencia. Los datos experimentales muestran que el ángulo de fase de esta combinación capacitancia - resistencia variable permanece mas o menos constante sobre un amplio rango de frecuencia. De acuerdo con esta teoría, las membranas vivas tendrían que ser consideradas como dieléctricos pasivos no conductivos.

Características eléctricas del tejido isquémico

Las investigaciones de las propiedades eléctricas del tejido isquémico presentadas en la literatura pueden dividirse en dos categorías: estudios de propiedades del tejido con isquemia inducida y estudios de las propiedades del tejido *postmortem*. Pocos pertenecen a la primera categoría. Estos se llevaron a cabo principalmente sobre músculos cardíacos y tejidos cerebrales. En todos los trabajos, las mediciones de impedancia se hicieron para determinar la resistencia intracelular y extracelular en el tejido con perfusión controlada o con oxigenación sanguínea controlada. Las mediciones se hicieron de 20 a 30 minutos después de que la isquemia se indujo. [1]

Basado en el análisis de la literatura, Kun [1,27] organizó las consecuencias de un corte en la perfusión del tejido muscular en el siguiente orden:

- Si el corte de perfusión es debido a oclusiones en el tejido cardíaco, la resistividad extracelular se incrementa casi de inmediato en un treinta por ciento, gracias a la caída en el volumen intravascular [1,28].
- El cese de perfusión produce hipoxia, falta de glucosa y falta de descarga extracelular, con una consecuente acumulación de productos metabólicos e iones, es decir, produce un incremento en la osmolaridad extracelular. Después de aproximadamente 5 minutos, la resistencia extracelular del tejido cardíaco se incrementa gradualmente. Después de 20 minutos alcanza un nivel del 70% por encima de los valores previos a la oclusión [1,28].
- Durante la isquemia los procesos de oxidación normales se interrumpen, momentáneamente se estimula la glicólisis y subsecuentemente se bloquea mientras se decremento el pH intracelular[1].
- Los procesos metabólicos anaeróbicos intracelulares causan nuevos productos osmóticos por conversión metabólica de moléculas de menor osmolaridad, mas grandes y de menor actividad (conversión de glicógeno en lactato e hidrólisis de componentes de fosfato de mayor energía). En 45 o 60 minutos, esto produce un rápido incremento en la osmolaridad del tejido de aproximadamente 35 mOsm/kg, y produce un hinchamiento de la célula [1,27]. Los procesos anaeróbicos inducen un decremento constante y continua del pH del tejido durante por lo menos 25 horas (como se determinó en estudios después muerte[1]).
- El agotamiento de fuentes de energía y la falla en los mecanismos de transporte activo de la membrana producen el equilibrio de pequeñas moléculas (Na^+ , K^+ y Cl^-) en la membrana celular. Las células poseen altas concentraciones de proteína, por lo que sufren de hinchamiento osmótico coloidal adicional.
- El descenso del pH decrementa la resistividad del citoplasma, e induce desacoplamiento celular, un incremento significativo en la resistividad de la membrana. El hinchamiento celular y el desacoplamiento producen un incremento

gradual de la resistividad intracelular equivalente, la cual comienza aproximadamente 10 minutos después del cese de perfusión [28].

- Estudios de isquemia en tejido cerebral felino (por oclusión de arterias en el cerebro medio), muestran que la resistencia extracelular se incrementó continuamente durante los 30 minutos que duraron los experimentos. Sin embargo, la resistencia intracelular muestra un decremento constante más lento.
- La hinchazón celular es causada por la transferencia de agua del tejido adyacente no isquémico y a través de rutas venosas.
- La secuencia descrita produce un 300% de incremento en la resistividad del tejido cardíaco canino 2.5 horas después de una oclusión arterial (a una frecuencia de 5 kHz).
- Estudios muestran que a partir del ataque de isquemia (debido al fallecimiento) se presenta un incremento transitorio en la resistividad del tejido, el cual dura de 2 a 8 horas. Después de este período, la resistividad disminuye.
- Estudios sobre hipoxia en ventrículos vacunos utilizando soluciones sin glucosa muestran que la resistencia longitudinal interna se incrementa en promedio un 171% después de 30 minutos, y un 300% después de 60 minutos [1].

2.5. Redes neuronales artificiales

En este proyecto se requiere de un instrumento que sea capaz de medir las propiedades eléctricas y analizarlas con el fin de estimar el grado de isquemia en el tejido. Para ello es importante escoger la mejor herramienta para analizar los datos. Nuestra experiencia nos indica que las redes neuronales artificiales tienen el poder y la flexibilidad requeridos para completar nuestro proyecto. En esta sección se presenta una introducción a este tema.

Las Redes Neuronales Artificiales (RNAs) son una herramienta de análisis no lineal apropiada para resolver problemas típicos de reconocimiento de patrones, análisis de datos y control no lineal. Las RNAs tienen el poder de memorizar y extrapolar la solución de un problema a partir de un conjunto de ejemplos. Esta característica hace de las RNAs una técnica preferida para resolver cierta clase de problemas cuando la relación entre variables de entrada y salida no es conocida, pero un conjunto de ejemplos que muestran la relación entre entrada y salida está disponible. Otra característica importante de las RNAs es su alta velocidad de procesamiento una vez entrenadas.

Existen muchas arquitecturas de redes neuronales pero, para nuestra aplicación utilizaremos una *red de procesamiento hacia adelante* (feedforward neural network). Este tipo de redes producen a su salida una función matemática no lineal, la cual representa la función de transferencia entre un conjunto de variables de entrada y de salida. Esta función se calcula basada en un conjunto de parámetros denominados *pesos*, los cuales determinan una transformación dada entre variables de entrada y salida. Estos pesos pueden calcularse a partir de un conjunto de ejemplos mediante un proceso llamado *aprendizaje* o *entrenamiento*. Una vez se han fijado los pesos, la red puede procesar nuevos datos muy rápidamente.

La red de cuantificación vectorial de aprendizaje (Learning Vector Quantization "LVQ" Network) es otro tipo de red de clasificación propuesta la cual asigna vectores para cada una de las diferentes clases. Esta red contiene una capa Kohonen que aprende y realiza la clasificación. La red LQV provee igual número de elementos de procesamientos "*pesos*", para cada clase en la Kohonen.

La estructura de una red neuronal

Las RNAs consisten de muchos *elementos de procesamiento* básicos, llamados *neuronas* o *nodos*. El elemento de procesamiento consiste en una función no lineal mediante la cual se transforma un conjunto de señales de entrada x_i ($i=1, \dots, d$) a una señal de salida z . Cada señal de entrada x_i se multiplica por un *peso* w_i y se suma con las demás señales de entrada ponderadas (multiplicada por sus pesos) para producir la entrada total al elemento de procesamiento:

$$\text{entrada total} = \sum_{i=1}^d w_i x_i + w_0$$

en donde el parámetro w_0 es un peso de *offset* denominado *bias*, el cual puede considerarse como el caso especial de aquel peso correspondiente a una señal de entrada igual a la unidad. La señal de salida del elemento de procesamiento se obtiene mediante una *función de activación* $\Psi()$:

$$\text{salida} = \Psi(\text{entrada total})$$

Las funciones de transferencia utilizadas comúnmente son: de umbral, lineal, sigmoideal, tangente hiperbólica, y signo[1, 50].

Los elementos de procesamiento se distribuyen en una serie de capas. La primera capa es la *capa de entrada*. En ella se introducen las variables de entrada. La última capa es la *capa de salida* y sus elementos de procesamiento producen los resultados finales de la RNA. Las capas situadas entre estas dos capas se denominan *capas ocultas*. Los elementos de procesamiento se encuentran asociados a otros por medio de conexiones unidireccionales. Cada elemento de procesamiento tiene diferentes conexiones de entrada, por las cuales se introducen las señales de entrada, y una o más conexiones de salida por las cuales se transmite la señal de salida hacia la capa siguiente de elementos de procesamiento. El número de las capas ocultas y su estructura de conexiones depende de la complejidad del problema. Usualmente las conexiones se hacen desde la capa de entrada a las capas ocultas y finalmente a la salida. Sin embargo, conexiones de retropropagación desde las capas ocultas hacia atrás a la capa de entrada son posibles, pero no son necesarias en nuestro caso. En todo caso, la información de la capa de entrada se propaga a través de la red hacia la capa de salida.

Algoritmos de aprendizaje de redes neuronales

El problema de determinar los valores de los parámetros (pesos) en la RNA se resuelve mediante un proceso de *aprendizaje*. Los algoritmos de aprendizaje modifican los pesos de la red neuronal hasta alcanzar un objetivo. Para hacer esto, un conjunto de ejemplos de entrada y sus salidas correspondientes (conjunto de entrenamiento) deben estar disponibles. Al comenzar, los pesos de la red se inicializan con valores pequeños aleatorios. Durante el proceso de aprendizaje, los ejemplos son procesados por la red y el valor de salida deseado se compara con el obtenido. La diferencia entre estas salidas es la *función del error*. Los pesos de la red se alteran mediante algún algoritmo de aprendizaje de modo que se reduzca este error. Este proceso iterativo continúa hasta que algún criterio de aprendizaje suficiente sea alcanzado.

Existen muchas arquitecturas de redes neuronales que pueden servir para aplicaciones especializadas en clasificación y reconocimiento de patrones. Según la relación entre los datos en las entradas y salidas; una red puede clasificar mejor que otra. En la presente tesis se trata de hacer una comparación entre dos redes: 1) la de *procesamiento hacia adelante, o retropropagación*, y 2) la *cuantificación vectorial de aprendizaje LQV* (Learning Vector Quantization "LVQ" Networks).

2.5.1. Red de procesamiento hacia adelante o retropropagación (Back – propagation)

Una red con elementos de procesamiento es capaz de entrenar las unidades de salida para aprender a clasificar patrones en las entradas, asumiendo que las clases son linealmente separables. Las clases complejas que no sean linealmente separables pueden ser separadas con redes de capas múltiples. Sin embargo, cuando la salida es un error, cómo se determina cuál es el elemento de procesamiento para ajustar? Este es el problema de asignación de créditos. El procesamiento hacia adelante resuelve esto asumiendo que los elementos de procesamiento y las conexiones son poco responsables del error. Las fuentes del error se deben a la propagación del error de la salida hacia adelante, a través las conexiones con las capas previas. Este procesamiento se repite hasta que se llega a la capa de entrada. El nombre de procesamiento hacia adelante o retropropagación se deriva de este método de la distribución de los efectos de errores.

Algoritmo de retropropagación del error

Para redes multicapa como la descrita anteriormente existe un procedimiento computacionalmente eficiente para la reducción del error con el consiguiente aprendizaje mediante la retropropagación del error. Estas redes de retropropagación emplean una función de transferencia continua y diferenciable (pues calculan el gradiente de la función de error). Durante el proceso de entrenamiento el error se propaga hacia atrás determinando los cambios en los pesos de las conexiones entre elementos de procesamiento de cada capa. Conforme se presentan de manera repetida los ejemplos de entrenamiento, los pesos se modifican de manera que el error se minimice.

Arquitectura de una red de retropropagación

Las redes neuronales de retropropagación típicas regularmente tienen una capa de entrada, una capa de salida, y al menos una capa oculta. No hay límite teórico para el número de capas, pero se ha reportado que una red de cuatro capas máximo (tres capas ocultas y una de salida) es útil para resolver los problemas de clasificación de patrones complejos y arbitrarios. Cada capa está totalmente conectada con la capa siguiente. Las flechas indican el flujo de información durante el uso de la red. Durante el entrenamiento de la red, la información se propaga hacia adelante a través de la red y se usa para adaptar los pesos de las conexiones.

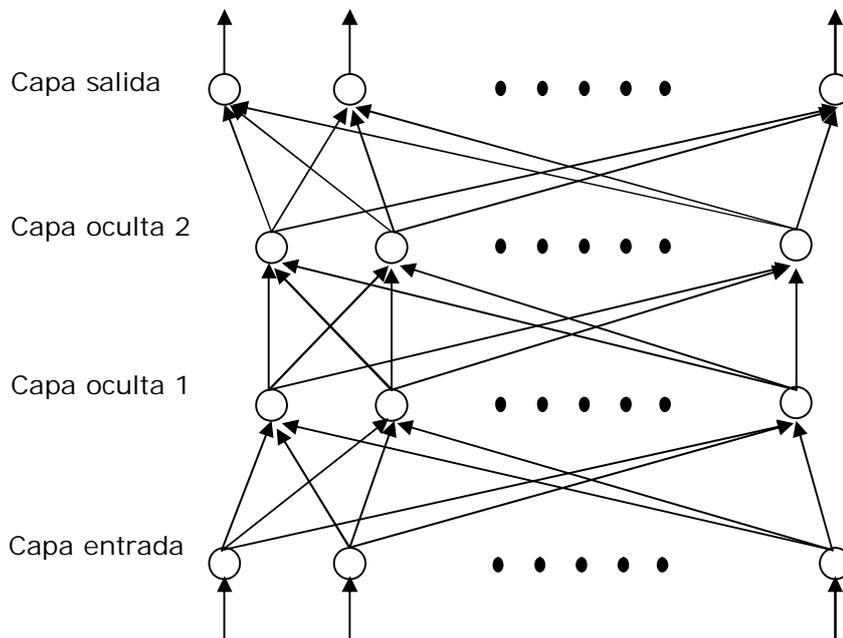


Figura 2.5. Red de retropropagación típica[51].

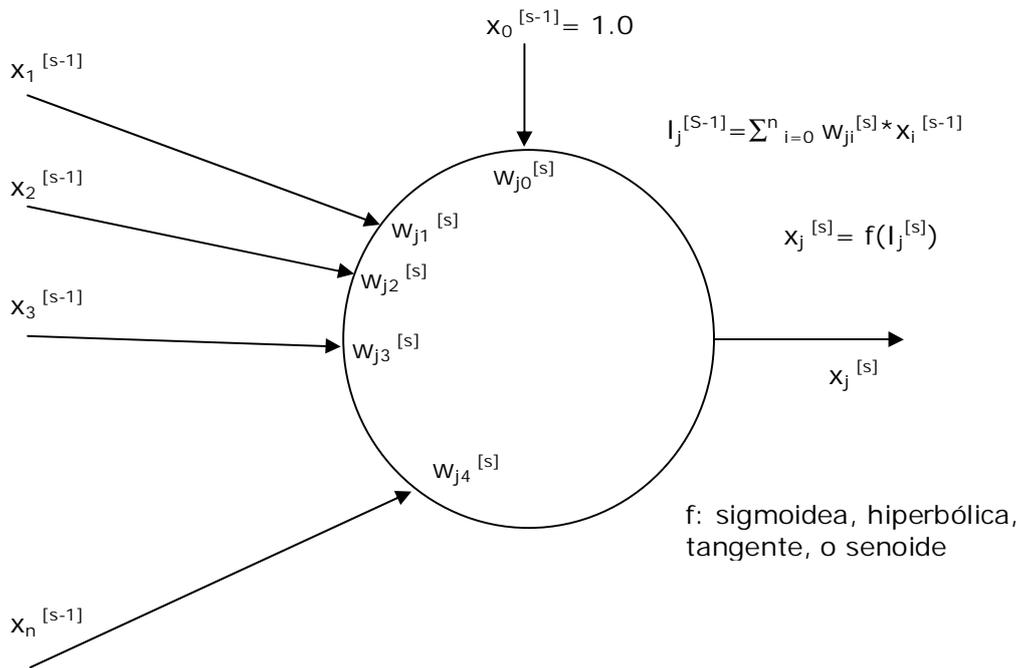


Figura 2.6. Elemento típico de procesamiento en una red de retropropagación.

2.5.2. La red de cuantificación vectorial de aprendizaje (Learning Vector Quantization "LVQ" Networks)

Red de clasificación propuesta por T. Kohonen [Kohonen, 52], la cual asigna vectores para cada una de las diferentes clases. Esta red contiene una capa Kohonen que aprende y realiza la clasificación. La red LQV provee igual número de elementos de procesamientos "pesos", para cada clase en la Kohonen.

El entrenamiento y el uso de la capa Kohonen de la red LQV básica es:

- En el modo de entrenamiento, se calcula la distancia del vector de entrenamiento de cada elemento de procesamiento o peso, y el peso más cercano se declara el ganador.
- Si el peso ganador está en la clase del vector de entrenamiento, será movido hacia el vector de entrenamiento.
- Si el peso ganador no está en la clase del vector de entrenamiento, será movido lejos del vector de entrenamiento. Esto se refiere a la *repulsión*.
- Durante el proceso de entrenamiento, los elementos de procesamiento o pesos asignados a cada clase, migran a la región asociada con su clase.
- En el modo de clasificación, se calculan las distancias del vector de entrada a cada uno de los pesos, y otra vez el peso más cercano se declara el ganador. En este caso el vector de entrada será asignado al de la clase de este peso.

Arquitectura de la red LVQ

Las redes neuronales de cuantificación vectorial de aprendizaje LQV contienen una capa de entrada, la capa Kohonen, la cual se entrena y realiza la clasificación, y la capa de salida. La capa de entrada contiene un elemento de procesamiento para cada parámetro de entrada; la capa de salida contiene un elemento de procesamiento para cada clase. En la siguiente figura se muestra una red LQV con cinco elementos de procesamiento para cada clase.

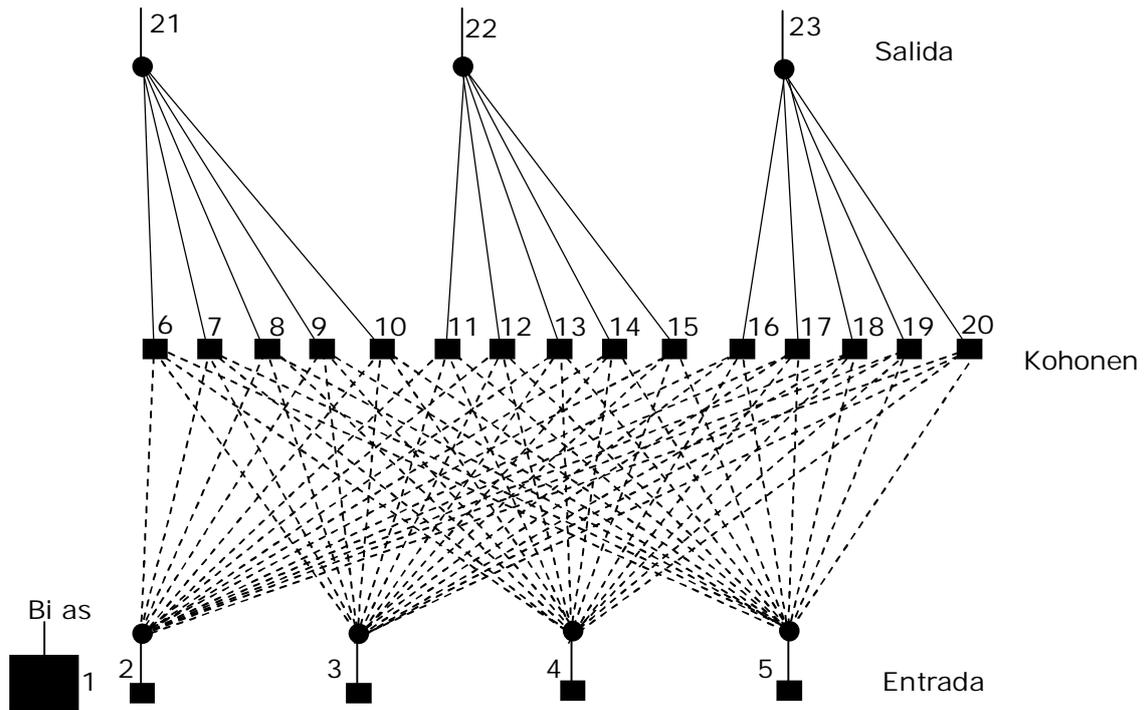


Figura 2.7. Esquema de una red de tipo cuantificación de vector de aprendizaje LQV. Con 4 entradas, tres clases de salida, y cinco elementos de procesamiento para cada clase[52].

Ventajas de las redes neuronales artificiales

Comparadas contra otros métodos para resolución de problemas, las RNAs presentan diferentes ventajas:

- Las RNAs en general poseen una función de transferencia no lineal, lo cual les permite encontrar una solución para problemas no lineales.
- Las RNAs son capaces de generalizar. La generalización es la capacidad de las redes neuronales para encontrar soluciones para entradas fuera del conjunto de entrenamiento. La RNA puede además producir salidas significativas para entradas incompletas o ruidosas.
- Las RNAs pueden entrenarse de manera que sean insensibles a ruido en las entradas.
- Las RNAs aprenden a reconocer la tendencia en los datos de entrenamiento.
- Las redes neuronales son capaces de aprender un mapeo entrada-salida continuo y complejo, independientemente del número de entradas y salidas.

2.6. Resumen

Basados en el material disponible en la literatura y el presentado en secciones previas de este capítulo, podemos concluir lo siguiente:

- Existen muchas situaciones de patología clínica en las cuales el tejido se ve amenazado por la isquemia
- Cuando el tejido entra en un estado de isquemia sus células se hinchan y el volumen de los fluidos intracelular y extracelular cambia. También cambia la permeabilidad iónica de las membranas celulares, aunque el cambio en la distribución de concentración iónica es pequeño.
- La impedancia del tejido cambia debido a estas variaciones.
- En la actualidad no existe una técnica de medición del daño isquémico que satisfaga los requerimientos para un monitor de uso clínico útil.
- Una correlación cualitativa entre la isquemia y la impedancia medida en el tejido ha sido observada por muchos investigadores.
- Hasta ahora, aunque observada, tal correlación cuantitativa entre la isquemia y la impedancia medida en el tejido no ha podido ser establecida bajo condiciones clínicas.
- La aplicación de los principios de la espectrometría de impedancia mejora la adquisición y el análisis de las propiedades eléctricas de los tejidos.
- El comportamiento de impedancia del tejido isquémico en la región de dispersión β , el cual nos interesa particularmente, puede aproximarse mediante el modelo matemático explicado en la sección 2.4.
- El pH del tejido representa un buen estimador del nivel de isquemia en el tejido.
- Los parámetros específicos para la impedancia del tejido pueden estimarse utilizando las técnicas adecuadas de estimación de datos.
- El pH del tejido representa un buen estimador del nivel de isquemia en el tejido.
- Las redes neuronales artificiales representan una técnica poderosa que puede ser usada para representar la relación no lineal empírica entre los parámetros de la impedancia del tejido y el daño tisular y/o el pH tisular.

Capítulo 3

3. Diseño del Hardware del Espectrómetro de impedancia

Para realizar mediciones de impedancia compleja en un tejido se diseñó y construyó un instrumento especializado llamado *espectrómetro de impedancia*, el cual puede medir la impedancia compleja del tejido a frecuencias arbitrarias desde 100 Hz hasta 1 MHz. Este instrumento se compone de dos partes principales: la parte correspondiente al instrumento en sí y la parte correspondiente al control, la cual se basa en una computadora (PC). La parte de instrumentación mide la impedancia compleja del tejido sobre el rango de frecuencia requerido. La PC controla las operaciones del instrumento, la recolección de datos y el almacenamiento y análisis de éstos.

Los espectrómetros de impedancia se encuentran disponibles comercialmente y varias compañías los producen. Estos pueden dividirse en dos grupos: a) instrumentos electrónicos muy precisos y versátiles (e.g. HP4194A, \$31,000)[1], demasiado grandes, caros y pesados (37 kg) como para ser utilizados en un ambiente clínico, y que no satisfacen las normas de seguridad, y b) instrumentos de impedancia diseñados para uso clínico (para mediciones del porcentaje de grasa corporal) que sin embargo no tienen la precisión, flexibilidad y calidad requerida para este proyecto. Por eso, para nuestros objetivos no es posible utilizar un instrumento existente por lo que se tuvo que desarrollar y construir uno adecuado a nuestras necesidades.

En este capítulo se describen los principios básicos de la operación y diseño del hardware del espectrómetro de impedancia. Primero se discuten y comparan las diferentes técnicas de medición de impedancia, subrayando ciertas especificaciones que deben cumplir. A continuación se discuten los conceptos básicos de operación del instrumento y se explica su estructura. Finalmente se presenta en detalle el diseño del hardware del prototipo del espectrómetro de impedancia para el tejido y su funcionamiento.

3.1. Descripción de los términos y principios básicos

Existen dos técnicas básicas para medir la impedancia en el tejido biológico: la *técnica de puente* y el *detector sensible a la fase*. Tradicionalmente los métodos de puente han sido los más usados. Su ventaja es la precisión y la alta resolución de sus mediciones. Sin embargo, las mediciones requieren de mucho tiempo, lo cual es un problema durante el trabajo *in vivo* en donde los cambios en la impedancia del tejido con el tiempo dependen de los procesos fisiológicos del tejido. Desarrollos recientes en los diseños de sistemas de puente han disminuido el tiempo requerido para las mediciones, pero a cambio de una disminución en la precisión.

En la actualidad los métodos de detectores de fase están ganando terreno. Nuestro diseño se basa en la técnica del detector de fase por las siguientes razones:

- Es capaz de realizar mediciones precisas dentro de un rango de frecuencia dado
- Tiene la capacidad de hacer mediciones rápidas en forma automática
- Posee simplicidad en su diseño y operación

Ambos métodos mencionados pueden medir la impedancia del tejido empleando sistemas de dos o cuatro electrodos, los cuales sirven de interfase entre el instrumento y el tejido. En el sistema de dos electrodos una señal de excitación de onda sinusoidal

(ya sea de corriente o voltaje) se aplica al tejido a través de ambos electrodos. El sistema mide la corriente que pasa a través del tejido a los electrodos. La impedancia se define como el voltaje medido entre la corriente. Esta impedancia es la suma de la impedancia del tejido entre los electrodos y la impedancia de las interfaces electrodo-tejido (error de medición).

Para evitar este error se utiliza el sistema de cuatro electrodos (ver figura 3.1). En este sistema los electrodos exteriores inyectan una corriente de excitación en el tejido. La corriente a su vez genera un voltaje, el cual es medido por los electrodos interiores. La impedancia de entrada del sistema de medición de voltaje debe ser varios órdenes de magnitud mayor que la impedancia del tejido medido y que aquella de la interfase electrodo-tejido. Así, toda la corriente inyectada pasa a través del tejido, solamente una proporción despreciable pasa a través de los electrodos interiores y éstos no cambian la distribución de corriente. Además, el voltaje de la interfase electrodo-tejido para los electrodos interiores es despreciable y el voltaje medido es igual al voltaje en el tejido. La impedancia total (definida como el voltaje medido entre la corriente inyectada) representa la impedancia del tejido únicamente.

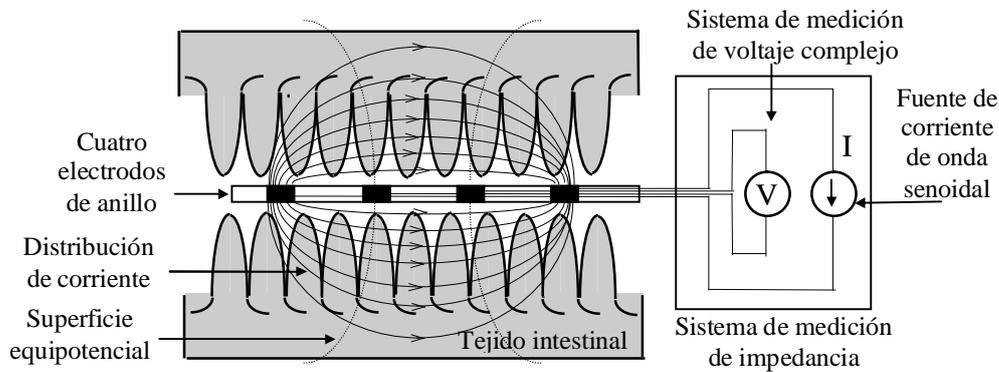


Figura 3.1. Sistema de cuatro electrodos para la medición de la impedancia compleja del tejido. La fuente de corriente produce una excitación senoidal constante en el tejido a través de los dos electrodos exteriores. Las mediciones complejas de voltaje se realizan mediante los dos electrodos interiores.

Los sistemas de medición de impedancia pueden inyectar corriente al tejido mediante una fuente de voltaje o de corriente. En nuestro sistema (figura 3.1.) utilizaremos una fuente de corriente ya que una fuente de voltaje no es conveniente para los tejidos biológicos por las siguientes razones:

- La corriente de excitación depende de la impedancia del tejido y no es fácil de controlarla si se utiliza una fuente de voltaje
- La densidad de corriente de excitación debe estar en un rango específico menor a 1 mA/cm^2 para mantener la impedancia del tejido en un rango real
- Una densidad de corriente alta puede inducir potenciales de acción en las células del tejido los cuales pueden causar contracciones e interferir con la medición de la impedancia

La corriente de excitación inyectada se distribuye en el tejido siguiendo la ley de Ohm y forma superficies equipotenciales (figura 3.2). Cada electrodo se encuentra a un potencial dado, lo cual depende de la posición de los electrodos, la distribución de

corriente a través del tejido y las características eléctricas y geométricas de éste. Los dos electrodos interiores miden el voltaje a través del tejido entre las dos superficies equipotenciales correspondientes. La impedancia medida es igual al voltaje entre los dos electrodos interiores dividido entre la corriente inyectada. La impedancia del tejido definida de esta forma corresponde a un volumen tridimensional de tejido con límites definidos por las superficies equipotenciales (correspondientes al área sombrada en la figura 3.2).

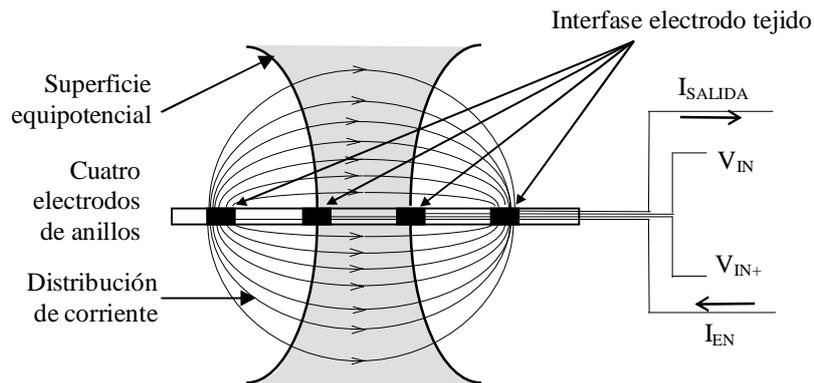


figura 3.2. Sistema de medición de impedancia del tejido con cuatro electrodos. La corriente de excitación pasa al tejido a través de las interfaces electrodo-tejido y se distribuye de forma heterogénea. Al pasar a través del tejido la corriente forma superficies equipotenciales. La impedancia del tejido definida como $(V_{IN+} - V_{IN})/I_{OUT}$ es la impedancia del volumen del tejido representada por el área sombrada.

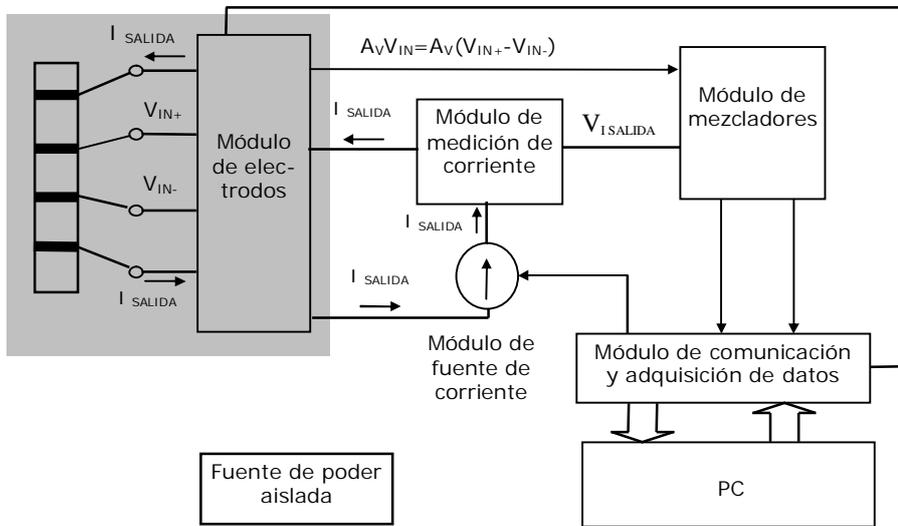
3.2. Diseño del sistema de espectrometría de impedancia

En esta sección se describe el espectrómetro de impedancia de acuerdo a sus módulos principales. La operación del sistema se describirá también de forma modular. Una descripción más detallada del sistema que describe los componentes dentro los módulos se discute más adelante.

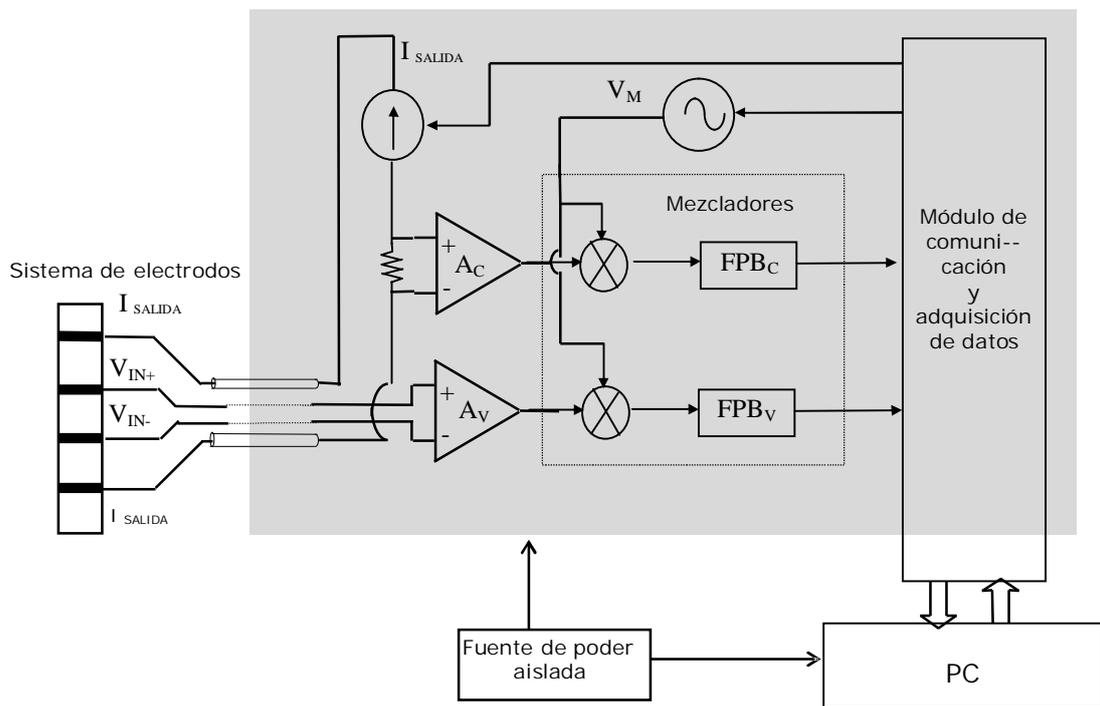
3.2.1. Descripción de los módulos que componen el espectrómetro de impedancia

Un diagrama a bloques del espectrómetro se presenta en la figura 3.3. Puede ser dividido físicamente en dos partes: el instrumento y el montaje del electrodo (figura 3.3.b). La parte del instrumento puede a su vez ser subdividida en varios módulos (figura 3.3.a): el módulo de la fuente de corriente, el módulo de los moduladores, el módulo de adquisición de datos, el módulo de comunicación y el módulo de alimentación.

El sistema de medición contiene cuatro electrodos que sirven como interfase con el tejido (figura 3.1). Los electrodos exteriores se utilizan para inyectar una corriente de excitación (la cual llamaremos *corriente de salida*) y los interiores



a)



b)

Figura 3.3. a) Diagrama a bloques del espectrómetro de impedancia, mostrando la estructura de los diversos módulos que lo componen. b) Diagrama a bloques más detallado. El sistema de electrodos hace de interfase con el tejido, inyectando una corriente de excitación y midiendo el voltaje correspondiente del tejido. El amplificador A_C procesa el voltaje medido lo digitaliza y lo envía a la PC.

Para medir el voltaje en el tejido (que a su vez denominaremos como *voltaje de entrada*). El sistema de electrodos tiene que ser de tamaño adecuado a la aplicación, ligero, fácil de conectar al tejido, y puede poseer electrodos intercambiables. El sistema de electrodos se conecta al módulo instrumental por medio de un cable coaxial blindado de longitud dependiente de la aplicación.

La parte instrumental del espectrómetro realiza varias funciones. Primero, genera la corriente de salida empleando el módulo de la fuente de corriente. La corriente tiene una forma de onda senoidal de frecuencia arbitraria con mínima distorsión armónica. Su frecuencia se controla por medio de la PC.

La corriente de salida generada se vuelve a medir como referencia por medio del módulo de medición de corriente. Este módulo cambia la corriente de salida a voltaje (que llamaremos *voltaje de referencia*) por medio de una resistencia. El voltaje así generado se amplifica mediante un amplificador de instrumentación (A_c), se modula en el módulo de modulación y se lee por medio del módulo de adquisición de datos (ver figura 3.3). La corriente de salida pasa por este módulo sin modificación alguna.

Más adelante la corriente de salida pasa por medio del cable blindado al sistema de electrodos y se inyecta en el tejido (figura 3.3.b). El voltaje de entrada así generado (entre los electrodos) se amplifica mediante un amplificador diferencial de instrumentación (A_v) y posteriormente pasa al módulo de modulación y al de adquisición de datos.

El módulo de modulación se encuentra antes del módulo de adquisición de datos y contiene dos mezcladores o moduladores similares para procesar el voltaje de entrada y el voltaje de corriente, modulando estas señales mediante una portadora para trasladar las frecuencias del espectro a una sola frecuencia, la cual es examinada por el módulo de adquisición.

El módulo de adquisición de datos convierte las dos señales analógicas provenientes de los moduladores a señales digitales que pueden entonces ser almacenadas y procesadas por la computadora, la cual a su vez determina la frecuencia de muestreo.

El módulo de alimentación provee los voltajes de polarización requeridos para la operación del sistema (+/- 15 V y 5 V).

3.2.2. Modulación y demodulación aplicada a la espectroscopía de impedancia [39-41]

En la espectroscopía de impedancia se utiliza un barrido en frecuencia (de 100 Hz a 1 MHz) y se adquieren señales a diferentes frecuencias, por lo que es un proceso complejo. Mediante la modulación y posterior demodulación de las señales se puede realizar este objetivo fácilmente. En esta sección se describen las técnicas de modulación y demodulación en amplitud aplicada al sistema.

3.2.2.1. Amplitud modulada

Las señales de baja frecuencia o de información no pueden transmitirse mediante antenas o cables de forma razonable pero pueden transmitirse utilizándolas para cambiar o modular algunas de las características de una onda portadora de mayor frecuencia. Si la característica de la onda portadora que se modifica en proporción a la señal de información es la amplitud, el proceso se denomina *amplitud modulada (AM)*. El modificar la frecuencia o el ángulo de fase de la onda portadora resulta en frecuencia modulada (FM) y fase modulada (PM) respectivamente[32].

Por supuesto, la señal original de información debe recuperarse mediante un proceso inverso denominado *demodulación o detección*.

El multiplicador usado como modulador

La amplitud modulada es el resultado de un proceso de multiplicación. Si se aplica a la entrada x de un multiplicador, la señal de ganancia variable E_m se aplica a la entrada y del multiplicador, de modo que la salida V_o tiene la misma envolvente que E_m . Entonces, el multiplicador puede considerarse como un dispositivo de ganancia controlada por voltaje, así como un modulador de amplitud.

Descripción matemática del modulador balanceado

Si se aplica una onda cosenoidal portadora E_c de alta frecuencia a una de las entradas de un multiplicador y se aplica una señal de información E_m de baja frecuencia (onda moduladora) a la segunda entrada del modulador podremos entonces escribir (suponiendo para efectos de análisis que ambas señales son cosenoidales): para prueba y análisis, tanto E_c como E_m serán ondas senoidales que se describen como sigue:

$$E_c = E_{cp} \cos \omega_c t \quad \text{señal portadora}$$

donde E_{cp} es el valor pico de la onda portadora y ω_c es la frecuencia portadora, y

$$E_m = E_{mp} \cos \omega_m t \quad \text{señal moduladora}$$

donde E_{mp} es el valor pico de la onda moduladora y ω_m es la frecuencia moduladora.

Aplicando la señal portadora E_c a la entrada x de un multiplicador y denominándola como E_x , y la señal moduladora E_m a la entrada y del multiplicador y denominándola E_y , podemos expresar la señal de salida V_o como el producto de ambas entradas:

$$V_o = E_c E_m = E_{cp} E_{mp} (\cos \omega_c t) (\cos \omega_m t)$$

la ecuación se denomina el *término producto* de dos ondas senoidales con frecuencias diferentes.

La ecuación anterior puede reescribirse utilizando la siguiente identidad trigonométrica:

$$(\cos A) (\cos B) = \frac{1}{2} [\cos(A + B) + \cos(A - B)]$$

de forma que obtenemos:

$$V_o = \frac{1}{2} (E_{cp} E_{mp}) [\cos(\omega_c + \omega_m)t + \cos(\omega_c - \omega_m)t]$$

Como puede observarse, V_o es entonces una señal compuesta de dos ondas cosenoidales con frecuencias diferentes, correspondientes a la suma $(\omega_c + \omega_m)$ y la diferencia $(\omega_c - \omega_m)$ de las frecuencias de las señales originales, tal como se muestra en la figura 3.4.

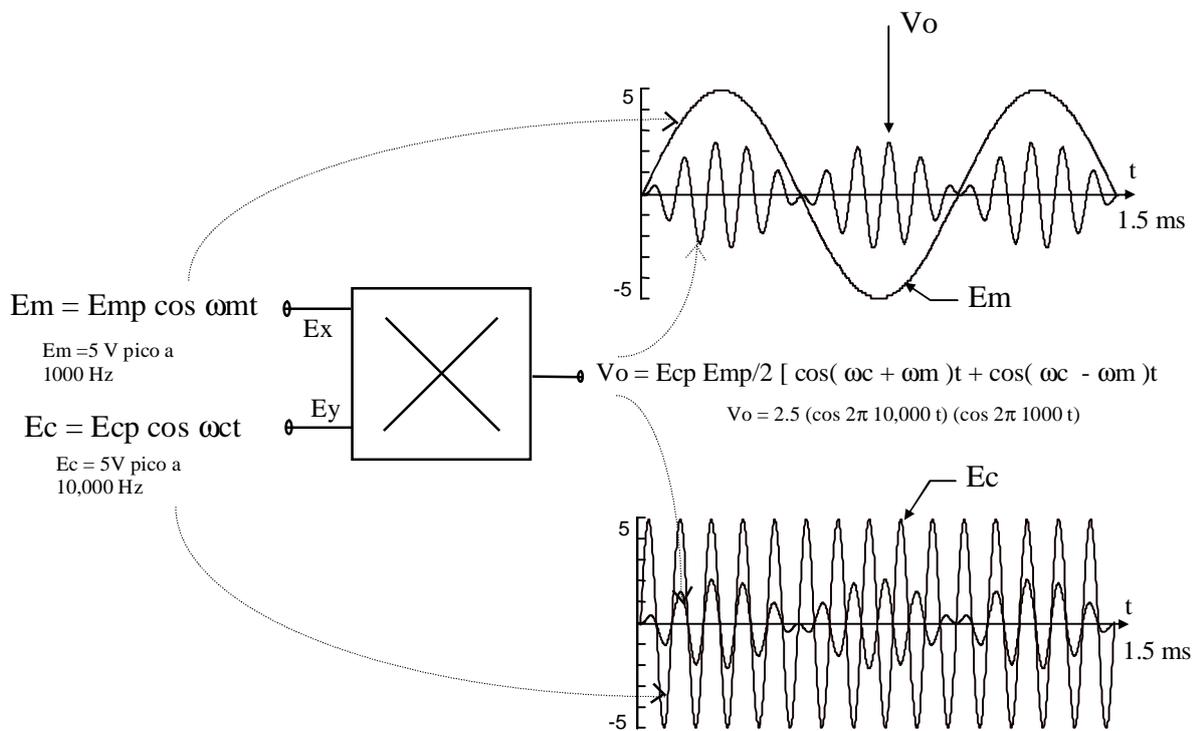


Figura 3.4. El multiplicador como modulador balanceado.

3.2.2.2. Demodulación

La demodulación o detección es el proceso seguido para recuperar una señal E_m a partir de una señal modulada (en este caso en amplitud mediante la señal del tejido) V_o . Para ello se aplica la señal e_{AM} a la entrada de un multiplicador. La señal de entrada se multiplica por la demoduladora E_m y se obtiene una señal compuesta de dos bandas, suma y resta de frecuencias, como se muestra en la figura 3.6. Una vez hecho esto se utiliza un filtro pasabanda para extraer la señal de interés.

Escribiendo,

$$e_{AM}(t) = E_{AM} \cos \omega_c t$$

como la señal modulada en amplitud (producida al modular en amplitud de acuerdo a la señal del tejido) con una frecuencia ω_c , y multiplicando por la señal moduladora

$$e_m(t) = E_m \cos \omega_m t$$

señal moduladora con una frecuencia ω_m , obtenemos una diferencia de frecuencias $\omega_f = \omega_c - \omega_m$, y una salida $e_o(t)$ con dos bandas laterales de suma y diferencia, de la siguiente forma:

$$e_o = e_{AM}(t) e_m(t)$$

$$e_o = E_c E_m / 2 [\cos(\omega_c + \omega_m)t + \cos(\omega_c - \omega_m)t].$$

Hay que notar que el espectro se traslada a ambas, la frecuencia de suma ($\omega_c + \omega_m$) y a la frecuencia de diferencia ($\omega_c - \omega_m$). Pasando esta señal por un filtro pasabanda con frecuencia central ajustada a la diferencia ($\omega_c - \omega_m$) se revela la información proporcionada por la señal del tejido.

Un ejemplo de demodulación síncrona con valores de frecuencia resumidos en la figura 3.5. y cuyos espectros se muestran en la figura 3.6. se describe a continuación.

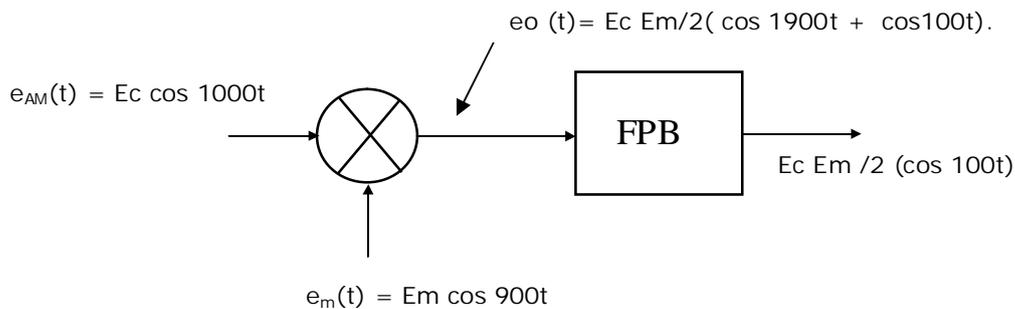
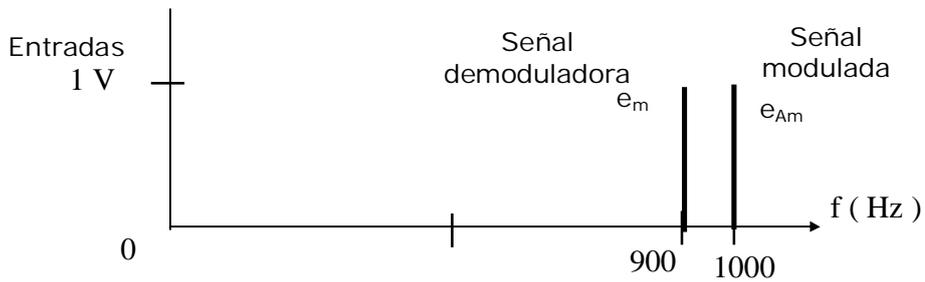
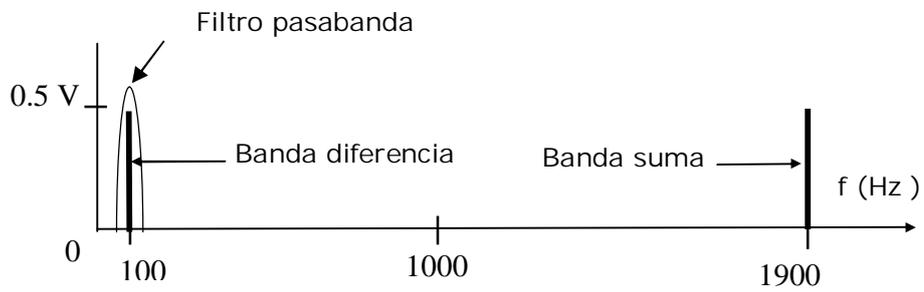


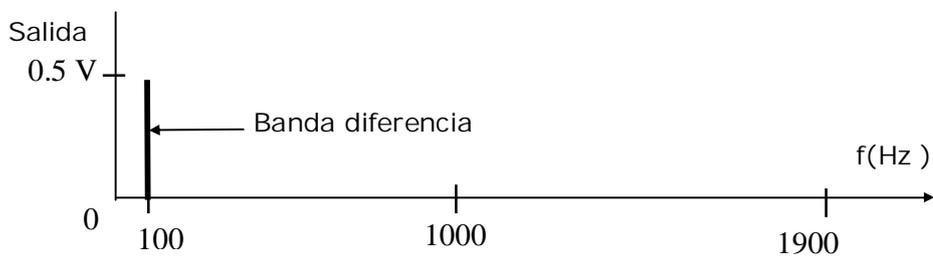
Figura 3.5. Esquema del proceso de demodulación síncrona aplicada a nuestro sistema. Las entradas al multiplicador son $e_{AM}(t)$ a una frecuencia de 1KHz y E_m a 900 Hz (existiendo entre ambas una diferencia de 100 Hz). La salida del multiplicador $e_o(t)$ es una señal con dos frecuencias laterales (suma 1900 Hz y diferencia 100 Hz). Pasando esta señal por un filtro pasa banda (FPB) de ganancia unitaria centrado en 100 Hz, se obtiene a la salida únicamente la banda de diferencia. Esta señal contiene una amplitud y fase proporcionales a la señal del tejido.



(a) Espectro de las señales de entrada con frecuencias $\omega_c = 1\text{KHz}$ y $\omega_m = 900\text{ Hz}$.



(b) Espectro de las señales de entrada al filtro con frecuencias $\omega_c + \omega_m = 1900\text{ Hz}$ y $\omega_c - \omega_m = 100\text{ Hz}$.



(c) Espectros de la señal de salida del filtro, a una frecuencia de 100 Hz.

Figura 3.6. Entradas y salidas del ejemplo de demodulación síncrona descrito en la figura 3.5. a) Señales de entrada al multiplicador, b) Señales de salida del multiplicador, entradas del filtro pasa banda y c) Señal de salida del filtro.

3.2.3. Descripción general de la operación del espectrómetro de impedancia

Las mediciones completas de impedancia consisten en mediciones de voltaje de entrada alternados con mediciones de corriente de salida para varias frecuencias a lo largo de un rango de interés. Para cada medición se inicializa cada componente del espectrómetro. Esto se hace gracias a la PC, la cual realiza las siguientes funciones:

- Selecciona la frecuencia de medición y calcula la frecuencia de referencia
- Convierte ambas frecuencias a palabras binarias
- Programa los dos generadores de funciones sinusoidales con estas frecuencias
- Despliega las dos señales de salida (la señal del tejido y la de la referencia) a la mayor frecuencia de muestreo
- Almacena en un archivo los datos de las dos señales para cada frecuencia.
- Para todo el espectro de frecuencia los nombres de los archivos de datos se fijan como cuatro caracteres definidos por el usuario mas cuatro caracteres que indican el valor de la frecuencia de medición
- Procesa las señales utilizando el paquete comercial MATLAB:
 - ✓ Calcula la magnitud y fase de la impedancia del tejido
 - ✓ Calcula la parte real e imaginaria de la señal del tejido
 - ✓ Calcula el espectro de frecuencia de la impedancia y su frecuencia de corte, realizando cualquier ajuste o interpolación necesaria.

3.2.4. Descripción de la captura de datos y su recuperación por medio de la modulación y demodulación síncronas[44].

Ambas señales de medición de corriente, el voltaje de referencia v_r y el voltaje del tejido v_c se generan a partir de la misma corriente i_c , descrita por

$$i_c = I_c \cos \omega_c t$$

en donde I_c es el valor pico de la corriente y ω_c es su frecuencia. El voltaje de carga del tejido se genera al pasar i_c a través de la impedancia del tejido z_c , la cual puede ser compleja, y que puede representarse como

$$z_c = Z_{cr} + jZ_{cim}$$

donde Z_{cr} y Z_{cim} son las componentes real e imaginaria respectivamente. Por otro lado, también podemos describir la impedancia en términos de su amplitud Z_c y fase θ como sigue:

$$z_c = Z_c \angle \theta$$

donde

$$Z_c^2 = Z_{cr}^2 + Z_{cim}^2$$
$$\theta = \arctan (Z_{cim} / Z_{cr})$$

y el voltaje de salida del tejido está dado por

$$v_c = V_c \cos (\omega_c t + \theta)$$

Donde

$$V_c = I_c Z_c$$

corresponde al valor pico de la señal del tejido y θ es la fase generada por la impedancia del tejido, la cual es la misma que la generada entre la corriente y el voltaje generado en la impedancia compleja del tejido.

La señal de medición de corriente de referencia se genera haciendo pasar la corriente i_c a través de la impedancia de referencia z_r , la cual es puramente resistiva

$$z_r = Z_r$$

y el voltaje así generado se describe como

$$v_r = V_r \cos(\omega_c t)$$

donde

$$V_r = Z_r I_c$$

es el valor pico de la señal de referencia. Este voltaje se encuentra en fase con la corriente dado que se genera mediante una impedancia real.

Las señales de voltajes descritas se modulan en amplitud con una ganancia proporcional a la impedancia del tejido y la referencia respectivamente (ver sección 2.5). La ganancia correspondiente al tejido puede variar con el tiempo debido a los cambios en la impedancia con el tiempo y los diferentes estados biológicos y daños a los que ha sido expuesto. Es precisamente la detección de éstos el objetivo principal de este proyecto y del instrumento propuesto. Por otro lado, la señal de referencia es constante en todas las mediciones y no tiene fase, por lo que la fase generada por el componente complejo de la impedancia del tejido refleja los cambios en ésta. Estos cambios serán transmitidos al espectrómetro de impedancia por medio de voltajes modulados en amplitud con una ganancia proporcional a ellos.

En la etapa siguiente es necesario detectar dichos cambios en los voltajes para poder cuantificarlos y analizarlos, y para ello primero se demodulan de forma sincrónica. Este proceso consiste en un detector que multiplica las señales moduladas en amplitud por otra señal e_{dm} de frecuencia ω_m , una frecuencia demoduladora. Esta corresponde a una frecuencia que mantiene siempre una diferencia fija con la portadora original ω_c . Este proceso es diferente que el proceso de demodulación clásico, y se basa en un nuevo método descrito por Steven Kun y sus colegas [7]. Este método se basa en el principio de mantener la diferencia entre la frecuencia de la señal de voltaje del tejido ω_c y la frecuencia de señal demoduladora ω_m constante sobre todo el rango del espectro de frecuencias. Esto se realiza gracias a la generación digital de señales precisas mediante el *Analog Devices* AD7008. En esta aplicación se utilizan dos de estos demoduladores síncronos idénticos en estructura, ganancia y frecuencia demoduladora. En la figura 3.11 se muestra su estructura.

Matemáticamente podemos describir el proceso de la siguiente forma. Las dos entradas del *primer* multiplicador son v_c y e_m , dados por

$$\begin{aligned} v_c &= V_c \cos(\omega_c t + \theta) \\ e_m &= E_m \cos \omega_m t \end{aligned}$$

El voltaje de salida v_{Ac_m} es el producto de estos dos voltajes,

$$v_{Acm} = v_c e_m = V_c E_m [\cos(\omega_c t + \theta) \cos \omega_m t]$$

$$v_{Acm} = V_{Acm} \left\{ \frac{1}{2} [\cos((\omega_c + \omega_m)t + \theta) + \cos((\omega_c - \omega_m)t + \theta)] \right\}$$

donde $V_{Acm} = V_c E_m$.

Aquí, θ corresponde a la fase entre los dos canales de demodulación y se refleja en las dos bandas laterales, la de suma $[(\omega_c + \omega_m)t + \theta]$ y diferencia $[(\omega_c - \omega_m)t + \theta]$.
Las dos entradas del *segundo* multiplicador son v_r y e_m , dados por

$$v_r = V_r \cos(\omega_c t)$$

$$e_m = E_m \cos \omega_m t$$

El voltaje de salida v_{Arm} como en el caso anterior también el producto de estos dos voltajes

$$v_{Arm} = v_r e_m = V_r E_m \cos \omega_c t \cos \omega_m t$$

$$v_{Arm} = V_{Acm} \left\{ \frac{1}{2} [\cos(\omega_c + \omega_m)t + \cos(\omega_c - \omega_m)t] \right\}$$

donde $V_{Acm} = V_r E_m$.

y contiene dos bandas laterales, de suma $(\omega_c + \omega_m)$ y diferencia $(\omega_c - \omega_m)$. Denominando como $\omega_{IF} = \omega_c - \omega_m$ a la diferencia de frecuencia entre las salidas de los demoduladores, se construyen dos filtros pasabanda con una frecuencia central de la banda paso de ω_{IF} y un buen factor de calidad Q, como en la figura 3.14. Pasando cada una de las señales por un filtro obtendremos únicamente la componente diferencial, expresada como

$$e_{Amc} = E_{Acm} \cos((\omega_c - \omega_m)t + \theta) = E_{Acm} \cos(\omega_{IF} t + \theta)$$

$$e_{Arm} = E_{Arm} \cos(\omega_c - \omega_m)t = E_{Arm} \cos(\omega_{IF} t)$$

donde e_{Amc} es la señal de información de impedancia del tejido obtenida a las salida del primer filtro y e_{Arm} es la señal de referencia. Como se muestra en las ecuaciones, la fase entre las dos señales de salida de los filtros es la misma fase que se generó en la impedancia del tejido tomando en cuenta que la carga de referencia es únicamente resistiva.

Para nuestra aplicación se escogió una frecuencia de diferencia ω_{IF} de 100 Hz. Siempre que se varía el valor de la frecuencia de la corriente inyectada ω_c en el sistema de la sonda de cuatro electrodos debe cambiarse la frecuencia demoduladora para mantener la diferencia $\omega_{IF} = \omega_c - \omega_m$ constante (100 Hz) y fija en todo el rango de frecuencias del espectro usando los generadores de funciones AD7008 que generan señales con frecuencias determinadas digitalmente.

Estas dos señales se convierten en señales digitales mediante una tarjeta de adquisición DAS08 y se introducen a la computadora para su procesamiento, extracción de información útil y almacenamiento.

3.2.5. Descripción del muestreo de datos[44]

Ambas, la señal senoidal de corriente de salida v_r (*señal de referencia*), y la señal del tejido v_c son generadas por la misma corriente y bajo las mismas condiciones. Esto permite aplicar una técnica conocida como *muestreo sincronizado* en el proceso de adquisición de datos. Esta técnica se basa en el principio de sincronía entre la frecuencia de muestreo y la frecuencia de la señal de onda senoidal adquirida.

Un ejemplo de como el muestreo sincronizado puede utilizarse para medir la amplitud y fase de la señal senoidal debida a la impedancia compleja del tejido. Para evaluar los parámetros, el sistema necesita adquirir las muestras de las dos señales en el tiempo t , muestra de cada señal en forma frecuente, asegurando mantener sus relaciones con el tiempo.

La definición de una secuencia periódica con período T_0 , es aquella para la que[42, 43]:

$$s(t) = s(t + T_0) \text{ para toda } t$$

si el período de muestreo es T , entonces:

$$s[n] = s(nT) = s(nT + T_0) \quad \text{para toda } n$$

$$nT + T_0 = mT \quad \text{m entero}$$

y cuando

$$T_0 = NT, \quad m = n + N$$

Así,

$$s[n] = s(nT + NT) = s[n + N]$$

es una secuencia periódica de período N , con N entero. Por ejemplo, si

$$s(t) = \cos(\omega_{IF} t)$$

y muestremos con período T , obtenemos:

$$S[nT] = \cos(\omega_{IF} nT)$$

$$S[n] = \cos(\omega n), \quad \text{con, } \omega = \omega_{IF} T,$$

si $S[n]$ debe ser periódica entonces:

$$S[n] = S[n + N]$$

para toda n y con N entera

$$S[n + N] = \cos(\omega n + \omega N)$$

$$S[n + N] = \cos(\omega n) \cos(\omega N) - \sin(\omega n) \sin(\omega N)$$

y debido a la periodicidad

$$\cos(\omega N) = 1 \text{ y } \sin(\omega N) = 0$$

por lo tanto

$$\begin{aligned} T_o &= NT \\ \omega N &= 2\pi \end{aligned}$$

En este proyecto se pueden describir las secuencias de las señales como

$$\begin{aligned} e_{A_{mc}} &= E_{ACm} \cos((\omega_c - \omega_m)t + \theta) = E_{ACm} \cos(\omega_{IF} t + \theta) \\ e_{A_{rm}} &= E_{Arm} \cos(\omega_c - \omega_m)t = E_{Arm} \cos(\omega_{IF} t) \end{aligned}$$

donde $\omega_{IF} = (\omega_c - \omega_m)$, y θ es la fase entre estas dos señales (ve capítulo 3.2.3),

$$e_{A_{cm}}[n] = E_{ACm} \cos(\omega_{IF} nT + \theta[n]); \text{ y}$$

$$e_{A_{rm}}[n] = E_{Arm} \cos(\omega_{IF} nT) \quad \text{con, } \omega = \omega_{IF} T,$$

$$\begin{aligned} e_{A_{cm}}[n + N] &= E_{ACm} \cos(\omega n + \omega N + \theta[n]) \\ e_{A_{rm}}[n + N] &= E_{Arm} \cos(\omega n + \omega N); \end{aligned}$$

y como $\omega N = 2\pi$, entonces

$$\begin{aligned} e_{A_{cm}}[n] &= E_{ACm} \cos(\omega n + \theta[n]) \\ e_{A_{rm}}[n] &= E_{Arm} \cos(\omega n) \end{aligned}$$

$\theta[n]$ puede ser descrita como $\theta[n] = K T$, donde K es el número mínimo de muestras entre dos máximos, mínimos, o cruces por cero consecutivos en el tiempo entre dos señales como se muestra en la figura 3.7. Para calcular la fase correspondiente podemos escribir:

$$\begin{aligned} T_o &= NT \\ \omega N &= 2\pi \\ \theta[n] &= k T \\ \theta &= (K/N) * 2\pi \text{ radianes} \\ \theta &= (K/N) * 360 \text{ grados} \end{aligned}$$

y se concluye que como N debe ser entera, $e_{A_{rm}}[n]$ será periódica con período $2\pi / \omega$ siempre y cuando este cociente sea entero.

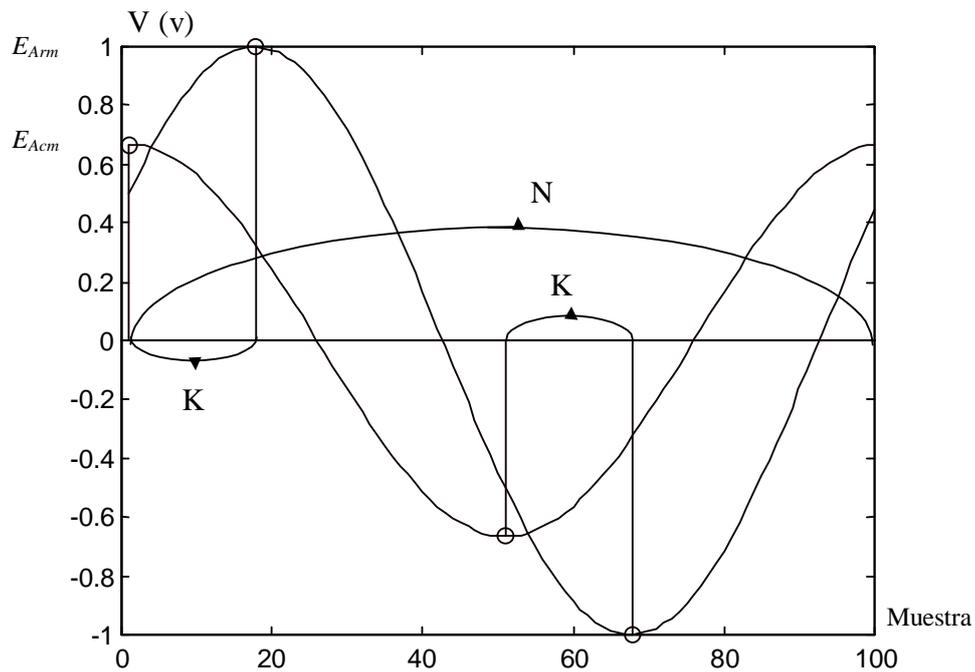


Figura 3.7. Las dos señales mostradas tienen el mismo período y una diferencia de fase K . La diferencia de fase se puede calcular como $\theta = (K/N) * 360$ grados[44].

Cuando la ganancia de ambos canales es la misma la amplitud de salida de las dos señales es proporcional a su carga, como ya hemos mencionado, y como la carga de referencia se conoce ($Z_r = 47 \Omega$ en esta aplicación), proporcionado la amplitud de salida de las dos señales se puede calcular la magnitud de la impedancia de carga Z_c :

$$Z_c = E_{ACm} * Z_r / E_{Arm}$$

Al muestrear ambas señales (e_{Am} y e_{Arm}) a la misma frecuencia, las señales digitales de cada parte tendrán un valor proporcional en amplitud y la misma fase en comparación con las señales originales analógicas.

3.3. Características de diseño del hardware del espectrómetro de impedancia

En esta sección se describe en detalle la operación de cada módulo del instrumento que se propone. Primero se presenta el diseño de *hardware* para el generador de corriente de salida (el cual produce la corriente que se inyecta al tejido). Posteriormente se presenta el sistema de electrodos y su diseño. Por último se discute el sistema completo para el procesamiento y adquisición de datos, así como un protocolo en *software* para el control del sistema.

3.3.1. Descripción de los módulos de fuente y medición de corriente

El módulo de fuente de corriente produce una corriente alterna de salida con una amplitud constante a una frecuencia arbitraria. El diagrama del circuito simplificado para generar la corriente de salida en el espectrómetro de impedancia y el módulo de fuente de corriente, se muestra en la figura 3.8. Este módulo se compone de un generador de ondas senoidales, control de amplitud de corriente y una fuente de corriente constante como puede también apreciarse en dicha figura.

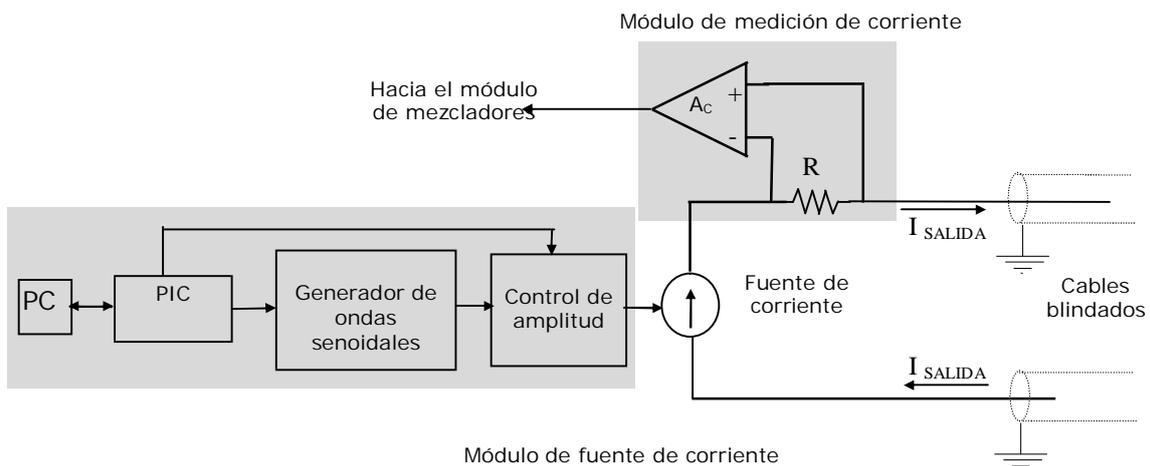


Figura 3.8. Diagrama simplificado del circuito del módulo para generar la corriente de salida. El generador de onda senoidal produce un voltaje alterno, el cual se amplifica mediante un amplificador operacional con una ganancia controlada por voltaje controlado por la PC o por un switch analógico (arreglo de resistencias manejado por un switch analógico). La fuente de corriente convierte el voltaje senoidal a corriente de salida (es una fuente de corriente controlada por voltaje). Para encontrar la amplitud y fase de esta corriente de salida se emplea el módulo de medición de corriente, el cual genera un voltaje proporcional a la corriente. Finalmente la corriente se transfiere a los electrodos a través de un par de cables blindados.

La corriente pasa a través del módulo de medición de corriente para así determinar su amplitud y fase. La corriente pasa entonces a través del cable blindado hasta los electrodos, en donde es inyectada al tejido.

El *generador de onda senoidal* del sistema produce una señal a una frecuencia arbitraria determinada por la PC y se basa en un circuito integrado de *Analog Devices*, el modulador digital AD7008. Este componente genera una señal de onda senoidal a una frecuencia máxima de 2.11 MHz con una relación señal a ruido de 50 dB y una distorsión armónica total de -55 dB a 1 MHz.

El principio de operación del generador se presenta en la figura 3.9. El AD7008 contiene un contador digital programable (denominado *acumulador de fase* en la figura 3.10), tablas de funciones seno y coseno (4096 muestras por período) en ROM y un canal de diez bits para conversión de datos digitales a analógicos (DAC). El acumulador de fase genera la dirección local para las muestras en la ROM y El AD7008 lee dos muestras de la ROM al mismo tiempo (muestras en fase y en cuadratura). Estas muestras son multiplicadas digitalmente (moduladas) por los valores almacenados en el registro IQMOD y se suman. Finalmente, el DAC convierte las muestras en una señal analógica.

El AD7008 tiene además dos registros de frecuencia (FREQ) programables. Los datos que determinan la frecuencia de salida del AD7008 están almacenados en uno o ambos registros FREQ. Solamente un registro FREQ puede usarse a la vez (solo un registro determina la frecuencia de salida en un momento dado) y éste se selecciona por medio de la señal FSELECT. Así, alternando entre ambos registros, el AD7008 permite fácilmente la modulación binaria en frecuencia de la señal de salida.

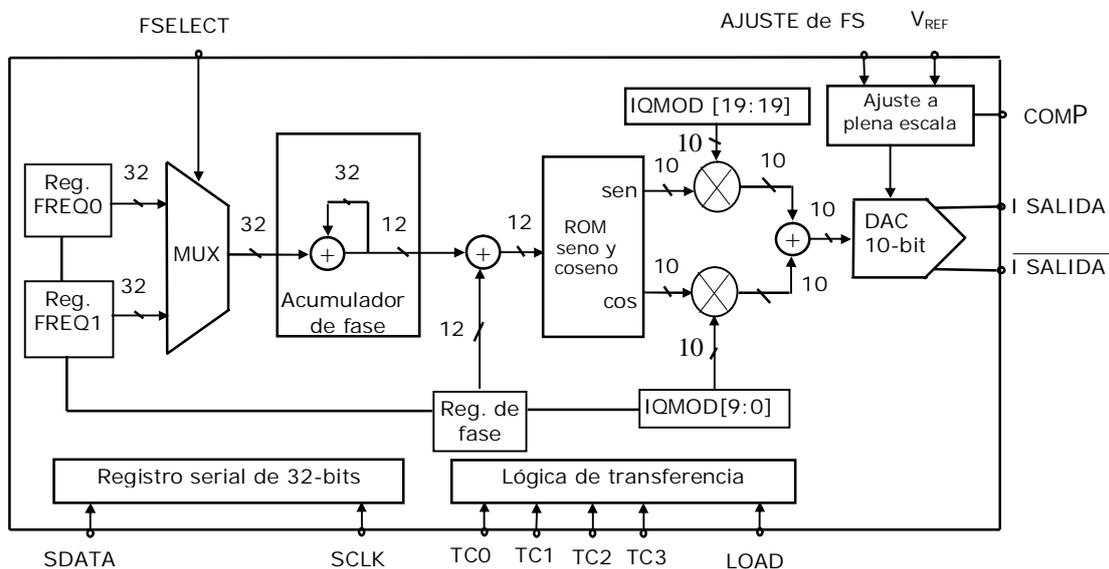


Figura 3.9. El AD7008 de Analog Devices, un modulador directo de síntesis digital (DDS), representado por un diagrama de bloques funcionales (sin mostrar las entradas de datos en paralelo). Este componente es un oscilador controlado numéricamente empleando un acumulador de fase, tablas ROM de seno y coseno, y un convertidor D/A. Puede ser usado para síntesis de frecuencia, modulación en amplitud, frecuencia y fase (en fase y cuadratura), y demodulación digital. Es programable mediante un microprocesador a través de una interfase serie o paralelo.

El acumulador de fase genera la frecuencia de la señal de salida usando los datos de entrada provenientes del registro FREQ seleccionado. El valor del registro FREQ y el valor del acumulador de fase se suman y el resultado se almacena de nuevo en el acumulador de fase, todo en sincronía con el reloj principal. El dato digital en el acumulador representa un número entre 0 y $2^{32} - 1$. Este valor está asociado con el ángulo de la función senoidal que se lee de la tabla ROM y además con la fase de la señal de salida. Los doce bits más significativos del acumulador de fase representan la dirección local para la lectura de muestras de la tabla ROM (un 0 representa la dirección 0 de la ROM que contiene una muestra de una onda senoidal con ángulo de

fase de cero (2π) radianes, un 1 representa la dirección 1 de la ROM que contiene una muestra con ángulo de fase de $2\pi/2^{12}$ radianes, 2^{11} corresponde a una señal con ángulo de fase de π radianes, etc.). El número almacenado en el acumulador se incrementa constantemente en forma síncrona con el reloj principal, con el consiguiente incremento constante en el ángulo de fase de las muestras de la senoide leída y de la señal de onda senoidal de salida. Cuando el número en el acumulador rebasa su máximo valor ($2^{32} - 1$), continúa contando desde cero. De forma análoga, el ángulo pasa de 2π a 0 radianes y, al ser equivalentes los dos ángulos, no hay interrupción en la señal de salida.

La frecuencia de la señal de salida está determinada por un registro `FREQ` y puede calcularse usando la ecuación siguiente:

$$f_{OUT} = f_{code} / 2^{32} * f_{CLOCK}$$

donde f_{code} es un número entre 0 y $2^{32}-1$ almacenado en el registro `FREQ` denominado *código de frecuencia* y f_{CLOCK} es la frecuencia del reloj principal.

Otra característica del AD7008 es que se puede desfasar adicionalmente la señal de salida a través del registro `PHASE`.

Para nuestros objetivos, el AD7008 debe ser capaz de generar una onda senoidal pura a una frecuencia arbitraria. En la figura 3.11 se presenta el diagrama simplificado a bloques del AD7008, junto con sus conexiones entrada/salida. La computadora determina la frecuencia de salida escribiendo un *código de frecuencia* dado al registro `FREQ0` y mandando una señal de sincronía al AD7008 y al módulo de adquisición de datos. Para simplificar el procedimiento, estas dos funciones se realizan en dos pasos, utilizando el hardware digital especializado que forma parte del módulo de comunicación. En la primera etapa se escribe el código de frecuencia en el registro serial de 32 bits del AD7008 (el cual se discute más adelante). En la segunda etapa, el sistema realiza lo siguiente:

- Selecciona el registro `FREQ1` (cuyo valor es cero) al activar `FSELECT`.
- Prepara el acumulador de fase (salida cero) mediante una señal de `RESET`.
- Copia el valor del registro serial de 32 bits al registro al escribir el *nibble* 1100 en `TC[3:0]` y manda una señal de `LOAD`.
- Empieza a generar la señal de onda senoidal de salida con fase de 0 radianes desde el momento en que el registro `FREQ0` se selecciona al desactivar `FSELECT`.

Todas las señales de entrada se encuentran sincronizadas con el reloj principal.

Ejemplo de programación de la frecuencia de la corriente de salida

Si la frecuencia de la corriente de salida deseada es $f_{señal} = 1$ KHz, y el reloj principal del sistema se encuentra a $f_{reloj_principal} = 10$ MHz, entonces el código de frecuencia puede ser calculado así:

$$f_{code} = \text{int}(2^{32} * f_{señal} / f_{reloj_principal} + 0.5) = \text{int}(2^{32} * 1 \text{ KHz} / 10 \text{ MHz} + 0.5) = 429497$$

Debido al redondeo en el código de frecuencia (`int`), el valor de salida no es exactamente 1 KHz. La salida de frecuencia real se calcula así:

$$f_{señal} = f_{reloj_principal} * f_{code} / 2^{32} = 10 \text{ MHz} * 429497 / 2^{32} = 1000.0006 \text{ Hz.}$$

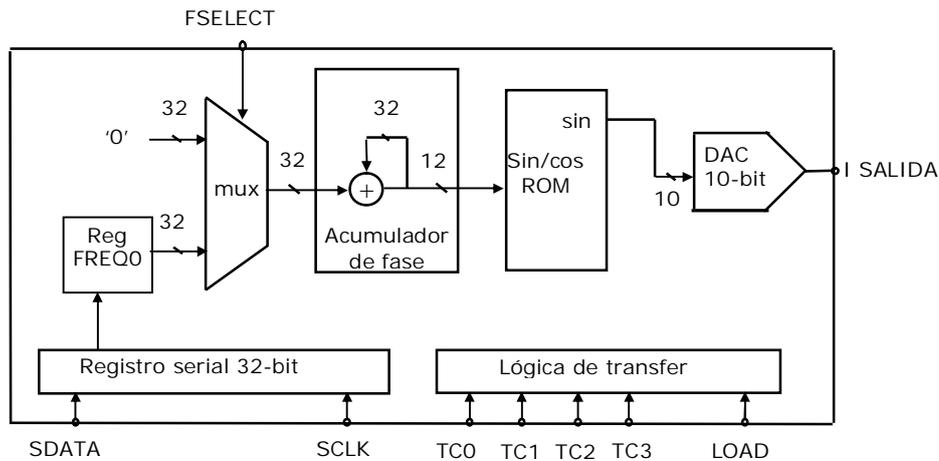


Figura 3.10. Diagrama de bloques funcionales del AD7008 como un generador de señal senoidal de frecuencia programable. Los datos que determinan la frecuencia de la señal se mandan a través de la interfase serial al registro FREQ0. El acumulador de fase genera direcciones que se usan para leer las tablas seno y coseno almacenadas en ROM. Las muestras se mandan al convertidor D/A, el cual genera a partir de ellas una señal analógica.

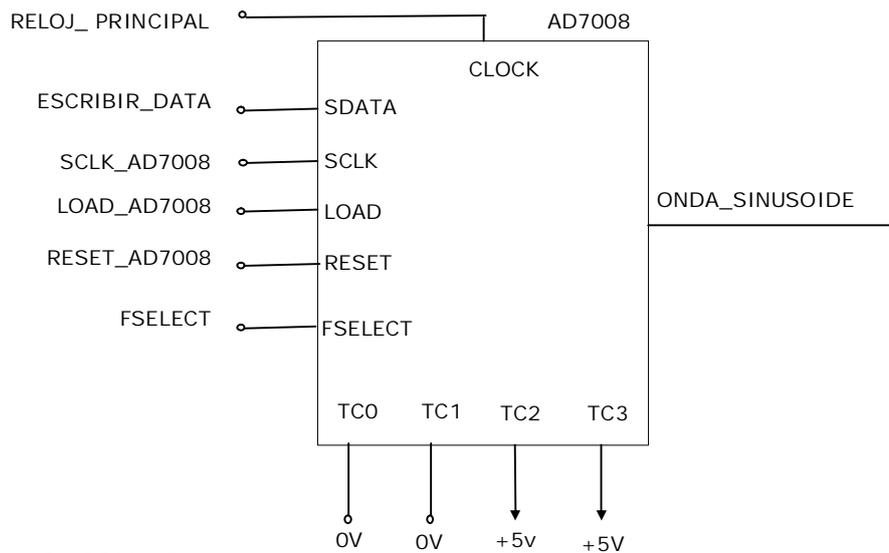


Figura 3.11. El AD7008. Diagrama de conexiones externas.

Entradas del módulo

Las señales de entrada vienen de la PC a través del módulo de comunicación. La computadora puede darle el código de frecuencia al generador de onda de la siguiente forma: primero manda la dirección 1 al módulo de comunicación y después manda los 32 bits del código de frecuencia.

La fuente de corriente genera una corriente de salida proporcional al voltaje de entrada (al voltaje de salida del generador de onda senoidal amplificando su amplitud por amplificador de ganancia controlada por voltaje "AD600"). Puede generar corriente alterna con una frecuencia máxima de 1 MHz. El diagrama simplificado de la fuente y su módulo de entradas se muestra en la figura 3.12 y se basa en un amplificador operacional AD844 de Analog Devices.

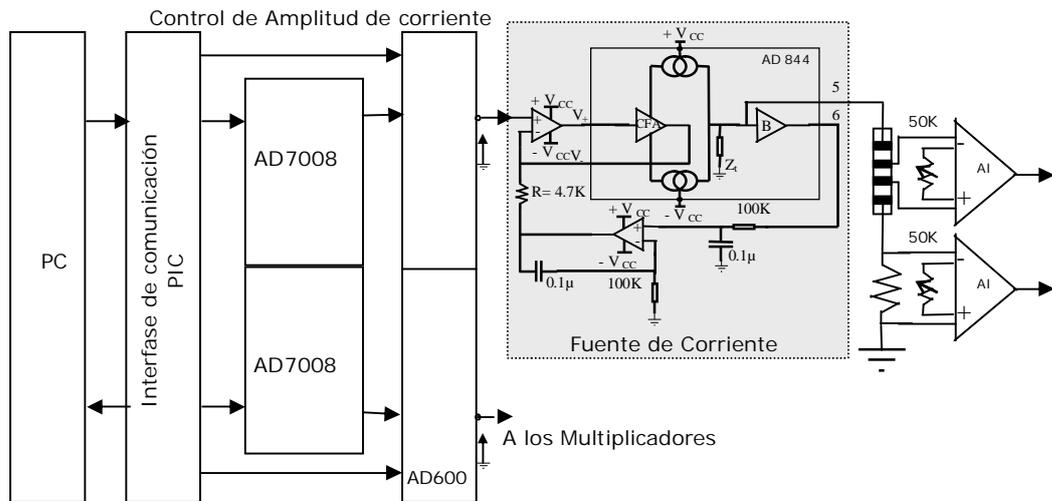


Figura 3.12. ¹Esquema de circuito de control de la fuente de corriente. Se muestra aquí bloques de control de frecuencia y amplitud de la corriente. El AD7008 controla la frecuencia, y el amplificador con Ganancia controlada por voltaje AD600 controla la amplitud mediante un voltaje controlado por la PC o por un switch analógico.

La fuente de corriente Usada [1,38,46]

La generación de corriente de salida se realiza de forma proporcional al voltaje de entrada. Podrá generarse corriente de salida AC con frecuencia hasta de 1MHz. El diagrama simplificado se presenta en la figura 3.13 y se basa en un amplificador de retroalimentación de corriente AD844 de Analog Devices. Este amplificador tiene una impedancia de entrada grande (entrada no inversora) y una entrada de baja impedancia (inversora). En una operación de circuito-abierto, la corriente que pasa a través de la entrada inversora $(V_{+IN}-V_{-IN})/R_{IN}$ (R_{IN} típicamente de 50Ω) es copiada por el espejo de corriente mediante la impedancia transversal $Z_t=R_t^{\circ}C_t$ ($R_t=3M\Omega$, $C_t=4.5$ pF), y el voltaje resultante sobre esta impedancia pasa por un seguidor de voltaje de ganancia unitaria. El alto valor de la impedancia transversal le proporciona al amplificador una alta ganancia de voltaje.

Además, este amplificador presenta un nodo de alta impedancia accesible para la compensación de frecuencia externa (TZ), lo que permite emplear sus espejos de corriente como fuente de corriente de alta impedancia con corriente de salida proporcional a voltaje entre sus entradas inversora y no inversora.

El problema de la fuente de corriente basada en el AD844 es la presencia de un componente DC en su corriente de salida. La corriente de salida se inyecta al tejido a través los electrodos. La mayoría de los tipos de electrodos (como los electrodos de Ag-AgCl, los preferidos) se descompone y cambian sus características cuando la corriente DC pasa a través ellos, un problema que estamos resolviendo. Para prevenir que la corriente DC pase a través los electrodos, es necesario poner un capacitor en serie con la fuente de corriente (como se muestra en la figura 3.13). Sin embargo, una corriente DC residual carga el capacitor y satura al espejo de corriente. Para prevenir esto, un diseño de fuente de corriente especial es necesario para mantener el voltaje del capacitor a 0V.

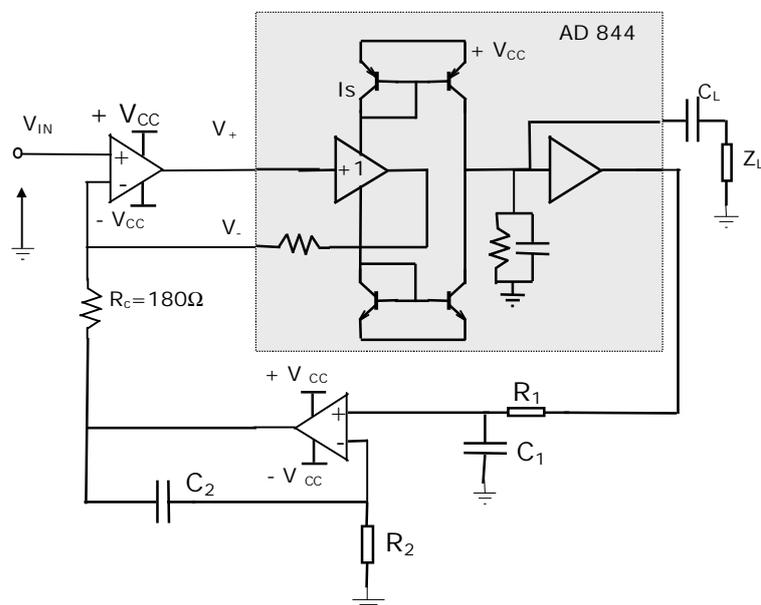


Figura 3.13 El sistema de fuente de corriente proporcional para el espectrómetro de impedancia basado en un amplificador de retroalimentación de corriente AD844 de Analog Devices. Este sistema tiene la respuesta en frecuencia adecuada para el objetivo y resuelve el problema de la componente DC en la corriente de salida.[38]

Bragos et al[46]. Propusieron una fuente de corriente que resuelve este problema. Esta solución mantiene el voltaje DC de salida a 0V usando una circuito de retroalimentación que mide el voltaje de salida usando el buffer de salida de AD844s, filtrando el componente AC de salida y aplicando una corrección DC a la entrada. La corriente de salida máxima de la fuente de corriente proporcional es aproximadamente de 10mA y su voltaje máximo a la salida es aproximadamente 8 V (para $V_{cc} = \pm 15V$).

Para mantener la corriente en el rango lineal, el voltaje de entrada del AD844 debe mantenerse por debajo de 1V. Esto introduce problemas adicionales para encontrar la amplitud de corriente de salida óptima. La solución propuesta permite ajustar la amplitud de corriente de salida usando un resistor externo R_c . La amplitud de corriente de salida será determinada por el voltaje de entrada de la fuente de corriente V_{IN} y el resistor R_c :

$$I_{OUT} = V_{IN}/R_c$$

la fuente de corriente tiene un filtro pasabajos en su retroalimentación que requiere un balance entre el tiempo de respuesta y la frecuencia de corte, esta última dada por:

$$f_{corte} = 1/ 2\pi R_1 C_1$$

donde $R_1 = R_2$ y $C_1 = C_2$. Para optimizar la fuente de corriente para que trabaje en el rango de frecuencia requerido (100Hz a 1MHz), f_{corte} se ajustará a 15.9Hz ($R_1=R_2=100KHz$ y $C_1=C_2=100nF$). [1].

Los módulos de control de frecuencia y amplitud de la corriente

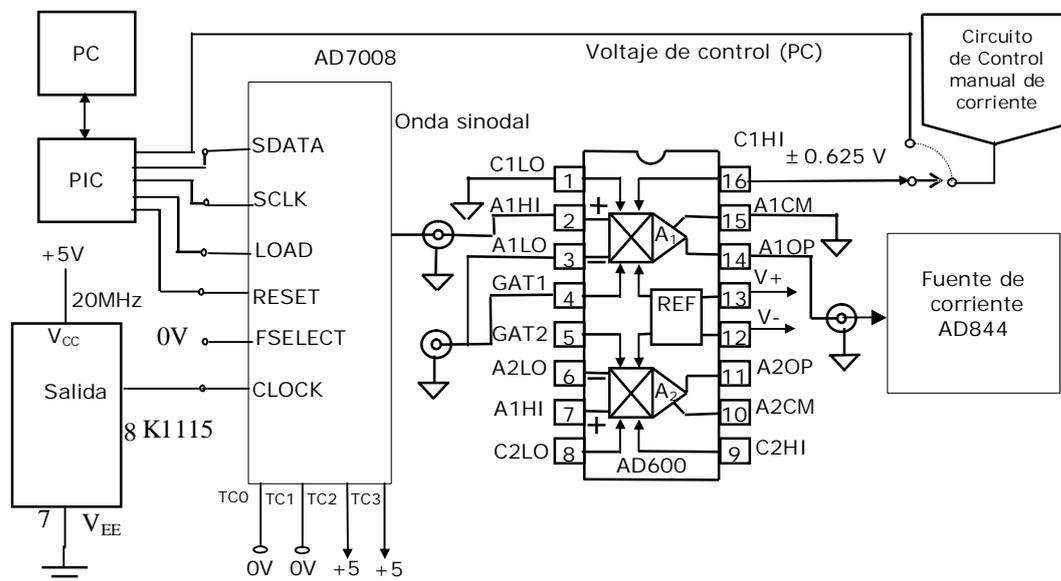


Figura 3.14. Esquema de circuito de control de corriente. Se muestra aquí el control de frecuencia y amplitud de corriente. La PC controla la frecuencia de la señal de la salida del AD7008 y la Ganancia de amplificador con controlada por voltaje AD600 para control la amplitud.

Se controla la frecuencia a través de un PIC16C773 que es programado mediante la PC, programando la frecuencia de la señal en la salida del generador de funciones AD7008, y la amplitud de la corriente se controla por medio del amplificador con ganancia controlada por voltaje AD600(figura 3.14). Este amplificador controla la amplitud de la señal generada por AD7008 anterior. La amplitud de la señal de salida de AD600 esta controlada a través de un selector de Control manual (switch analógico) para elegir la ganancia del amplificador aplicada a su voltaje de entrada(figura 3.15). La señal de la salida del AD600 es la señal de entrada del modulo de la fuente de corriente mencionada, y la corriente de salida es proporcional linealmente al valor de este voltaje.

El amplificador AD600: tiene impedancia de entrada baja (típicamente 100Ω). Esta impedancia es muy baja para ser manejada por el CI AD7008 sin provocar cierta distorsión, donde la resistencia puesta en la salida del AD7008 es de 49Ω , y esta entra en paralelo con la impedancia de entrada del AD600. Lo mencionado anteriormente cambia el valor de voltaje en la salida del AD7008 generado con 49Ω , a otro valor constante también pero generado en carga de 49Ω que está en paralelo con 100Ω como impedancia de entrada del AD600. Esta en el caso de usar este amplificador de ganancia programable para el control de corriente, pero en el otro caso que se propone el uso del amplificador mencionado en el control de amplitud de las señales de salida del sistema, manejado por los amplificadores TL084, en su salida en la configuración de filtro pasa baja este amplificador se puede ver como un buffer y el efecto será mínimo. Por esta razón se recomienda usar un buffer con ganancia unitaria en lugar antes del AD600. También, Ad600 usa fuente de alimentación $\pm 5V$ mediante que los generadores de voltajes AD7008 usan voltajes de 0 a 5V, y los otros componentes usan voltajes de $\pm 12 V$, por eso y para tener las señales dentro el rango de voltajes, se usan divisores de voltajes que consisten de arreglos de resistencias con valores apropiados, o usando amplificadores operacionales para generar los voltajes proporcionados funcionales. Esta fue una razón para utilizar un solo rango de voltajes de alimentación para todos los amplificadores del sistema de $\pm 5V$. El AD600 tiene ancho de banda amplia de DC a 35MHz, bajo ruido, bajo distorsión.

El módulo de medición de corriente determina la corriente inyectada al tejido (ver figura 3.8). Esta corriente pasa a través de una resistencia $R = 47 \Omega$ y produce un voltaje que se amplifica mediante un amplificador de instrumentación(INA111). El voltaje obtenido pasa por el módulo de modulación (el cual se describe mas adelante, llamado señal de referencia, que representa la corriente) y posteriormente al microcontrolador. En nuestro modelo de instrumentación no se mide el valor absoluto de corriente.

Los cables blindados se utilizan para conectar al módulo de fuente de corriente con el sistema de electrodos, protegiendo la señal de corriente de salida de cualquier ruido que pudiera ser inducido en el cable. Debido a que el voltaje entre el blindaje y el cable es aproximadamente cero (el blindaje se alimenta con el mismo voltaje que el cable), la capacitancia parásita es aproximadamente cero.

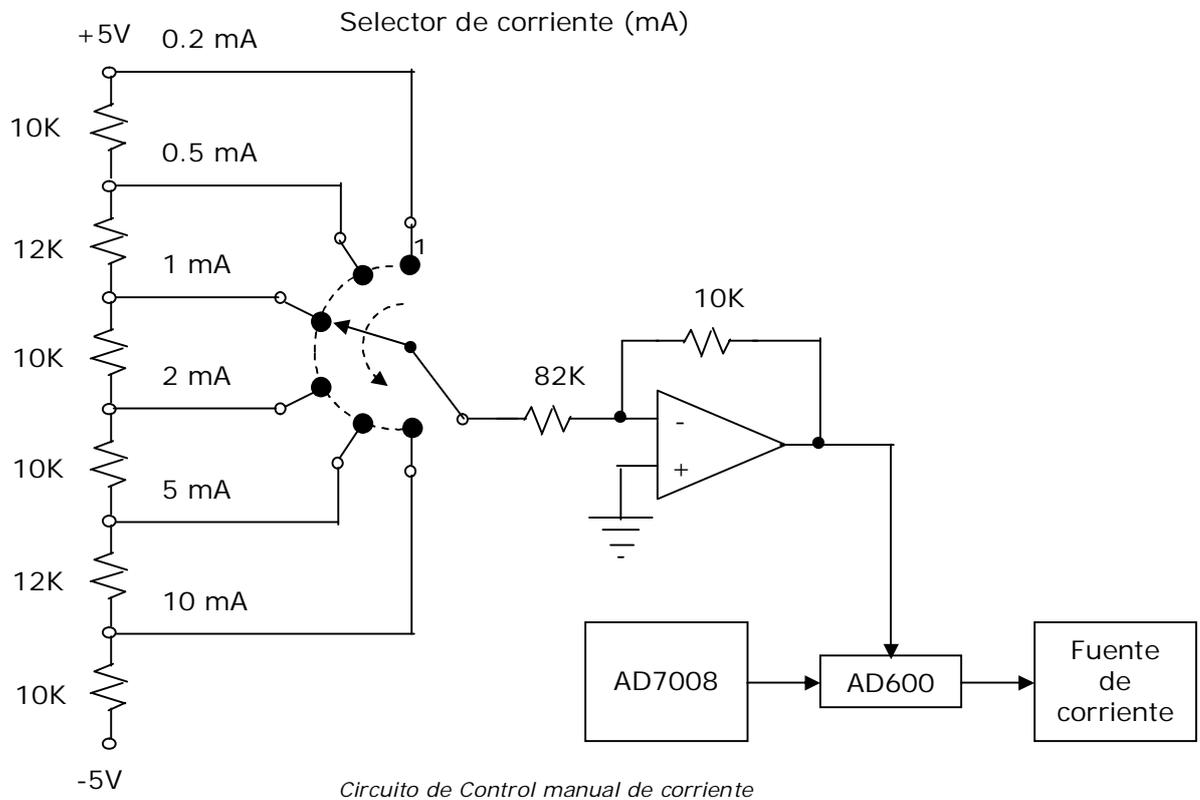


Figura 3.15 El sistema de control manual de fuente de corriente utilizada para el espectrómetro de impedancia basado en amplificador operacional y circuito de retroalimentación. El voltaje de salida esta controlado mediante un selector de Control manual (switch analógico) para elegir el voltaje de entrada que corresponde a la corriente deseada.

3.3.2. Descripción del módulo de mezcladores

Los mezcladores se componen de un modulador y un filtro pasa banda. Cada mezclador modula cada uno de los voltajes generados al atravesar la misma corriente en serie por la impedancia del tejido (v_c) y por la impedancia de referencia (v_r). La modulación se realiza mediante un tercer voltaje (v_m) a una frecuencia (moduladora) tal que la diferencia de ésta con las frecuencias de los dos voltajes anteriores es constante sobre todo el espectro. Los voltajes de carga y de referencia tienen la misma frecuencia, la de la corriente que atraviesa las impedancias, y pueden tener diferentes fases dependiendo del tipo de impedancia: compleja (con fase) y resistiva (sin fase), en comparación con la señal de corriente. Al modular se producen dos bandas a dos frecuencias diferentes, correspondientes a la suma y la diferencia de la frecuencia moduladora y las señales. Estas pasan por un filtro pasabanda muy estrecho cuya frecuencia central corresponde a la frecuencia de diferencia. Las señales producidas poseen la misma frecuencia y sus amplitudes son proporcionales a la impedancia de carga y de referencia respectivamente, mientras que la diferencia de fase es proporcional a aquella de la carga (figura 3.16).

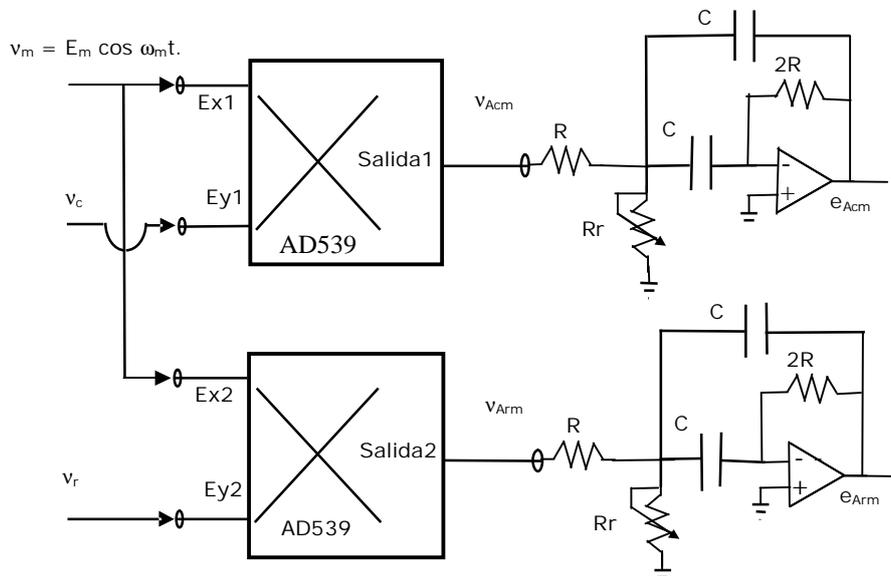


Figura 3.16. Los mezcladores y sus componentes (moduladores y filtros pasabanda). Ambos son idénticos. Y usando un solo chip de AD539 con uso de doble multiplicador

Los multiplicadores

Se cuenta con dos multiplicadores y cada uno recibe dos señales. La primera señal es un voltaje a una frecuencia moduladora. La segunda señal es diferente para cada modulador. Uno recibe una señal de voltaje proporcional a la impedancia de carga, la cual puede ser real o compleja, y el otro recibe una señal proporcional a la impedancia de referencia, puramente resistiva y constante.

Por otro lado, el diseño físico de ambos moduladores es idéntico. Se basa en un multiplicador de cuatro cuadrantes. Detector de alta ganancia AD539 Analog Device mostrado en la figura 3.17.

AD539 tiene Dos Multiplicadores / Divisores cuadrante; dos canales de señales independientes; ancho de banda de señales de 60MHz (I_{OUT}); ancho de banda de canal

de control lineal de 5MHz; baja distorsión (hasta 0.01%); y circuito monolítico, y calibrado completamente.

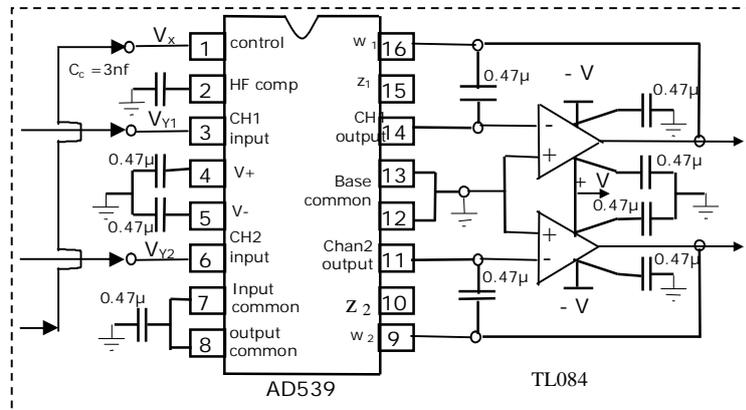


Figura 3.17. Diagrama detallado del circuito de modulación empleando el multiplicador AD539 de Analog Device, en la configuración de doble multiplicador mostrando todas sus conexiones, y el circuito de compensación usando los amplificadores TL084.

AD539 es un multiplicador analógico con baja distorsión, tiene dos canales de señales idénticas (Y1 y Y2), entrada X común, y control de ganancia lineal. El ancho de banda se realiza sobre la mayor parte del rango de ganancia usando AD539 con una carga de resistencia simple de valor mayor a 100Ω. El voltaje de salida es restringido a pocos cientos de milivolts bajo del voltaje de alimentación. Los dos canales proveen flexibilidad. En aplicaciones de señales simples pueden ser usadas en paralelo para duplicar la corriente de salida, o en serie para alcanzar una función con ganancia baja-cuadrada con un rango de control más de 100dB, o diferencial, para reducir la distorsión. El consumo de energía es solamente 135mW usando voltajes de alimentación ±5V.

Conexiones de multiplicador básico La figura 3.16 muestra las conexiones de un multiplicador con dos canales estándar, usando un amplificador operacional para proveer energía de salida útil y resistores de retroalimentación de AD539 para alcanzar escalamiento preciso. La función de transferencia para cada canal es

$$V_w = -V_x V_Y$$

Donde las entradas y salidas están en volts. Cuando las entradas tienen Valores de escala mayor nominales $V_x = +3V$, $V_Y = \pm 2V$ las salidas tendrán $\pm 6V$ de escala mayor. Dependiendo al amplificador operacional, los voltajes de alimentación usualmente tienen que ser 2V más del pico de la señal de salida. Por lo anterior, la alimentación mínima requerida es de $\pm 8V$. El AD539 puede compartir esta alimentación. Entradas mayores son posibles sí V_x y V_Y están con sus valores máximos de $+3.2V$ y ± 4.2 respectivamente, el pico de la salida es $\pm 13.4V$. Este requiere que los amplificadores operacionales trabajen con alimentación de $\pm 15V$. Abajo de estas condiciones es recomendable reducir la alimentación al $\pm 7.5V$ para limitar la dispersión de energía.

Los filtros pasabanda se encuentran colocados a la salida de los moduladores, tienen la misma frecuencia central (igual a la frecuencia de diferencia entre las dos frecuencias de entrada a los moduladores) y su factor de calidad es elevado (entre mas angosto es el filtro, mejor elimina el ruido y solamente permite el paso a las señales útiles).

La construcción de estos filtros de banda angosta es semejante y se muestra en la figura 3.18. Se emplea un solo amplificador operacional con una resistencia de retroalimentación $2R$ de modo que ésta sea el doble de la resistencia de entrada R , para que la ganancia máxima del filtro sea 1 en la frecuencia central f_r (figura 3.19). Ajustando R_r es posible cambiar o realizar un ajuste fino de la frecuencia sin modificar el ancho de banda o la ganancia del filtro. [41]

El funcionamiento del filtro de banda angosta con ganancia unitaria de la figura anterior esta determinado por unas cuantas ecuaciones simples. El ancho de banda B en *hertz* está dado por la resistencia R y los dos capacitores (iguales) C de la siguiente forma:

$$B = 0.1591 / RC$$

donde

$$B = f_r / Q$$

y Q es el *factor de calidad* del filtro. La ganancia tiene un máximo unitario en la frecuencia f_r , siempre y cuando la resistencia de retroalimentación tenga un valor del doble de la impedancia de entrada.

La frecuencia central f_r queda determinada por la resistencia R_r de acuerdo con :

$$R_r = R / (2Q^2 - 1)$$

y cuando se conocen los valores de los componentes del circuito, la frecuencia de resonancia puede calcularse mediante

$$f_r = (0.1125 / RC) (1 + R / R_r)^{0.5}$$

Utilizando este modelo en la práctica para nuestro objetivo se determinaron los valores siguientes $f_r = 100$ Hz, $R = 330$ k Ω y $C = 0.1$ μ F.

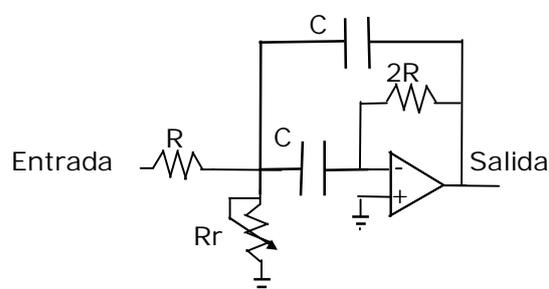


Figura 3.18. Diagrama de los filtros pasabanda usados.

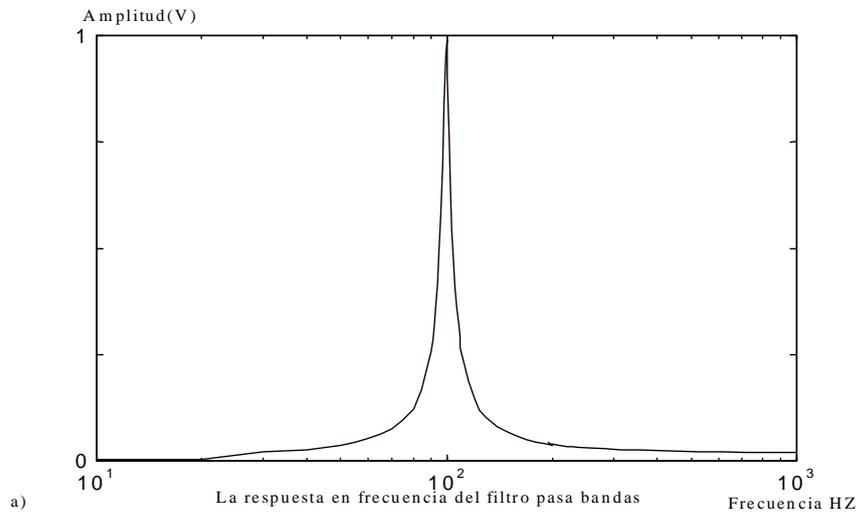


Figura 3.19. Respuesta en frecuencia de los filtros pasabanda usados, con una frecuencia central de 100 Hz y un ancho de banda muy angosto.

3.3.3. Descripción del módulo de adquisición de datos

Este módulo se encuentra a la salida de los filtros pasa banda para acondicionar los datos en un rango dinámico adecuado para su adquisición y posterior envío transmisión y almacenamiento en la computadora. Consiste en un amplificador operacional para cada canal, Sistema de interfase con el convertidor análogo digital de una tarjeta de adquisición o un microcontrolador de programación y comunicación.

Los amplificadores empleados se muestran en la figura 3.20 y son las dos canales de AD600 debido a sus propiedades, aunque en esta sección del sistema se puede usar cualquier amplificador de respuesta en baja frecuencia gracias a los mezcladores que han cambiado las señales de entradas a una sola frecuencia baja de 100 Hz. El sistema de interfase Entre AD600 y PIC, para un solo canal esta mostrada en la figura 3.21.

El control de ganancia se realiza en ambos canales en paralelo a través de la variación del voltaje en el control de ganancia del AD600 por medio de un switch analógico(figura 22).

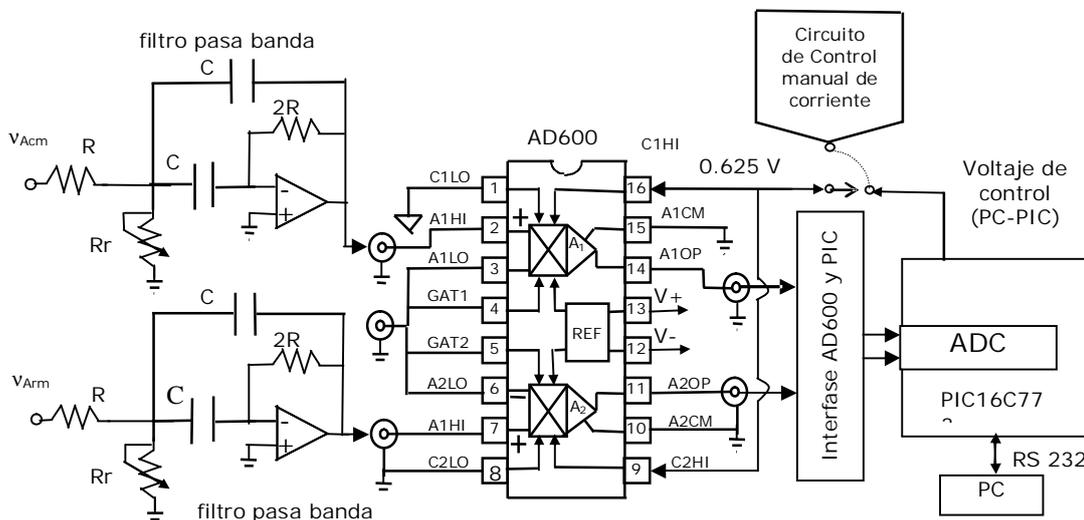


Figura 3.20. El módulo de amplificadores operacionales de salida como acoplamiento entre el instrumento y el microcontrolador. Las salidas se controlan mediante el control de ganancia de los dos canales del amplificador AD600, las cuales son conectadas al mismo control.

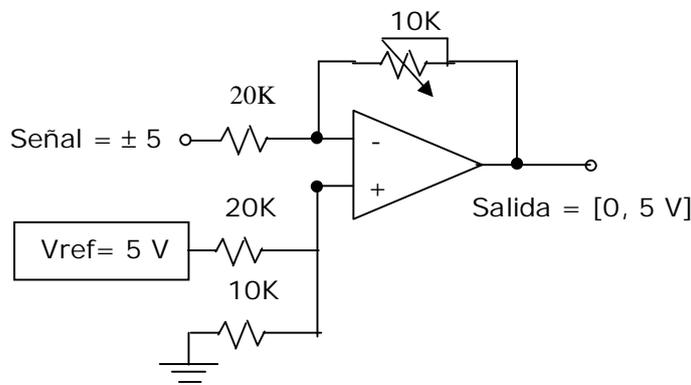


Figura 3.21. Sistema de interfase Entre AD600 y PIC, para un solo canal

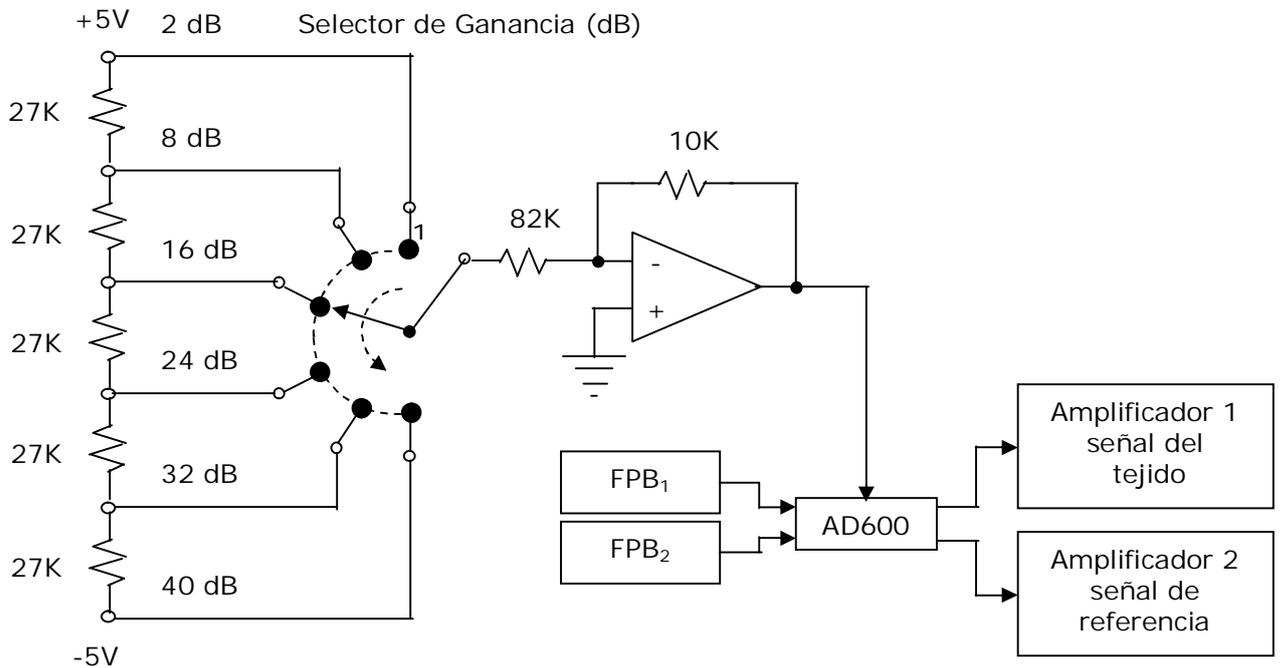


Figura 3.22. Circuito de Control manual de Ganancia para las señales de salidas del espectro

El sistema de programación y comunicación permite que la PC controle la operación del espectrómetro y adquiera los datos a través de un microcontrolador. Este sistema realiza las siguientes funciones:

- Fija la frecuencia de la corriente de salida programando al generador de funciones.
- Fija la frecuencia de la señal demoduladora programando al generador de funciones.
- Lee la señal producida por la carga del tejido.
- Lee la señal de referencia con impedancia puramente resistiva y constante.

Las principales funciones de comunicación entre la computadora y el espectrómetro se realizan por medio de un microcontrolador (PIC16C773) que se comunique con la PC a través del puerto serial. Este sistema realiza la función de conversión analógica-digital (ADC) y genera las señales digitales necesarias para programar los generadores de funciones AD7008 bajo el control de la PC. Todas las tareas de software se realizan mediante funciones de la librería incluida con este PIC, y funciones de control de puerto serial RS232.

como se conecta el PIC con una PC

Un convertidor de niveles debe ser usado para convertir los niveles TTL (0-5V) los cuales opera el PIC con los voltajes de RS-232 ($\pm 3-12V$) usada por la PC. Una configuración popular usando el chip MAX232 como convertidor de nivel, figura 3.23.

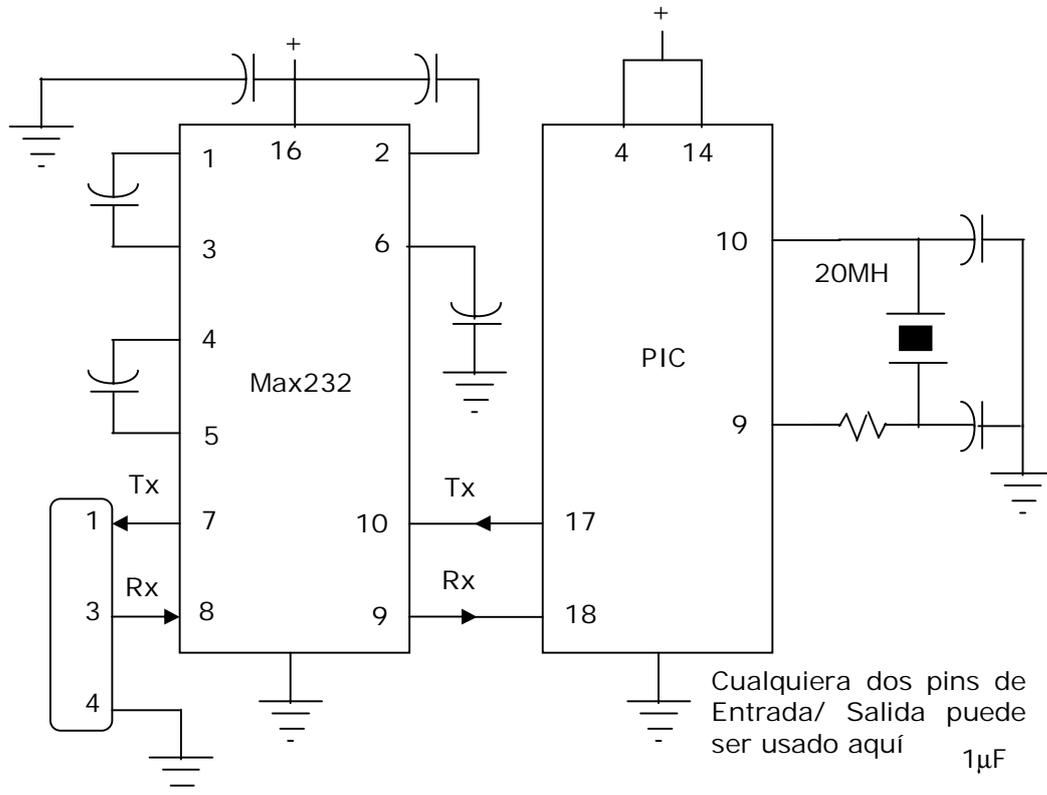


Figura 3.23. Circuito de la configuración usada para conectar el PIC con una PC

El módulo de conversión y adquisición de datos

Para la conversión de los datos analógicos (la señal del tejido y la referencia capítulo 3.2.5) a señales digitales para su posterior almacenamiento y procesamiento en la computadora se utiliza un sistema con un microcontrolador PIC16C773 de Microchip Technology Inc donde se utiliza sus primeros dos canales de conversión análogo digital para digitalizar las señales mencionadas anteriormente. Los objetivos específicos que con esto se pretende cumplir son los siguientes:

- Convertir los datos analógicos a datos digitales a una frecuencia de muestreo determinada por un programa en C, utilizando dos canales de ADC del Microcontrolador (ch. 0 - 1)
- Programar los generadores de funciones AD7008, usando sus cuatro salidas digitales

La frecuencia de nuestras señales es de $f_0 = 100$ Hz por lo que $T_0 = 0.01$ s. Al muestrear a $f = 3200$ Hz, $T = 0.3125$ ms, cada período de nuestras señales T_0 incluye entonces ($N = T_0 / T = 32$) muestras para cada período completo. Claro que entre mayor sea la frecuencia de muestreo mejor resolución existirá para el cálculo de la

diferencia de fase, y óptimamente tendríamos 360 muestras para cada período con una resolución de 1 grado, pero en ese caso se requeriría una frecuencia de muestreo de 72 kHz.

Para el muestreo se toma 64 muestras en total, 32 por canal. El tiempo de adquisición junto con el tiempo de conversión del ADC suman $27.275 \mu\text{s}$, en donde el periodo total de la señal es de 10 ms, el tiempo total de muestreo es 1.7456 ms, y por lo tanto el período de la señal menos el tiempo de muestreo total es de 8.2544 ms.

Se requieren 32 periodos de muestreo digital, por lo tanto $8.2544 \text{ ms}/32$, $m=257.95 \mu\text{s}$. Sin embargo, para obtener una señal con frecuencia de 100 Hz, en 32 muestras, la frecuencia de muestreo debe ser 3.2 KHz, y el tiempo de una muestra es de $312.50 \mu\text{s}$ (periodo digital). La frecuencia de muestreo en el PIC se controla usando un tiempo de espera en los ciclos de muestreo, durante este tiempo se puede realizar algunas otras tareas del PIC como guardar datos, o hacer algún otro procesamiento. La programación del PIC fue realizada en lenguaje C, y luego se compila al lenguaje de maquina usando el compilador cruzado C del PIC referenciado en el manual PCB, PCM, and PCW PIC C Compiler *Reference Manual*.

Finalmente, se trata de tener un periodo completo de señal con frecuencia de 100 Hz, la frecuencia de las señales de salida del espectrómetro de impedancias, con 32 muestras.

Rutina que realiza el PIC16C773

1. Recibe 8 palabras hexadecimales de la PC para programar las frecuencias de las señales de los generadores de funciones AD7008 a través del puerto serial.
2. Manda señales a los generadores de frecuencia AD7008, en el orden de su protocolo de programación explicado en detalle anteriormente.
3. Muestrea las señales por los canales A0, y A1, y las convierte a señales digitales por el convertidor analógico digital (ADC) propio.
4. Guarda en memoria datos de cada muestra, de los dos canales de una sola frecuencia de medición.
5. Manda el conjunto de datos mencionados vía serial a la PC.
6. Espera los datos de la siguiente frecuencia
7. Se repite el proceso para las 25 frecuencias seleccionadas del espectro.

Descripción del módulo de periféricos

El sistema de periféricos permite comunicar al espectrómetro de impedancia con sus terminales, en este caso el paciente, la fuente de poder y el sistema de Interfase PC-Espectrómetro. Este módulo consiste de lo siguiente:

- Transformador de AC-DC (110 Vac a 12 Vdc) y su cable de extensión.
- Sonda de cuatro electrodos blindada.
- Interfaz entre la PC y el sistema del PIC con el puerto serial RS-232, y luego la conexión entre el espectrómetro de impedancia y el sistema de adquisición analógica digital y control digital (sistema del PIC). Cables: SData 1, SData 2, Load, SClock, (conecta las salidas digitales del PIC a las entradas de los generadores de funciones AD7008 para programar las frecuencias), entrada de señal de información del tejido, entrada de información de la impedancia de referencia y tierra.

3.3.4. Descripción del módulo de Aislamiento

El sistema de aislamiento fue hecho para aislar el paciente y el espectrómetro de impedancia juntos de la computadora y las fuentes de alimentación como en la figura 3.24.

El sistema de aislamiento esta dividida en dos tipos:

1. Aislamiento digital, donde se aísla la PC del resto del Espectrómetro de Impedancia; Aislando las conexiones del puerto serial.
2. Aislamiento Analógico, donde se aísla el prototipo de las unidades de fuentes de alimentaciones.

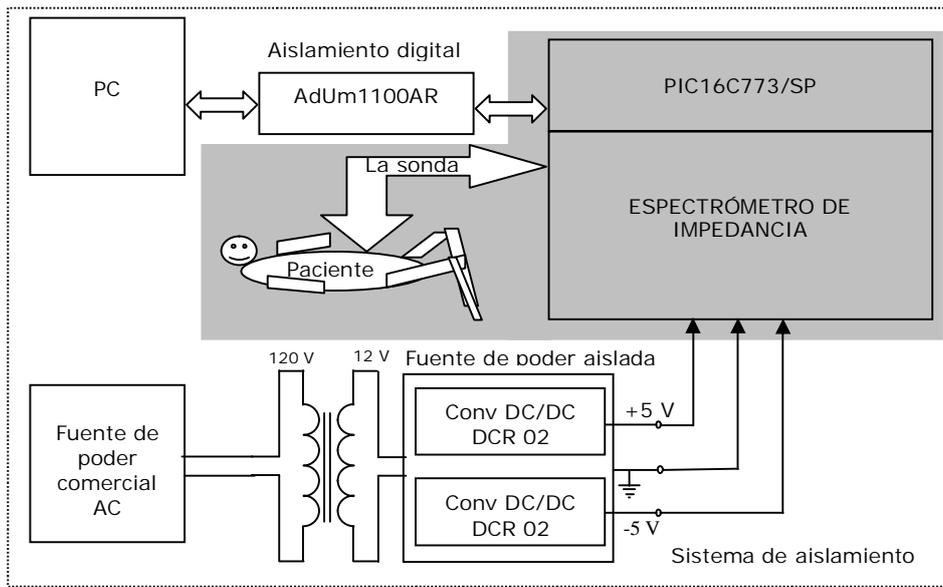


Figura 3.24. esquema del sistema de Aislamiento del espectrómetro de impedancia, Aislamiento Digital de la PC y el prototipo, y fuente de poder con voltajes de salidas aisladas que polarizan los componentes del instrumento. Espectrómetro y Paciente son los partes aislados del sistema (color gris).

Para el aislamiento Digital se usa el CI ADUM1100AR optoacoplador digital de alta velocidad, figura 3.25.

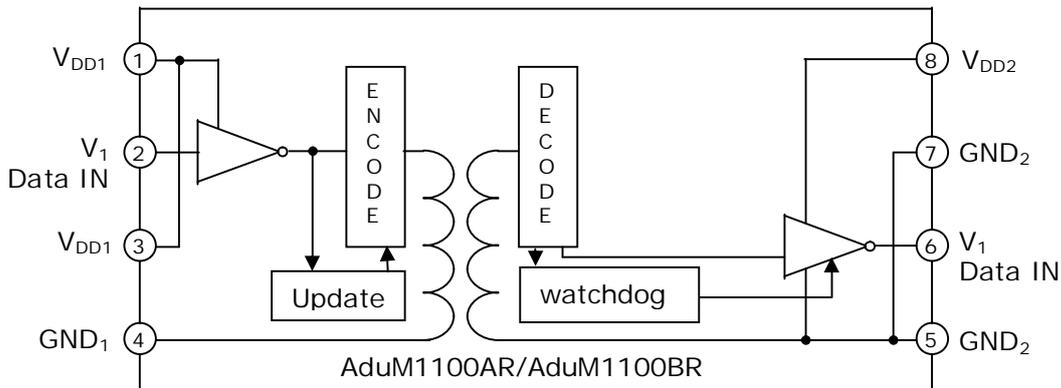


Figura 3.25. esquema del chip Aislador Digital se usa ADuM1100AR de alta velocidad

Los optoacopladores AduM1100AR y AduM1100BR están basados en la tecnología de acoplamiento de Analog Devices. Acompañando la alta velocidad de CMOS y la tecnología de transformación de centro de aire monolítico, estos componentes de aislamiento presentan características de funcionamiento superior a los instrumentos de optoacopladores alternativos.

Configurada como pin- compatible los optoacopladores de altas velocidades AduM1100 AR soportan transformación de datos altos de 25 Mbps.

AduM1100 AR opera con voltaje de alimentación de 3.3 V a 5 V, con retraso de propagación <18 ns y asimetría < 2 ns (operando con 5V). Se opera con potencia muy baja, menos de 0.9 mA de corriente constante (suma de dos lados), y a corriente dinámica mínima de 160 μ A por Mbps de tasa de Datos Transferidos.

Convertidores DC/ DC de 1W regulada, y Aislada

Para el aislamiento analógico se usan los Convertidores DC/ DC regulados DCR01 Aislador digital de alta velocidad, figura 3.26.

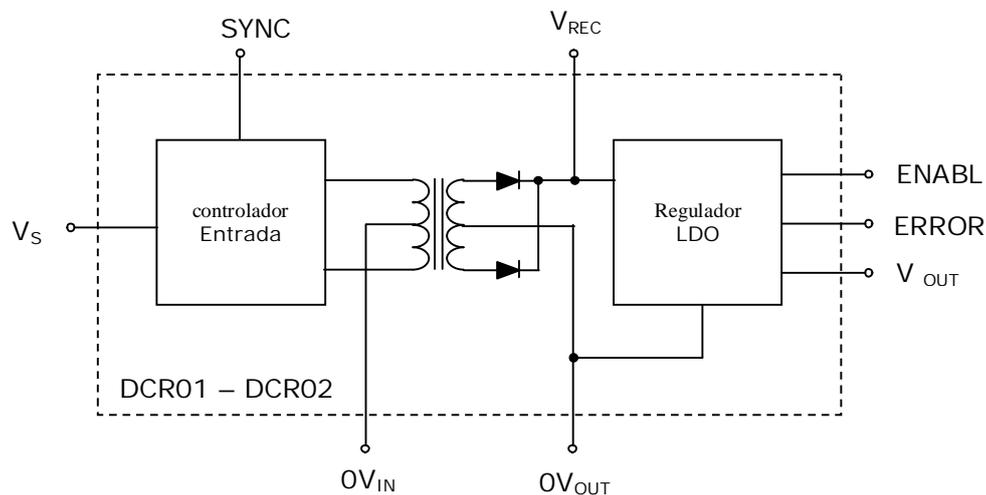


Figura 3.26. esquema del chip Para el aislamiento Análogo se usan los Convertidores DC/ DC regulada DCR01 Aislador digital de alta velocidad

Descripción

Las DCR01 y DCR02 son de una serie de convertidores DC/ DC con alta eficiencia y salidas aisladas y reguladas. Adicionalmente con capacidades de energía de salidas aisladas galvánicamente (galvanically isolated) y con potencias nominales de 1 W y 2 W respectivamente. Este rango de DC/ DCs ofrece salida con ruido muy bajo, protección termal, y alta precisión. Generalmente se usa para las siguientes aplicaciones:

- conversiones de energía
- energía de interfaz digital
- reducción de ruido y fuente de alimentación
- sincronizador de equipo a equipo
- aislador de 1000 Vrms
- Protección a corto circuito

El sistema de interfase PC- PIC incluyendo el sistema de aislamiento esta presentada en la figura 3.27.

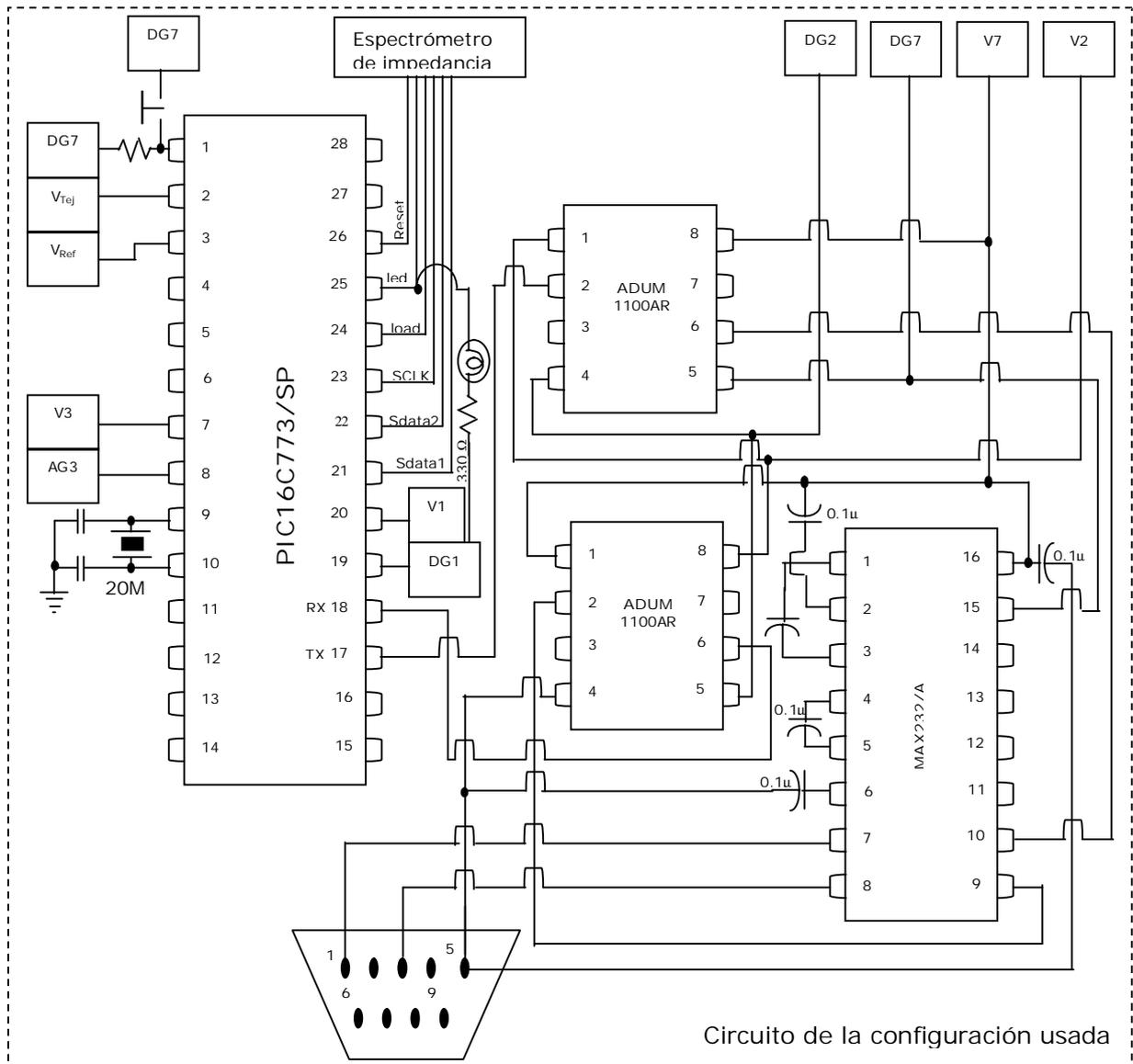


Figura 3.27. esquema del Diagrama de interfase PC- PIC incluyendo el sistema de aislamiento digital del espectrómetro de impedancias, usando los aisladores digitales de alta velocidades AduM100AR. V1, V2, V3, y V7 son voltajes de 5V de fuentes de poder aislada con sus tierras DG1, DG2, DG3, y DG7 correspondientes, para alimentar las partes digitales y Análogas del circuito [elaborado por Jazmín Aguado, INOVAMEDICA S.A. DE C.V.].

3.3.5. Resumen del modelo electrónico del espectrómetro y las ecuaciones matemáticas de la diferentes etapas[44]

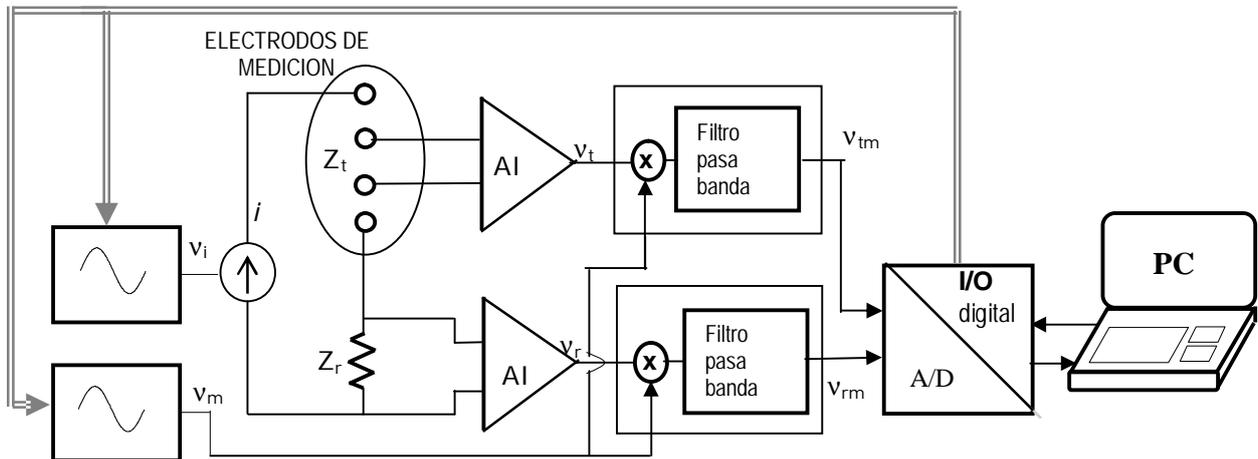


Figura 3.28. Diagrama de bloques para el sistema de medición de impedancia compleja usando un puente de desmodulación síncrona. El sistema programa a dos generadores de funciones para generar unas señales senoidales sincronizadas a frecuencias en el rango de interés pero con una diferencia en frecuencia fija de 100Hz. La primera señal \$v_i\$ se utiliza para generar una corriente de excitación. Esta corriente produce los potenciales \$v_t\$ en el tejido y \$v_r\$ en una impedancia conocida de referencia. Estos potenciales son medidos con amplificadores de instrumentación (AI) y desmodulados por la segunda señal senoidal \$v_m\$. Las señales desmoduladas del tejido y de la referencia guardan la información de amplitud y fase a la frecuencia original pero han sido trasladadas a una frecuencia baja fija de 100Hz que permite su fácil digitalización y captura. La PC reconstruye los espectros de amplitud y fase con base en las señales capturadas.

Desarrollo matemático:

$$v_i = V_i \cos \omega_t t.$$

señal que controla la corriente

$$v_m = V_m \cos \omega_m t.$$

señal demoduladora

$$Z_c = Z_{cr} + i Z_{cim}.$$

impedancia del tejido y sus componentes real e imaginaria

$$Z_c = Z_c \angle \theta$$

impedancia del tejido y sus componentes de amplitud y fase

$$Z_c = (Z_{cr}^2 + Z_{cim}^2)^{1/2}$$

$$i = I \cos \omega_c t$$

corriente en el sistema

$$v_t = A_c (I Z_t \angle \theta) = V_t \cos (\omega_t t + \theta)$$

voltaje generado en el tejido amplificado

$$v_r = A_r (I_c Z_r \angle \theta) = V_r \cos (\omega_t t)$$

voltaje generado en la referencia amplificado

$$v_{Atm} = v_t v_m = V_t E_m [\cos (\omega_t t + \theta) \cos \omega_m t] \text{ salida del primer multiplicador}$$

$$v_{Atm} = V_{Atm} \{ \frac{1}{2} [\cos (\omega_t + \omega_m) t + \theta] + \cos ((\omega_t - \omega_m) t + \theta) \}$$

$$v_{Arm} = v_r E_m$$

$$v_{Arm} = V_r E_m \cos \omega_t t \cos \omega_m t$$

salida del segundo multiplicador

$$v_{rm} = V_{rm} \{ \frac{1}{2} [\cos (\omega_t + \omega_m) t + \cos (\omega_t - \omega_m) t] \}$$

$$\omega_{IF} = \omega_t - \omega_m$$

frecuencia del filtro pasa-banda

$$v_{im}(t) = V_t ((\omega_t - \omega_m)t + \theta)$$

$$v_{im}(t) = V_t \cos(\omega_{IF} t + \theta)$$

señal de información del tejido

$$v_{rm}(t) = V_{rm} \cos(\omega_t - \omega_m)t = V_{rm} \cos(\omega_{IF} t)$$

señal de información de la referencia

$$v_{im}[n] = E_{ACm} \cos(\omega_{IF} nT + \theta[n])$$

discreta

señal de información del tejido

$$v_{rm}[n] = E_{Arm} \cos(\omega_{IF} nT)$$

discreta

señal de información de referencia

$$\text{con } \omega = \omega_{IF} T,$$

$$v_{im}[n + N] = E_{ACm} \cos(\omega n + \omega N + \theta[n])$$

$$v_{rm}[n + N] = E_{Arm} \cos(\omega n + \omega N)$$

y como $\omega N = 2\pi$, entonces

$$v_{im}[n] = E_{ACm} \cos(\omega n + \theta[n])$$

$$v_{rm}[n] = E_{Arm} \cos(\omega n)$$

$$T_o = NT$$

relación entre el período análogo y el período de muestreo

$$\omega N = 2\pi$$

$$\theta[n] = k T$$

fase como un atraso de k muestras

$$\theta = (K/N) * 2\pi \text{ radianes. fase en radianes}$$

$$Z_c = E_{ACm} / E_{Arm} Z_r$$

amplitud de impedancia del tejido calculada a partir de los valores pico E_{ACm} y E_{Arm} .

3.3.6. Calibración del sistema

En este capítulo se describe la calibración experimental del espectrómetro de impedancia desarrollado en esta tesis. Se describen a continuación la calibración del *hardware* y la calibración por medio de *software* del sistema. La calibración de hardware se realiza para que los componentes trabajen en sus rangos dinámicos óptimos y cumplan los criterios de uso en el sistema. La calibración por *software* se realiza para referir la salidas del sistema a sus valores teóricos y corregir los errores inherentes al hardware. A continuación se describen con más detalle.

3.3.6.1. Calibración del *hardware* del espectrómetro de impedancia.

En este capítulo se describe la calibración experimental del espectrómetro de impedancia desarrollado en esta tesis. A continuación se describen los diferentes puntos esenciales a calibrar:

- La fuente de corriente
- Las ganancias de los amplificadores de instrumentación
- Los multiplicadores
- La frecuencia de corte de los filtros pasabanda
- La ganancia de los amplificadores de salida para los dos canales, de señal del tejido y de referencia.

Equipo utilizado:

- Osciloscopio
- Generador de funciones
- Tablilla de experimentación (*protoboard*)
- Multímetro
- Espectrómetro de impedancia
- Computadora personal.

Material empleado:

- resistencias de: 3.3, 10,33, 47, 82, 100, 120, 150, 180,220,y 270 Ω .
- capacitores de: 10 pF, 0.01 μ F,0.1 μ F.....

3.3.6.2. Calibración la corriente de la fuente de corriente.

La calibración de la fuente se realiza para obtener un valor pico a pico de corriente de 5mA constante para diferentes frecuencias. Esta calibración se lleva a cabo utilizando el circuito en la figura 3.29. La frecuencia de la corriente se calibra a través del software, programando el generador de señales senoidales AD7008 en forma digital a través la entrada SDATA y la entrada de control SCLk, y LOAD del mismo chip AD7008. Las señales de salida del AD7008 tienen las frecuencias programadas y su amplitud de salida es de 1Vp.p. Esta señal pasa en el modulo de control de la amplitud de corriente usando un AD600 en donde se calibra la ganancia de este amplificador con un voltaje de control, el cual puede ser generado por el PIC o por hardware usando un amplificador operacional con un arreglo de resistencias en su entrada para seleccionar diferentes voltajes de entrada relacionados con la corriente deseada, y un potenciómetro en el circuito de retroalimentación para calibrar su

ganancia con el propósito de tener un voltaje de salida variable dentro del rango (± 0.625 V) de los límites del voltaje de control en la entrada C1HI correspondiente a AD600, como en la figura 3.30.

En la figura 3.20. puede apreciarse claramente que el valor de voltaje en la salida del amplificador AD600 y el de la impedancia de entrada de la fuente de corriente R_i son los que determinan el valor de corriente de salida i_c . Se realizó el espectro de la corriente sobre el rango de frecuencias de interés.

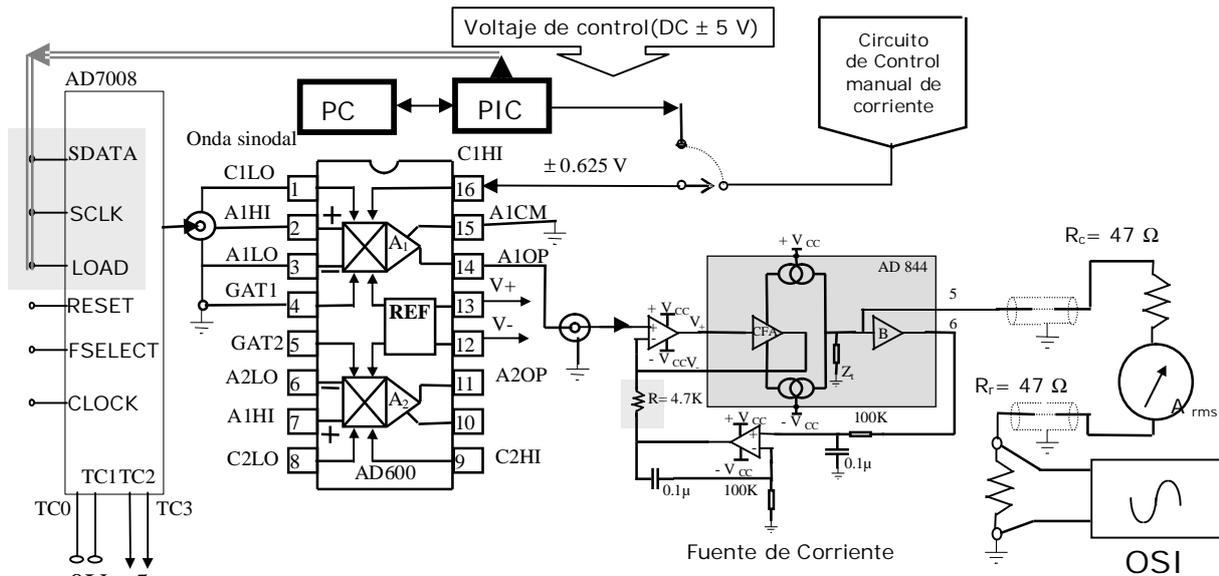


Figura 3.29. Diagrama de la fuente de corriente y su circuito de control. En ambos circuitos se utiliza el amplificador operacional TL084. En el primero se emplea como amplificador y control del voltaje de entrada dado por $= v_i * R_2/R_1$, el cual controla el voltaje de salida el v_e a través del potenciómetro R_2 , que a su vez controla la corriente de salida de la fuente de corriente i_c , en donde se usa el segundo amplificador. La relación está dada como $i_c = v_e / R_i$.

3.3.6.3. Calibración de ganancia para los amplificadores de instrumentación

Ambos amplificadores de instrumentaciones INA111 se calibraron para la misma ganancia usando el circuito mostrado en la figura 3.31, en donde se simula la carga del tejido mediante una impedancia resistiva de 47Ω y la impedancia de referencia en el otro canal mediante otra impedancia del mismo valor. La calibración consistió en lograr que los voltajes de salida de los dos amplificadores tuvieran la misma magnitud de 5V pico a pico con corriente de entrada máxima mediante el ajuste de los potenciómetros de ganancia de cada amplificador.

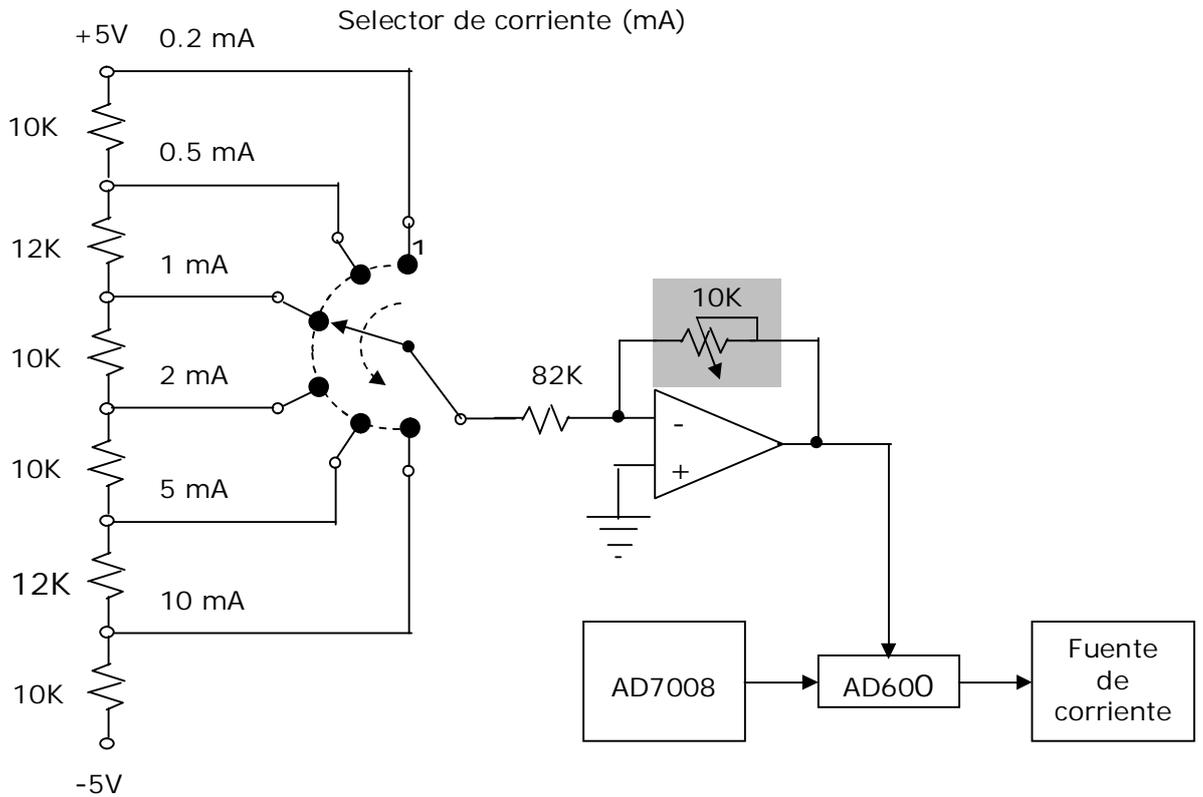


Figura 3.30. Control manual de ganancia del amplificador AD600; control de voltaje de la ganancia que no deberá exceder el nivel de ganancia máxima de + 0.625 V usando el potenciómetro en el circuito de retroalimentación del amplificador operacional cuando el selector de corriente esta en la opción 1 (máxima corriente).

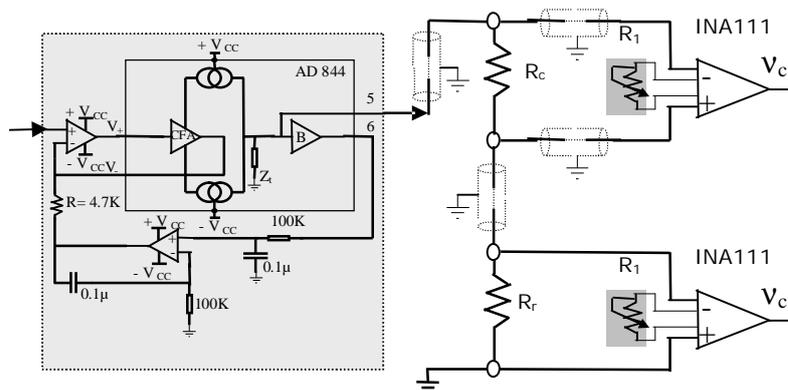


Figura 3.31. Control de ganancia de los amplificadores de instrumentación INA111 que amplifican el voltaje de carga del tejido R_c y de la carga de referencia R_r . Para su control se emplean los potenciómetros R_1 y R_2 que determinan los voltajes de salida v_c y v_r , calculados como $v_c = i_c R_c (50 \text{ k}\Omega / R_1 + 1)$ y $v_r = i_r R_r (50 \text{ k}\Omega / R_2 + 1)$.

3.3.6.4. Calibración Los multiplicadores

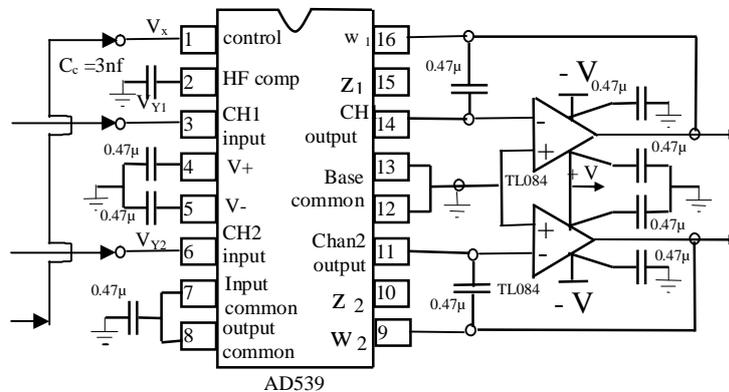


Figura 3.32. Diagrama detallado del circuito de calibración del multiplicador AD539 de doble canal. Los dos canales son idénticos siempre y cuando los amplificadores operacionales usados y los capacitores usados sean idénticos, y los voltajes de entradas, salidas y alimentaciones estén en los límites mencionados en el manual de características del AD539.

La figura 3.32 muestra las conexiones de un multiplicador con dos canales estándar usando amplificadores operacionales para proveer energía de salida útil y resistores de retroalimentación de AD539 para alcanzar un escalamiento preciso. La función de transferencia para cada canal es

$$V_w = -V_x V_y$$

La calibración de este multiplicador se basa en las calibraciones de niveles de voltajes de entradas y salidas y los voltajes de alimentación recomendados en el manual de características del chip AD539. "Las entradas tienen valores de escala nominales mayores $V_x = +3V$, $V_y = \pm 2V$ las salidas tendrán $\pm 6V$ de escala mayor; los voltajes de alimentación usualmente tienen de ser 2V más del pico de la salida; Entradas mayores son posibles si V_x y V_y están con sus valores máximos de $+3.2V$ y ± 4.2 respectivamente, el pico de la salida es $\pm 13.4V$, y este requiere que los amplificadores operacionales funcionan con alimentación de $\pm 15V$ ".

3.3.6.5. Calibración de los filtros pasabanda

Esta calibración se realizó para establecer la frecuencia de corte de los filtros a 100 Hz. Para ello se fijó un generador de funciones sinusoidal a esta frecuencia y se ajustó el potenciómetro R_r hasta que el valor de voltaje de salida del filtro sea máximo pico a pico. Para ello es mejor emplear el valor rms del voltímetro digital pues permite una mayor precisión en la comparación. Dicha técnica se empleó utilizando el módulo de generador de funciones del sistema en lugar de un generador de funciones comercial de forma en que produjera señales precisas de 100 Hz para esta calibración, como en la figura 3.33.

Para comprobar la calibración y el funcionamiento de los generadores AD7008 se colocó una carga resistiva en el sistema simulando la carga del tejido y se generaron dos señales, una corriente de carga y otra demoduladora, con una diferencia en frecuencia de 100 Hz entre ellas, como sucedería en el caso del correcto funcionamiento del sistema, y se revisaron los voltajes de salida de los filtros, que con esa diferencia de frecuencias tendrían que ser máximos, y menores a diferencias

mayores o menores (99 o 101 Hz, por ejemplo). La salida fue la esperada y se comprobó repitiendo el procedimiento para todas las frecuencias del espectro, siempre manteniendo entre estas dos señales la diferencia deseada.

Para obtener la respuesta en frecuencia real de los filtros, se utiliza un generador de funciones AD7008 para generar las señales de entrada a frecuencias con diferencias incrementales pequeñas y precisas de 1 Hz.

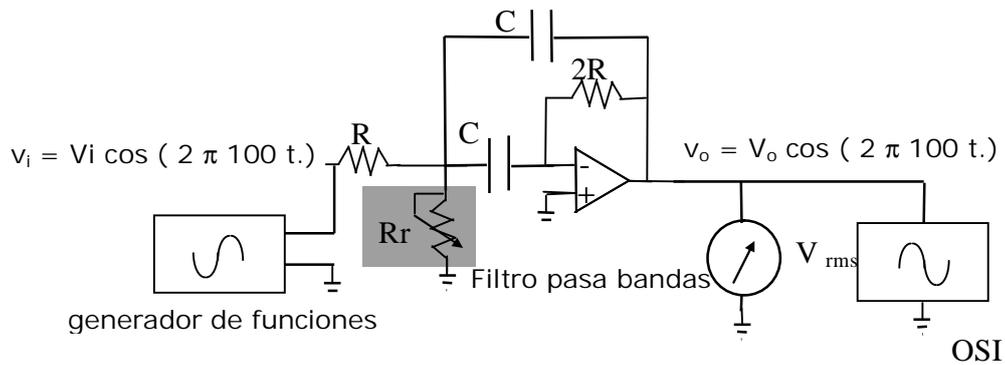


Figura 3.33. Filtros pasa banda. Se ajusta la frecuencia de corte usando el potenciómetro R_r . El criterio de calibración empleado es que cuando el voltaje V_o es máximo, la frecuencia central es la frecuencia de la señal de entrada. Los filtros en esta configuración de circuito tienen ganancia unitaria [41], por lo que $V_o = V_i$. En esta configuración los valores de R y C determinan el ancho de banda de los filtros y el potenciómetro R_r determina la frecuencia central.

3.3.6.6. Calibración de ganancia de los amplificadores de salida de ambos canales (señal del tejido y referencia)

El amplificador con ganancia controlada AD600 y los amplificadores operacionales constituyen la última etapa del instrumento, como puede apreciarse en la figura 3.34 el módulo de interfaz, y se encargan de entregar las señales al PIC en un rango dinámico de salida de 0 a 5V.

El criterio usado para su calibración supone que el valor de carga máxima proporcionada al sistema es de 100Ω y que corresponde a la mitad del rango dinámico (0 a 2.5 V). Esto permite una mayor flexibilidad del sistema en el caso de que existan cargas mayores en aplicaciones con animales. Cuando el tejido animal haya sido caracterizado, y en experimentos mas allá de los objetivos de esta tesis, se podrá ajustar el rango dinámico del instrumento al máximo real de impedancia encontrado en el tejido.

En esta etapa la calibración se realiza por medio de hardware, usando un amplificador operacional con un arreglo de resistencias en su entrada para seleccionar diferentes voltajes de entrada (relacionados con las diferentes ganancias de salida deseadas) y un potenciómetro en la retroalimentación para calibrar la ganancia, con el propósito de tener un voltaje de salida que varía dentro de los límites del voltaje de control en la entrada C1HI correspondiente de AD600 ($\pm 0.625 \text{ V}$), (figura 3.35).

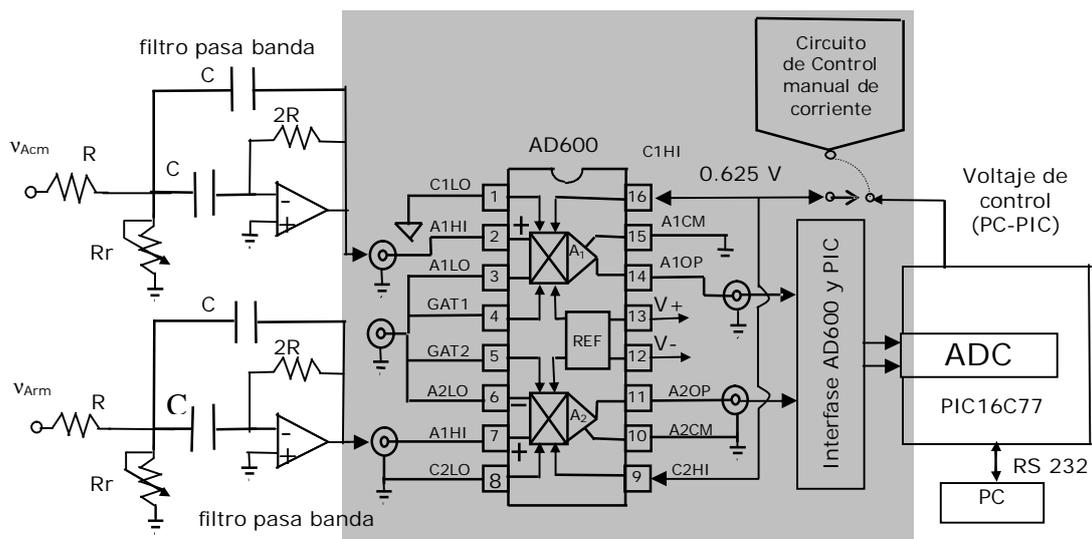
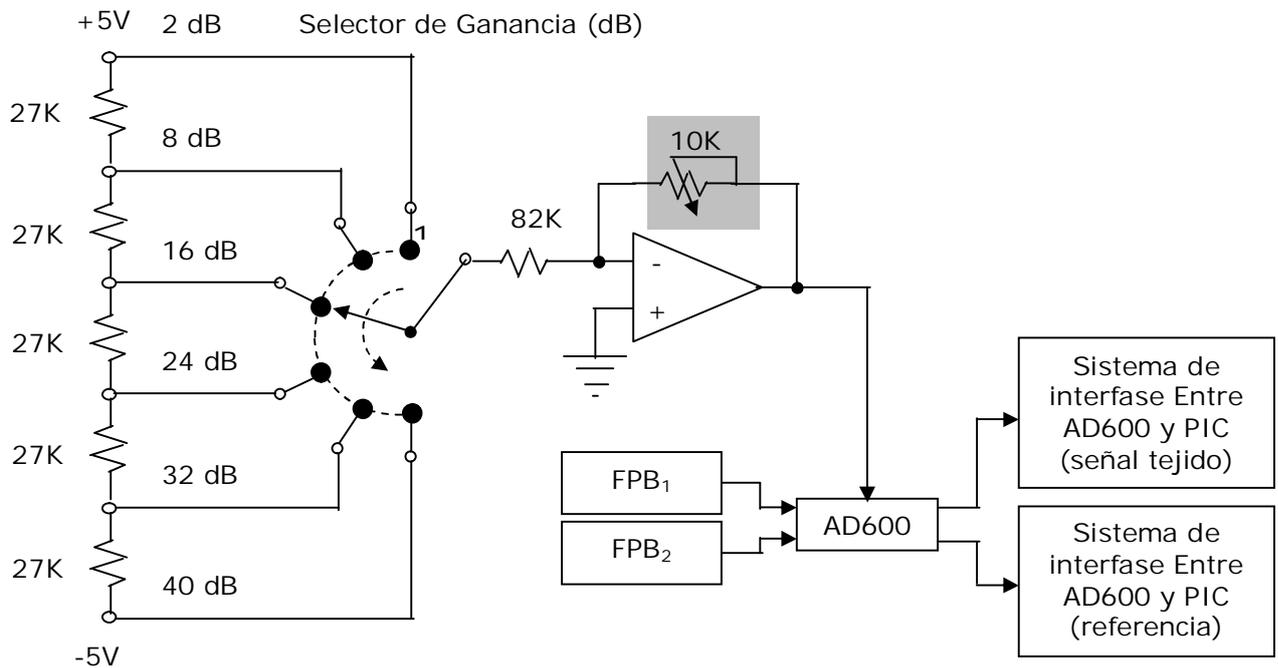
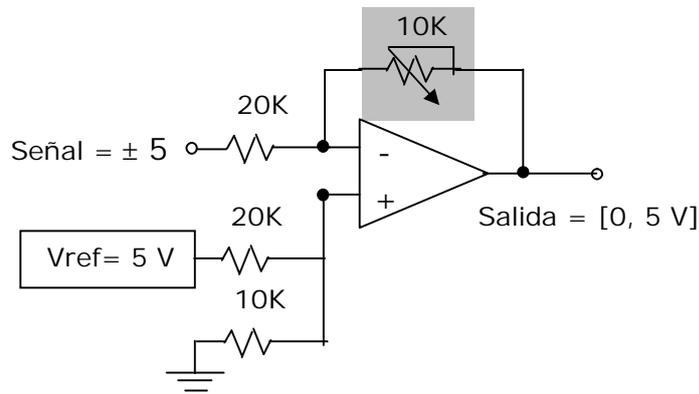


Figura 3.34. Funcionamiento del módulo de amplificadores de salida como acoplamiento entre el filtro pasa banda y el PIC. Actualmente la ganancia del amplificador AD600 se controla mediante un Circuito de Control manual, y el circuito de interfase con el PIC para cambiar los voltajes en su salida al rango dinámico de voltajes en el que opera el convertidor analógico/digital del PIC16C773.



a) Circuito de Control manual de Ganancia para el amplificador AD600 y selector de ganancia del espectrómetro de impedancia



b) Sistema de interfase Entre AD600 y PIC, para un solo canal usando un Amplificador Operacional

Figura 3.35. a) diagrama del Funcionamiento del módulo de amplificadores de salida como acoplamiento entre el instrumento y el PIC, y control de ganancia del instrumento. Las ganancias de salida de los filtros se controlan mediante un amplificador AD600 con Circuito de Control manual de ganancia. b) Circuito de interfaz entre el amplificador AD600 y el convertidor analógico / digital del PIC16C773 que convierte el voltaje de ± 5 V a Voltaje de 0 a 5V, con ganancia ajustable usando el potenciómetro en la retroalimentación.

3.3.7. Diseño del *software* del espectrómetro de impedancia.

El software del espectrómetro de impedancia se encarga del control y administra las tareas y datos del instrumento. Para ello se han utilizado dos lenguajes de programación, *C* y *Visual Basic 6*. Específicamente, esta paquetería se encarga de las siguientes tareas:

- Programa los generadores de funciones basados en el AD7008 para generar señales a frecuencias determinadas, manejando las compuertas de salida digitales del PIC16C773/SP empleadas para control y adquisición de datos en el sistema.
- Convierte las señales analógicas de salida correspondientes al tejido y la referencia a señales digitales.
- Genera archivos de datos que contienen las señales que corresponden a cada frecuencia del espectro.
- Almacena estos archivos en el disco duro de la computadora. Todas estas tareas se realizan en Turbo C.
- Calcula las amplitudes y fases para cada archivo correspondientes a cada frecuencia del espectro en Matlab. Estas se almacenan en un nuevo archivo con nombre semejante a sus archivos fuente.
- Maneja la interfaz con el usuario.

Rutina que se realiza el PIC16C773

1. Recibe los datos de la PC para programar las frecuencias de las señales de las salidas de los generadores de funciones AD7008 a través del puerto serial.
2. Programa los generadores de frecuencia AD7008 de acuerdo a su protocolo de programación explicado en detalles anteriormente.
3. Muestra la señales por los canales A0 y A1, programando las amplitudes y las convierte a señales digitales a través de su Convertidor Análogo / digital (DAC).
4. Guarda en memoria los datos de los dos canales muestreados por cada frecuencia.
5. Manda el conjunto de datos mencionados vía puerto serial a la PC.
6. Espera los datos de la siguiente frecuencia
7. Se repite el proceso para las 25 frecuencias selectas del espectro.

3.3.7.1. Medición de impedancias

La medición de impedancias se realiza en forma simple y continua para cada espectro. El usuario inicia la adquisición del espectro en el tiempo tecleando el botón indicado en la pantalla de interfase con el usuario. Automáticamente y en forma continua el sistema inicializa las frecuencias y programa al espectrómetro para cada una de estas frecuencias. La PC adquiere las señales de salida correspondientes y las guarda en archivos, graficando las señales de tejido y referencia correspondiente a la última frecuencia, el espectro de amplitud y fase resultante, y diagrama de Nyquist de los componentes reales e imaginarios del espectro de impedancia medido.

Algunos parámetros del sistema que pueden ser seleccionados por el usuario son:

- Las frecuencias de la señal de excitación empleadas para el espectro y que son inyectadas al tejido.
- Tipo de adquisición de espectro único o en forma continua.
- El periodo de tiempo entre espectros en forma continua.
- Los datos de los sujetos en cada archivo, que incluyen la identificación del sujeto y el experimento desarrollado.

Esta parte será detallada mas adelante bajo el título de Software para Procesamiento y Almacenamiento de Datos. El código del programa del PIC se realizó en lenguaje C, a través de un compilador cruzado llamado PICC, el cual corre sobre Sistema Operativo DOS y se vincula con el programa MPLAB, el cual está diseñado para programar los dispositivos MICROCHIP a través del PICSTART PLUS, para controlar la operación del PIC.

3.3.7.2. Calculo de la impedancia compleja[44]

En nuestro prototipo la impedancia compleja se separa en componentes de amplitud y fase, las cuales posteriormente se transforman en parte real e imaginaria según las necesidades del análisis.

3.3.7.2.1. Cálculo de amplitud

La amplitud se calcula mediante la obtención de los valores máximos y mínimos de las señales de voltaje del tejido y de referencia. Para cada señal del espectro se separan las señales del tejido y la referencia y posteriormente se determinan los máximos y mínimos que se encuentran en un período de muestreo. Las proporciones entre los valores calculados de los valores máximos y mínimos de la señal del tejido y la señal de referencia se multiplican por el valor de la impedancia de referencia para obtener la amplitud de la impedancia del tejido.

3.3.7.2.2. Cálculo de fase por medio de la correlación

Se calcula la diferencia de fase entre la señal del tejido y la de referencia. Se aplica la *correlación cruzada* utilizando como entradas ambas señales y el índice de correlación máximo determina el desfaseamiento entre ellas, asumiendo que el período de ambas señales es el mismo. La diferencia entre el índice de correlación central y el máximo corresponde a un valor de fase K entre las dos señales. Si el período es N, entonces la diferencia de fase en radianes está dada por $(K / N) * 2\pi$ y en grados por $(K / N) * 360$. El desarrollo matemático se describió en detalle en el capítulo 3.2.5.

3.3.8. Descripción del módulo de electrodos

El módulo de electrodos se considera un módulo aparte del espectrómetro de impedancia puesto que debe poderse introducir en el área en la que se encuentra el tejido medido. Su función principal es entregar la corriente de salida a la muestra bajo estudio y detectar el voltaje que a su vez se genera. El módulo se compone de cuatro electrodos con forma de anillo. Dos de ellos inyectan la corriente de salida al tejido. Se encuentran conectados directamente a la salida de corriente del espectro a través cables blindados (ver figura 3.3). El otro par de electrodos entrega el potencial obtenido a partir del tejido al espectrómetro a través de los cables blindados para su amplificación y procesamiento. Hay que recalcar que en este proyecto se emplea un sistema de cuatro electrodos de anillo, mientras que otros investigadores han utilizado otros electrodos, dependiendo de la aplicación.

Para el presente proyecto se realizaron sondas prototipo con cuatro electrodos de anillo de plata con las siguientes propiedades: los anillos fueron hechos de plata anillados en maquina y armados sobre un tubo plástico de uso clínico tipo TYGON, soldados a las conexiones del sistema [53]. Se hicieron sondas con dos tamaños y distancias; sonda tipo A, y B.

La sonda A:

En la figura 3.36 se muestran los detalles de los electrodos usados en la sonda, con sus medidas en unidades de milímetros (mm), y armando la sonda usando cuatro de estos electrodos, separados por segmentos de plástico de sonda de (1.5mm) de longitud, y con 2 mm de distancia entre electrodos.

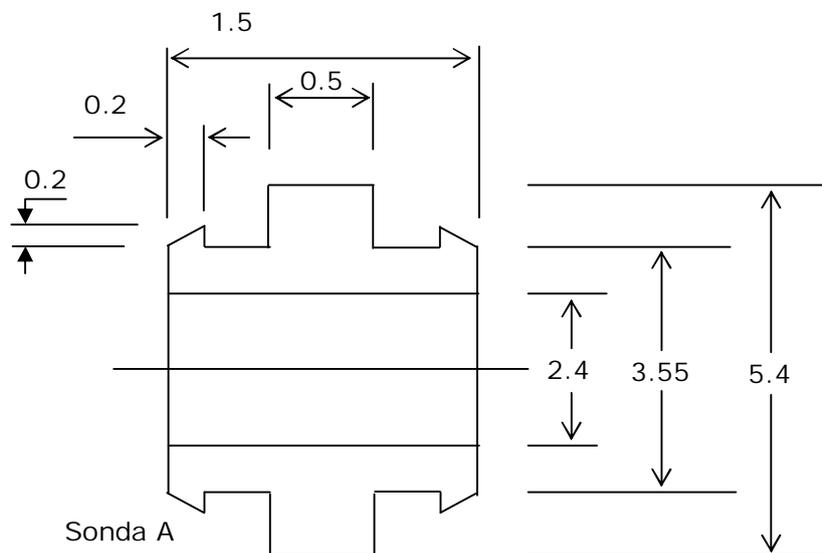


Figura 3.36. esquema que muestra el diseño del electrodo usado para la construcción de la primera sonda. Cada sonda consiste de cuatro electrodos y esta diseñada para el uso en animales (sonda tipo A).

La sonda B:

En la figura 3.37 se muestran los detalles de los electrodos usados en la sonda, con sus medidas en unidades de milímetros (mm), y armando la sonda usando cuatro de estos electrodos, separados por segmentos de plástico de sonda de (4mm) de longitud, y con 4.75 mm de distancia entre electrodos.

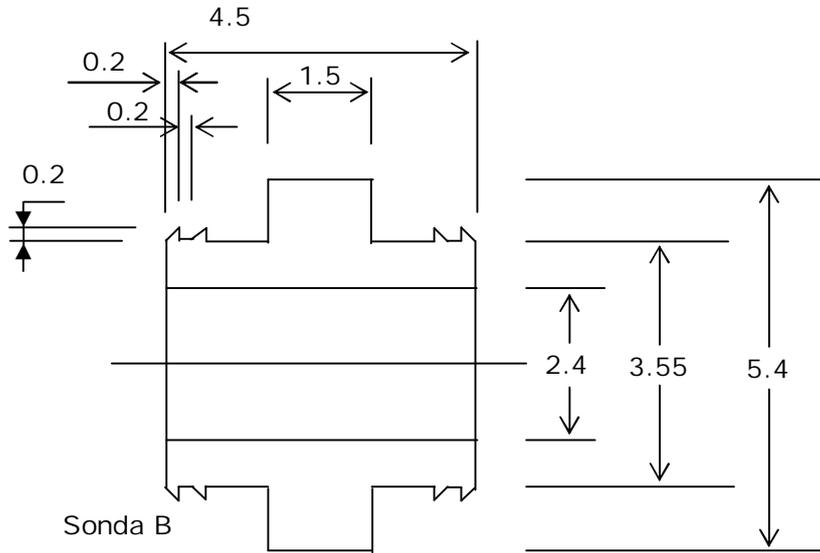


Figura 3.37. esquema que muestra el diseño del electrodo usado para la construcción de la segunda sonda. Cada sonda consiste de cuatro electrodos y esta diseñada para el uso en animales (sonda tipo B).

Esta generación de los dos tipos de sondas fueron usados en el proceso de evaluación y caracterización del funcionamiento del espectrómetro de impedancia en el uso animal y sus resultados se presentan en esta tesis.

Diagrama que muestra el módulo de sonda de cuatro electrodos cuales están conectados con el espectrómetro de impedancia a través cables blindados esta mostrado en al figura 3.38. Diagrama que muestra las etapas de armar los cuatro electrodos en este generación de sondas esta presentado en la Figura 3.39.

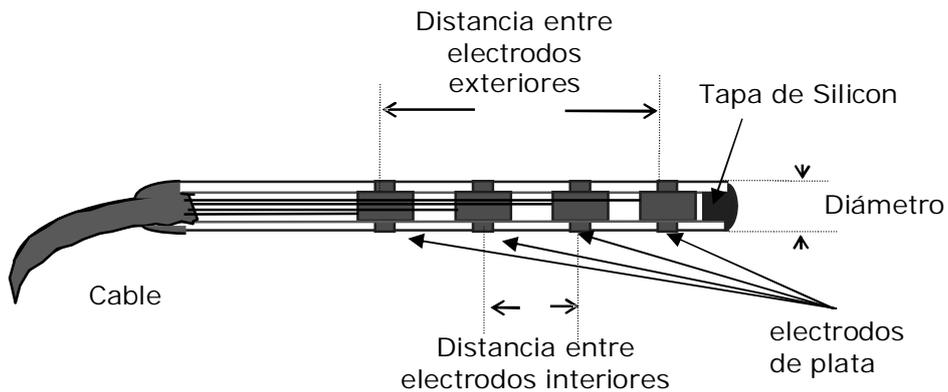


Figura 3.38. Diagrama que muestra la sonda.

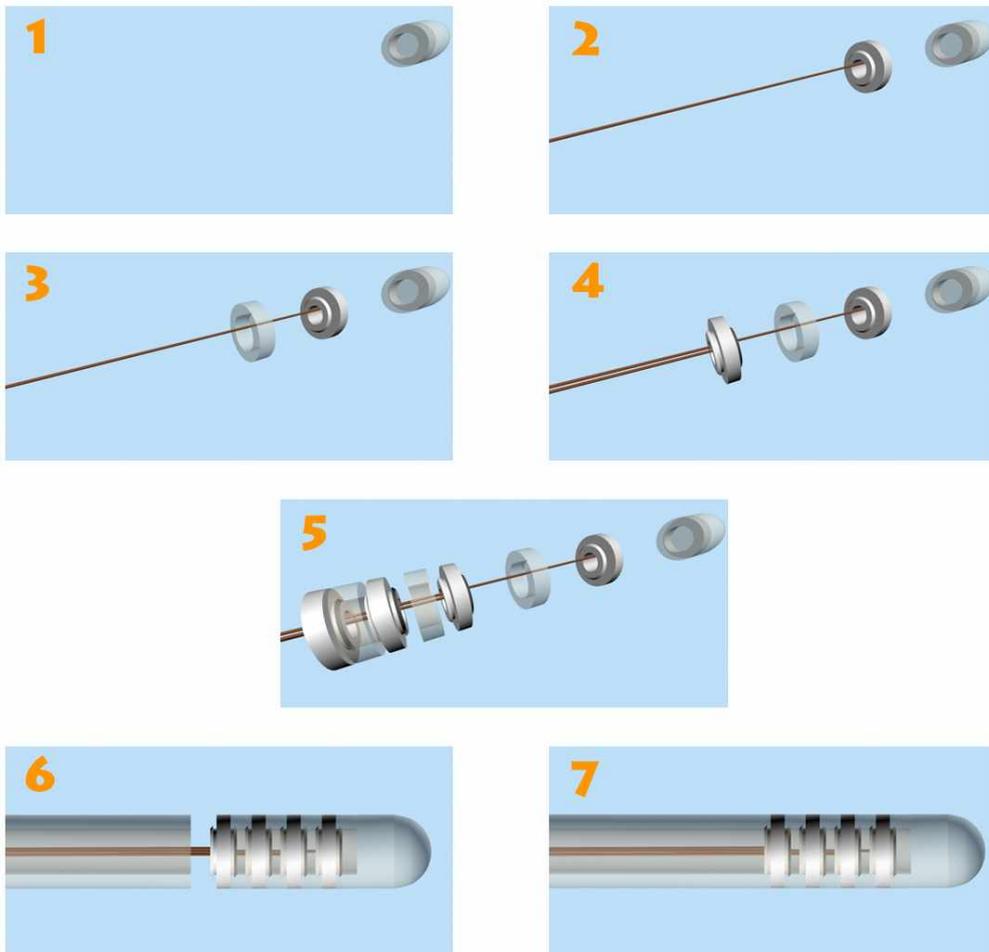


Figura 3.39. Diagrama que muestra las etapas de armar los cuatro electrodos en esta generación de sondas [elaborado por INOVAMEDICA S.A. DE C.V.].

Es necesario indicar que se depositó una capa de cloruro de plata (AgCl) sobre los electrodos de algunas de las sondas en cada caso. Se espera que los diferentes resultados debido a las diferentes propiedades de las sondas permitan determinar el mejor diseño para éstas. La deposición fue realizada sumergiendo los electrodos de la sonda en ácido clorhídrico (HCl) a una concentración de 1 a 10 y aplicando un voltaje de 3 V. El proceso terminaba cuando la corriente medida llegaba a 0.1 mA, después de aproximadamente 30 segundos [9]. Este proceso de catodizado se repitió para algunas sondas y se muestra en la figura 3.40.

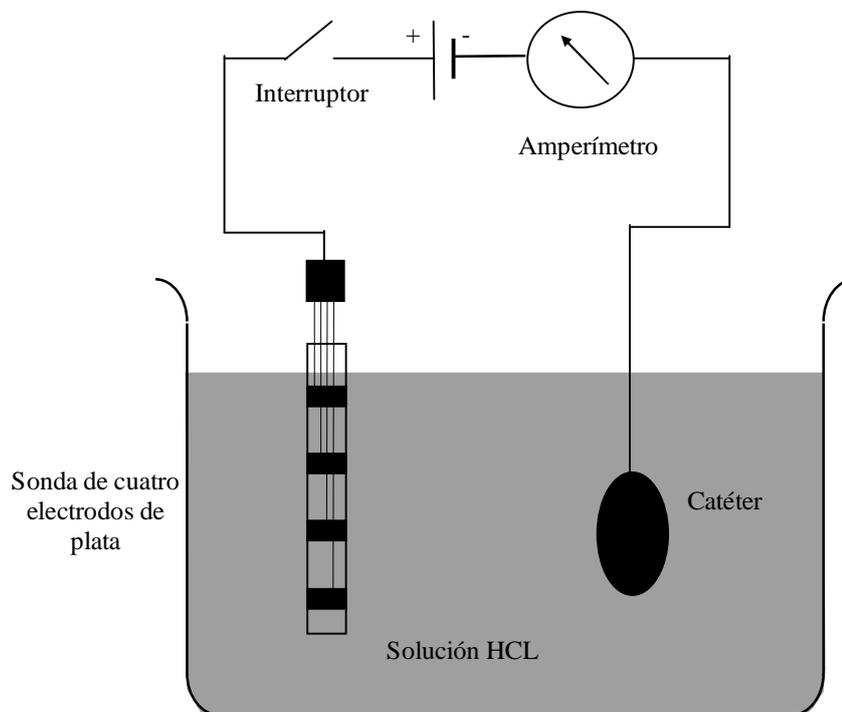


Figura 3.40. Diagrama del sistema usada para depositar una capa de AgCl sobre la superficie de los cuatro electrodos de plata de la sonda intestinal.

3.3.9 Módulo de Interfaz de Comunicación y Adquisición

Modelo de Caja Negra

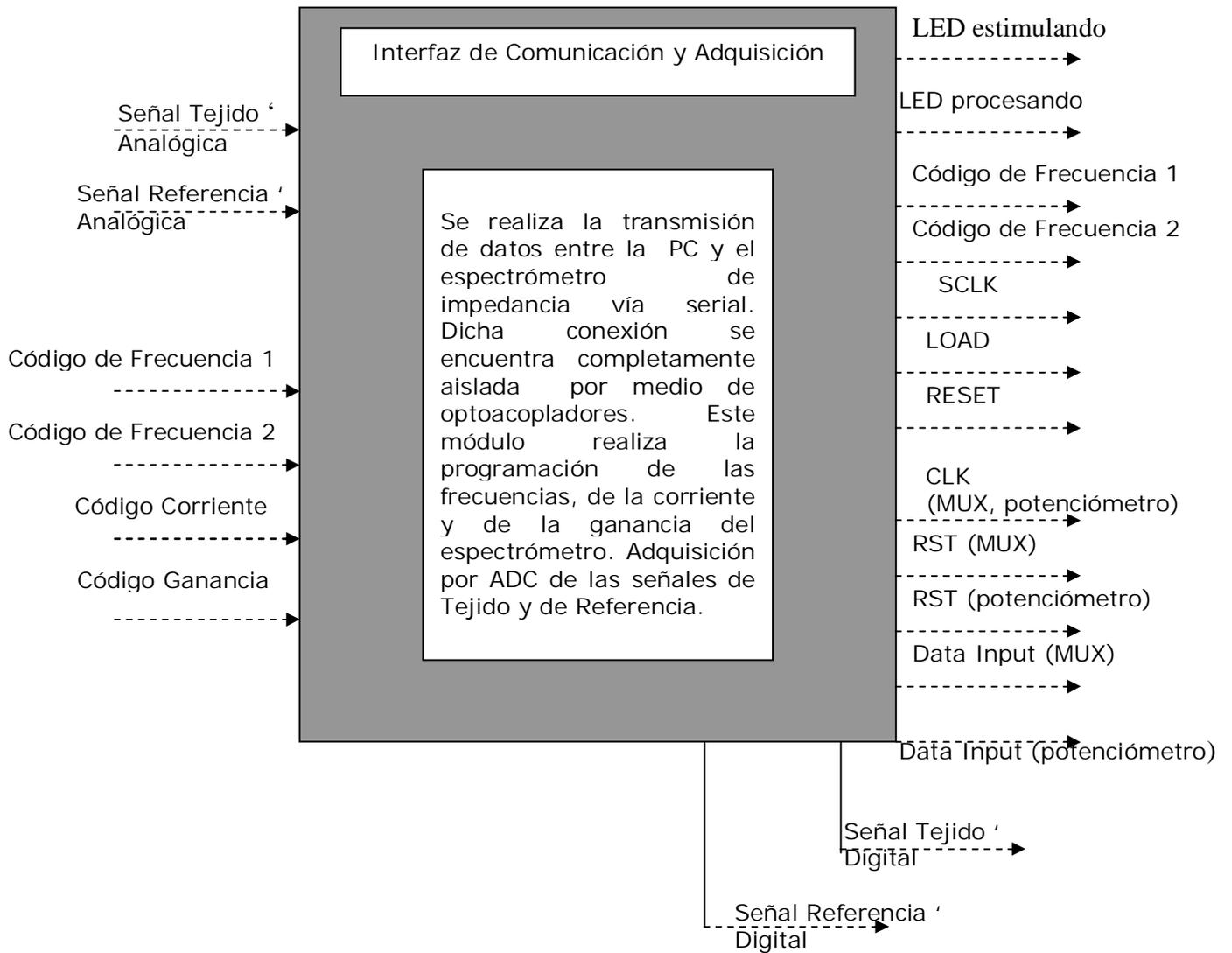


Figura 3.41. esquema del Módulo de Interfaz de Comunicación y Adquisición como caja negra [elaborado por Jazmín Aguado, INOVAMEDICA S.A. DE C.V.].

Modelo de Estructura Funcional

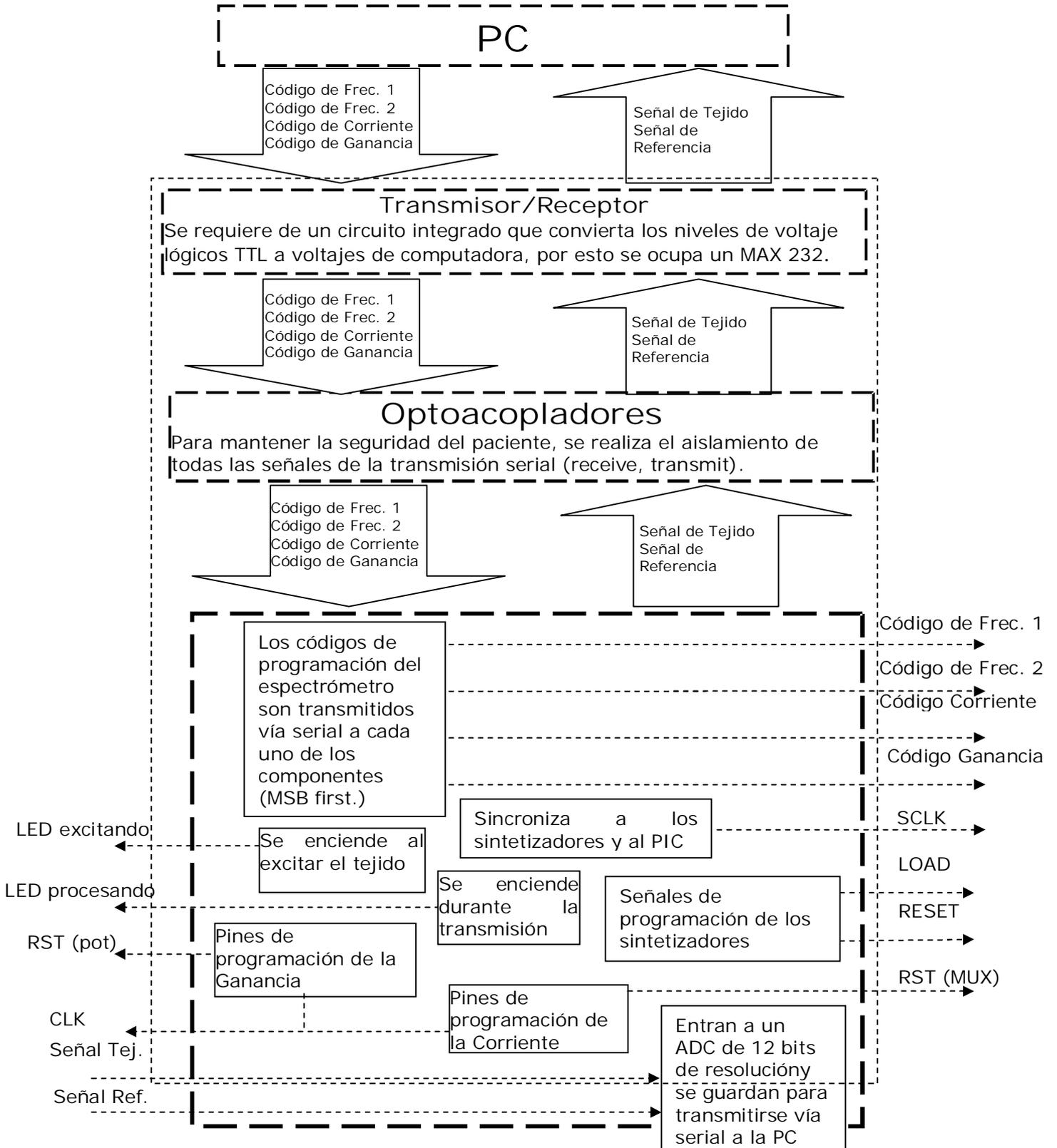


Figura 3.42. esquema de bloques de la Estructura Funcional

Descripción del módulo Interfaz de Adquisición, programación y comunicación.

El módulo de adquisición, programación y comunicación está compuesto principalmente por un microcontrolador microchip modelo PIC16C773SP. La transmisión serial se realiza a través del USART del microcontrolador, es decir, un protocolo serial RX/TX. Los datos seriales se aíslan a través de optoacopladores ADUM1100AR de Analog Devices. Los optoacopladores transmiten la señal al convertidor de voltaje MAX232ECPE, el cual tiene conexión directa con el puerto serial de la PC. La PC envía los datos de frecuencia, corriente y ganancia al microcontrolador, éste programa los dispositivos correspondientes serialmente, y adquiere las señales de referencia y de tejido. La adquisición analógica se lleva a cabo en dos canales del A/D (AN0 y AN1). El A/D es un convertidor de 12 bits de resolución. El voltaje de la señal a adquirir debe ir de 0 a +5 volts, y se programa la frecuencia de muestreo a 3.2KHz, con lo cual se obtienen 32 datos en un ciclo de señal de 100 Hz por cada señal. Además el microcontrolador cuenta con LEDs que indican el estado en el que se encuentra el dispositivo. Emite una luz amarilla cuando el dispositivo está estimulando el tejido, y una luz verde para indicar que el microcontrolador está enviando datos a la PC.

Programa del PIC16C773

La programación del microcontrolador se realizó en C a través de un compilador cruzado llamado PICC, el cual corre sobre el programa MPLAB, el cual está diseñado para la programación de microcontroladores MICROCHIP. MPLAB corre sobre plataforma DOS, y programa los dispositivos a través del PICSTART PLUS (ver anexo I).

Antes de iniciar la programación, se requiere configurar el microcontrolador en cuanto a los registros que se van a utilizar, se configura el USART, el ADC, y los puertos. Además se llama a cualquier otro programa que se utilice en la ejecución.

3.3.10. Software para Procesamiento y Almacenamiento de Datos

3.3.10.1. Descripción General

La aplicación fue desarrollada en Visual Basic 6 Ed. Profesional, actualizado con el Service Pack 5; En el diseño de la Base de datos para el almacenamiento de las señales capturadas se utilizó Access 2000 por ser, como Visual Basic, una herramienta de Microsoft.

El programa tiene como objetivo controlar las operaciones del espectrómetro de impedancia tisular, procesar los datos adquiridos y desplegarlos gráficamente y representa la interfaz de usuario del prototipo.

Utilizando POO (Programación orientada a objetos), se diseñó la aplicación con una interfaz de usuario amigable. Por medio de transmisión serial, la PC transmite una palabra hexadecimal a un microcontrolador PIC16C773, el cual se encarga de programar los sintetizadores de señales; la PC recibe la señal de tejido y la señal de referencia, registradas por el espectrómetro de impedancia tisular, y las almacena en una tabla previamente generada. Se procesan ambas señales sinusoidales y se obtienen la diferencia de amplitud y fase entre ambas señales, así como la resistencia y reactancia del tejido medido. Las cuatro mediciones calculadas, son normalizadas para su correcta interpretación.

La aplicación diseñada permite editar en una base de datos, los datos particulares del sujeto de experimentación así como datos eventuales específicos, como es el estado del experimento, el tipo de sonda utilizada y el tiempo de oclusión transcurrido; todos estos datos se registran en la base de datos previamente diseñada. El usuario tiene la posibilidad de programar los tiempos de estimulación o bien realizar un espectro en el momento deseado. Finalmente las mediciones registradas y calculadas son mostradas gráficamente, tanto los datos en bruto, como los datos procesados y normalizados dentro de la automatización del software.

En el diseño del software se utilizó OLE DB como proveedor de datos y se creó un archivo de vínculo de datos de Microsoft (UDL); Se utilizaron Objetos de datos ActiveX (ADO) y Objetos de acceso a datos (DAO) como orígenes de datos para obtener acceso a la base de datos en Access y Conexión a una base de datos a través de consultas con el Lenguaje Estructurado de Consultas (SQL).

3.3.10.2. Diagrama de Bloques General

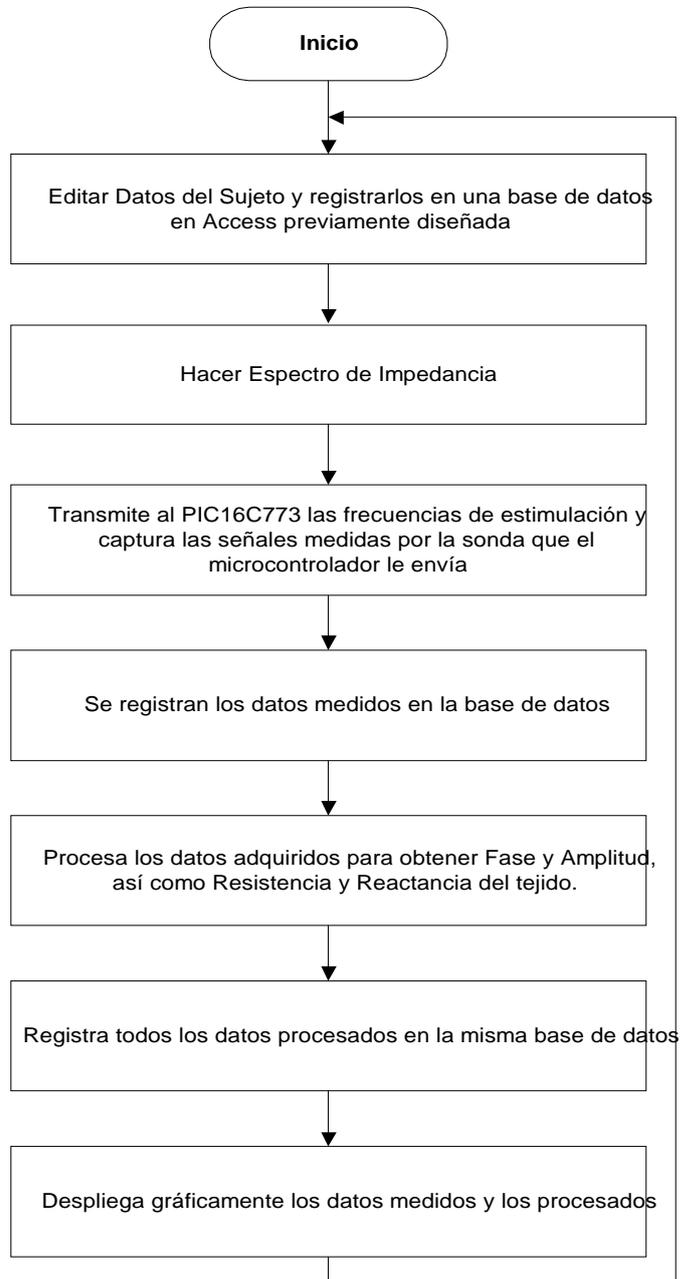


Figura 3.43. Diagrama de Bloques General [elaborado por Javier Pinzon, INOVAMEDICA S.A. DE C.V.].

3.3.10.3. Panel de control principal

Este es el panel principal y es el que se despliega en cuanto se inicia la aplicación. Esta interfaz está conformada por un menú de opciones en la parte superior del panel, por tres gráficos, controladas por selectores de retroceso y avance; por cajas de texto, etiquetas y botones de comando.

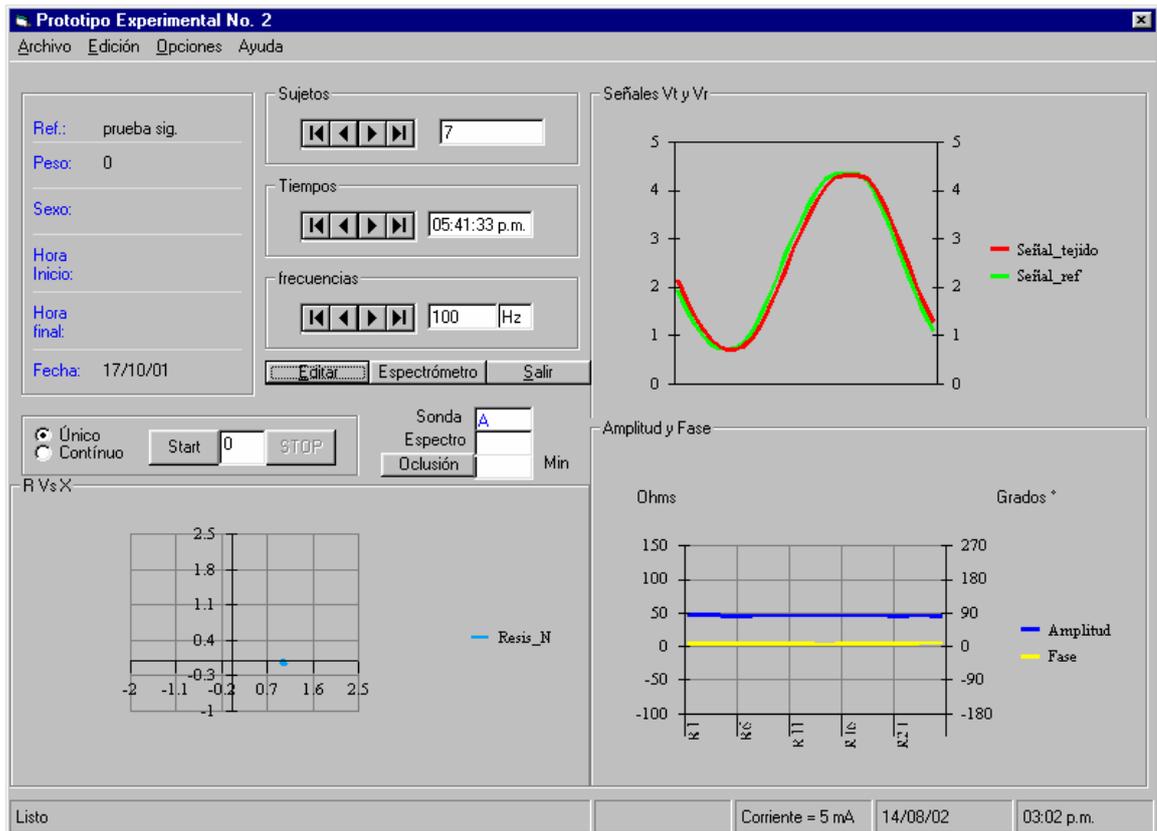


Figura 3.44. Panel de control principal [elaborado por Javier Pinzon, INOVAMEDICA S.A. DE C.V.].

Por cada frecuencia a estimularse, la aplicación envía dos señales, la señal de estimulación y una señal con una diferencia de 100 Hz. que es la señal de modulación; ambas forman una palabra en hexadecimal de 16 caracteres; es decir, 8 Bytes. Los primeros 8 caracteres, corresponden a la señal de original, mientras que los 8 últimos, corresponden a la señal de con la diferencia positiva de 100 Hz.

En la siguiente tabla se muestran las 25 frecuencias seleccionadas desde 100 Hz hasta 1 MHz de manera exponencial y la palabra hexadecimal que le corresponde, así como la diferencia de 100 Hz junto a la original.

| Frecuencia | Palabra Hexadecimal de la frecuencia original | Palabra hexadecimal de la frec. con diferencia de 100 |
|------------|---|---|
| 100 | 000053FC | 0000A7F8 |
| 147 | 00007B75 | 0000CF71 |
| 215 | 0000B491 | 0001088D |
| 316 | 00010964 | 00015D60 |
| 464 | 000185B0 | 0001D9AC |
| 681 | 00023BEF | 00028FEB |
| 1000 | 000347D8 | 00039BD4 |
| 1468 | 0004D0E4 | 000524E0 |
| 2154 | 00071106 | 00076502 |
| 3162 | 000A5f96 | 000AB392 |
| 4642 | 000F3A8E | 000F8E8A |
| 6813 | 001659DB | 0016ADD7 |
| 10000 | 0020CE70 | 0021226C |
| 14678 | 0030273A | 00307B36 |
| 21544 | 0046AD98 | 00470194 |
| 31623 | 0067BE61 | 0068125D |
| 46416 | 00984630 | 00989A2C |
| 68129 | 00DF81B7 | 00DFD5B3 |
| 100000 | 01481060 | 0148645C |
| 146780 | 01E18844 | 01E1DC40 |
| 215443 | 02C2CA75 | 02C31E71 |
| 316228 | 040D6E1C | 040DC218 |
| 464159 | 05F2BD09 | 05F31105 |
| 681292 | 08BB12D4 | 08BB66D0 |
| 1000000 | 0CD0A3C0 | 0CD0F7BC |

Tabla 1. Frecuencias de estimulación

Las dos señales de entrada provenientes del espectrómetro de impedancia, están conformadas cada una por 32 datos. Ambas señales forman un arreglo de 64 datos, intercalados los datos de señal de tejido con los de señal de referencia. Cada dato es una palabra de seis caracteres, los dos primeros caracteres indican la base en la que se encuentra el número, mientras que los siguientes cuatro, es el dato medido por el espectrómetro de impedancia. Un ejemplo de los datos obtenidos, es la palabra "&HFFF", los caracteres &H son el prefijo de base para indicar que es hexadecimal, y los otros cuatro caracteres, corresponden al dato medido.

3.3.10.4 BASE DE DATOS

El software utilizado para diseñar la base de datos Bas_prot_1.mdb, es ACCESS 2000 de Microsoft por tener vínculos con Visual Basic y Excell.

Consta de Cuatro tablas relacionadas en cascada. La relación que guardan de tabla a tabla es de uno a varios y se determina con los códigos únicos de cada tabla. El acceso a cada una de las tablas de la base de datos es mediante la aplicación en VB.6

En la tabla principal, llamada *Sujetos*, se almacenan los datos particulares de cada sujeto como es el código único de cada sujeto, el Nombre o referencia, el peso, el sexo, la hora de inicio y la hora final del experimento, la fecha en que se realiza cada experimento y notas específicas que sucedieron durante el procedimiento experimental. Cada registro de esta tabla está relacionada con n número de registros de la tabla *Tiempos*. Donde n es el número de mediciones que se realizaron durante el procedimiento experimental de cada sujeto.

La segunda tabla llamada *Tiempos*, contiene toda la información referente a las mediciones espectrales. De tal forma, se almacenan el código único de tiempo en que se realiza la medición; el código de sujeto al que pertenece cada medición; la hora exacta en horas, minutos y segundos; el número de medición o número de tiempo; Cada registro de esta tabla está vinculada a un registro de la tabla *sujetos* según el código de sujeto especificado y tiene relacionados 25 registros de la tabla *frecuencias*, que son precisamente las 25 frecuencias estimuladas en cada medición.

La Tercera tabla llamada *Frecuencias*, contiene los datos procesados por frecuencia de las señales medidas por el espectrómetro de impedancia. De tal forma, se almacenan el código de frecuencia único, el código de tiempo a la que pertenece cada registro; la frecuencia nominal, la amplitud calculada, la fase calculada, la resistencia y la reactancia asociadas al espectro frecuencial y las mismas variables pero normalizadas. Cada registro de esta tabla está vinculado a la tabla *Tiempos* mediante el código de tiempo especificado y tiene relacionados 32 registros de la tabla *Señales*, que son precisamente las señales obtenidas y de las cuales se obtienen las variables anteriormente mencionadas.

La cuarta y última tabla, llamada *Señales*. Contiene los datos brutos obtenidos por el espectrómetro de impedancia; es decir, la señal de tejido y la señal de referencia en volts. Contiene también el código único de cada registro y el código de frecuencia al que corresponde cada registro y la hora exacta en que es obtenido cada dato. Cada registro está vinculado únicamente con la tabla *frecuencias*.

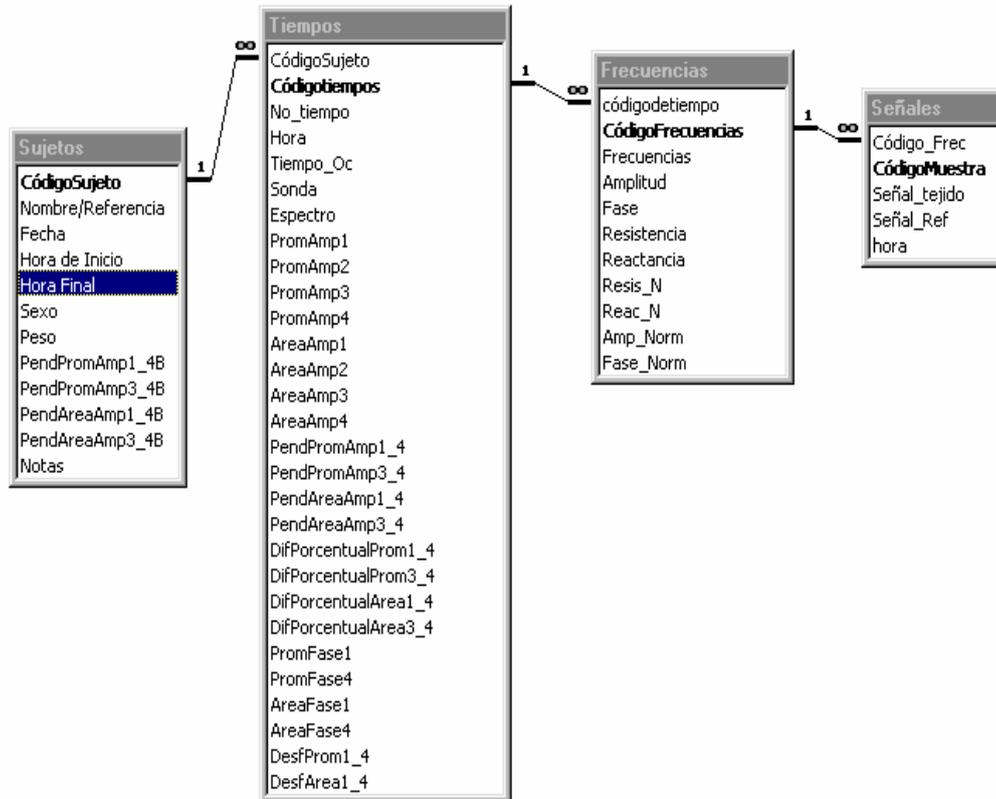


Figura 3.45. Base de datos [elaborado por Javier Pinzon, INOVAMEDICA S.A. DE C.V.].

Capítulo 4

4. Estudio con animales

En este capítulo se describe el protocolo experimental con animales, los criterios de selección del espécimen así como los detalles del procedimiento quirúrgico. (Cirugías Programadas del 26/07/01 al 31/08/01 en el INCICH).

El estudio con animales en este proyecto se justifica por las siguientes razones:

- Se requiere generar datos experimentales que son esenciales para establecer una relación cuantitativa entre la impedancia del tejido y daño isquémico
- Permite evaluar el espectrómetro de impedancia, el algoritmo para estimar el nivel de daño y la sonda apropiada.

El modelo animal seleccionado debe cumplir dos requerimientos básicos:

- Un sistema gastrointestinal con el tamaño y la anatomía más semejante al humano y lo suficientemente grande para introducir la sonda de espectroscopia de impedancias y el tonómetro.
- Debe permitir una perfusión sanguínea a los intestinos fácilmente controlable.

Los especímenes de estudio seleccionados fueron cerdos de la raza YORK de un peso promedio aproximado de 18kg, el intestino delgado (ileon) en este modelo es muy fácil de localizar y manipular. También es relativamente sencillo aislar la arteria mesentérica superior (AMS) para mediante su oclusión controlar la perfusión sanguínea a los intestinos.

4.1. Justificación del uso de los intestinos delgados en cerdos

Para medir impedancia eléctrica en la mucosa gastrointestinal y caracterizar un nuevo prototipo de espectroscopia de impedancia, así como una sonda de cuatro electrodos propuesta para este uso con perspectivas de ser utilizadas en seres humanos, necesitamos un modelo animal con sistema gastrointestinal relativamente semejante en tamaño y en sus propiedades fisiológicas al del humano.

Una óptima selección parecen ser los cerdos, dado que son fáciles de adquirir, son relativamente económicos, tienen un sistema gastrointestinal semejante al del humano y no son un especie peligrosa.

En los laboratorios del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez de la ciudad de México, se emplean cerdos para investigación de cirugías cardíacas y en su bioterio se dispone de personal con experiencia en el manejo de estos especímenes.

Investigadores que realizan estudios gastrointestinales reportan en su mayoría el empleo de cerdos como espécimen de experimentación. Otros investigadores en el área de espectroscopia de impedancia en tejido animal (tumores en el cerebro) usaron ratas como modelos, para mediciones de impedancia sobre músculos esqueléticos usan perros o conejos, ninguno ha reportado estudios en tejidos gástricos.

Dadas las características del protocolo experimental que vamos a emplear, un animal pequeño como la rata o el conejo es inadecuado dado que el procedimiento quirúrgico y la colocación de las sondas del espectrómetro y el tonómetro requieren de un espécimen más fuerte y grande.

4.2. Protocolo Experimental

4.2.1. Descripción general del procedimiento experimental

El procedimiento experimental se lleva a cabo con los siguientes etapas básicas:
(Tiempo estimado: 1hr. 30 mins.)

- Anestesiarse y preparar el cerdo para la cirugía.
- Conectar el cerdo a la máquina de anestesia y al ventilador.
- Aislar y cateterizar la arterial y vena femoral.
- Realizar incisión abdominal e identificar y aislar la AMS.
- Colocación del flujómetro y cordón de oclusión en la AMS.
- Colocación de las sondas A y B del espectrómetro de impedancia en direcciones contrarias en el íleon.
- Colocación del tonómetro en el íleon
- Se realizan mediciones basales durante 30 a 60 minutos de todas las variables.
- Se induce isquemia (ocluyendo la AMS) por 60, 120, o 240 minutos según el grupo experimental.
- Se monitorean continuamente variables hemodinámicas.
- Quitar la oclusión de la AMS (reperusión a 60 o 120 minutos) y seguir midiendo los variables de interés hasta el término de 240 minutos de inicio de oclusión.
- Sacrificar el cerdo.

Grupos Experimentales

Tabla 4.1. Grupos Experimentales

| | |
|---|-----------------------------------|
| 1 | Control |
| 2 | 1 hr. de isquemia con reperusión |
| 3 | 2 hrs. de isquemia y reperusión |
| 4 | 4 hrs. de isquemia sin reperusión |

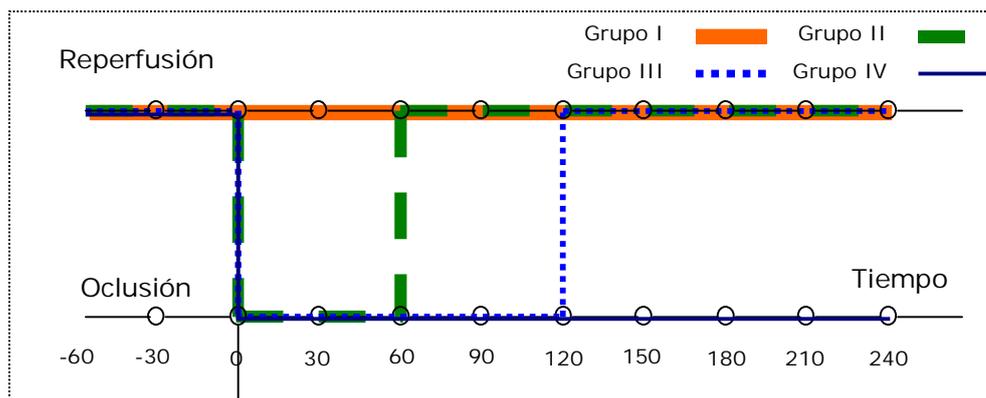


Figura 4.1. esquema del curso temporal del flujo sanguíneo en la Arteria Mesentérica Superior, mostrando las horas de la Oclusión y reperusión en los cuatro grupos experimentales.

Instrumentación quirúrgica

Colocar y organizar:

- Instrumental para Cirugía
- Electrocauterio Erbe Modelo T400
- Preparar solución heparinizada, concentración 1/10
- Preparar tubo endotraqueal y sonda para muestreo de capnometría
- Preparar catéter arterial y catéter Swann Ganz/ calibrar y purgar sondas
- Preparar kit de solución inyectable para CO
- Preparar tubo de oclusión
- Preparar máquina de anestesia
 - Llenado de Halotano
 - Conexión a toma de O₂ y Aire
 - Válvula de escape y Bolsa
- Ajustar frecuencia y volumen del ventilador: 30 resp/min y entre 12-15 ml/kg de Volumen Vital, con valores mínimos y máximos de 10-18 ml/kg.

Procedimiento Quirúrgico

- Tranquilizar el cerdo con sural intramuscular (2 mg/kg, 1ml/20mg).
- Administrar agente anestésico metomidil endovenoso (4mg/Kg).
- Entubación endotraqueal (a través de traqueotomía en caso de que la tráquea sea menor al diámetro del tubo endotraqueal disponible).
- Conectar el cerdo a la máquina de anestesia y al ventilador, fijando la mezcla de gases, el porcentaje de anestesia y el volumen corriente.
- Mezcla de Gases: 0.6 lt/min de O₂, y 1 lt/min de Aire, el cual se regula de acuerdo a los resultados de las gasometrías.
- Dosis de Anestesia: Para inducir, 2% a 3% de Halotano en O₂/aire; para mantener, 1% a 2% en O₂/aire. Generalmente se partirá de 2.5% para inducir, y 1.5% para mantener.
- Ventilación: Frecuencia respiratoria de 20 a 40 resp/min, procurando una frecuencia promedio de 30 resp/min. El volumen corriente deberá regularse de acuerdo al EtCO₂ y a las gasometrías.
- Se aísla la arteria femoral para cateterizar, de este modo se obtiene la presión arterial invasiva y tenemos acceso a toma de muestras de sangre arterial.
- Se aísla la vena femoral para insertar catéter Swann Ganz.
- Confirmar la colocación del Swann Ganz monitoreando la curva característica de presión.
- Se realiza incisión abdominal.
- Se identifica la arteria mesentérica superior. Se aísla y se colocan el flujómetro y cordón de oclusión.
- Se realiza una jareta y una incisión en el intestino delgado.
- Se coloca la sonda de tonometría
- Se colocan las sondas A y B de espectroscopía de impedancia en direcciones contrarias, la sonda A en la misma dirección al tonómetro pero a nivel más profundo, la sonda B en dirección contraria.
- Se sutura la incisión abdominal.
- Se realiza gasometría para obtener la línea de base de las variables hemodinámicas.
- Se comienza a hacer espectros con una periodicidad de 2 minutos durante una hora (t-60 a t=0)

Oclusión de la Arteria Mesentérica Superior (AMS)

Se localiza y aísla la AMS.

Se realiza la oclusión de esta arteria mediante una seda que la rodea en forma transversal.

La seda se pasa por un tubo plástico con un extremo en contacto con la AMS y el otro extremo fuera del cuerpo del animal en donde será controlada la oclusión y la reperfusión durante el curso temporal del experimento apretando o soltando la cuerda de seda.

El Sensor de ultrasonido permite monitorear el control del flujo sanguíneo.

Mantenimiento Fisiológico

(Tiempo estimado: 1 Hr.)

Tabla 4.2. Mantenimiento Fisiológico

| Parámetros | Valores Ideales | Acción correctiva |
|--------------------------|-----------------|---|
| Saturación de Oxígeno | > 94% | Incrementar el FiO2 |
| Presión Sistólica | > 85 | Administrar goteo de dobutamina en solución glucosada 5-10 µg/kg/min |
| Presión Arterial Media | > 65 | Mantener PAWP > 15 mmHg con bolos de solución Ringer o administrar Epinefrina 10 µg/min |
| pHi | > 7.25 | Checar flujo en AMS |
| Fracción Expirada de CO2 | 45 > EtCO2 > 35 | Mantener el Volumen Corriente dentro de los valores 10-18 ml/kg, o idealmente entre 12-15 ml/kg regularmente. |
| CO2 arterial | = 40 ± 5 | Mantener el Volumen Corriente |
| pHa | = 7.4 ± 0.5 | Controlar CO2 y bicarbonato |
| Temperatura | = 37 ± 2 | Conectar manta térmica y lámpara. |

Anestesia: Dosis de mantenimiento no menor a 1% ni mayor a 2%.

Ventilación: Se mantendrá de acuerdo a las variables hemodinámicas y respiratorias. Si aumenta la concentración de EtCO2, se aumentará el volumen corriente, y viceversa.

Mezcla de Gases: Se mantendrá de acuerdo a las variables hemodinámicas. En caso de que disminuya la concentración de O2, se deberá aumentar la presión parcial de O2 dentro de la mezcla.

En caso de PAM baja, se utilizarán bolos de Solución Salina.

En caso de FC baja, se aplicará epinefrina.

En caso de incremento de pCO2, se aplicará HCO3.

Realizar Gasometrías cada 30 minutos para asegurar pO2, pCO2 y pH.

Monitorear pHi por medio de tonometría cada 30 mins.

Monitorear y controlar PAM continuamente y Gasto Cardíaco cada 30 mins.

Criterios de Inclusión

Peso: mayor o igual a 15 kgs y menor o igual a 30 kgs.

PAM mayor a 60mmHg

pHa mayor a 7.35 y menor a 7.45

pHi mayor a 7.2

pCO2 aproximadamente de 40 mmHg

pO2 mayor a 80 mmHg y menor a 120

Espectrómetro y Sonda

La corriente de estimulación se fija en 5 mA, con una ganancia de 32 dB.

Calibración con una resistencia fija y conocida (47 ohms)

Prueba de cada sonda en solución salina

Una vez realizada la oclusión de la AMS se realizan mediciones cada 2 min.

En el programa de cirugías anexo se predetermina la sonda principal, con la que se realizan la mayoría de las mediciones.

Las sondas a utilizarse en el experimento serán previamente cloradas y se alternarán para comprobar la reproducibilidad entre ellas.

El tiempo de cloración de las sondas se define dentro del protocolo de cloración.

Equipo de Monitoreo

Tabla 4.3. Equipo de Monitoreo

| Equipo | Variables que monitorea | Sensor |
|---|---|---|
| Tonocap | pHi EtCO2 Frec. Respiratoria | Sonda intestinal Membrana permeable a CO2 Membrana permeable a CO2 |
| I-STAT | pHa PO2 PCO2 HCO3 BE TCO2 sO2 | 2 ml de sangre arterial, depositada en un cartucho EG7+. |
| Monitor de Signos Vitales Nihon Kohden | ECG NIBP 2 IBP CO sO2 Temp. | Electrodos de superficie DIII Brazaletes neonatal Catéter arterial y Swann Ganz Sonda de Temp y Swann Ganz Oxímetro de pulso en oreja Sonda de temp de Swann Ganz |

Método de la eutanasia

Al finalizar el experimento, el cerdo se inyecta con una dosis letal de *Sodium Pentobarbital* (100 mg/kg) endovenoso. Esta dosis es la recomendada en el *panel of Euthanasia of the American Veterinary Medical Association*.

4.2.2. Resumen de los experimentos realizados

Los experimentos se realizaron en dos fases empleando el mismo espectrómetro de impedancias (segunda versión, primera generación).

La primera fase fue un estudio piloto de 9 animales para caracterizar el protocolo de estudio animal y evaluar el procedimiento de la cirugía así como el control del animal bajo estudio.

La segunda fase correspondió a los experimentos para probar las hipótesis de la presente investigación.

Se realizaron mediciones en cuatro diferentes grupos: mediciones de base o control, mediciones con oclusión de la AMS y reperfusión en tiempo corto (1 hora); mediciones con oclusión de la AMS y reperfusión en tiempo moderado (2 horas) y mediciones con oclusión de la AMS total (sin reperfusión).

Mediciones de línea de base o control: fueron realizadas para investigar los cambios de impedancia durante la perfusión normal. Esta información es necesaria para dar un ensayo del ruido en nuestro sistema de monitoreo (cambios de impedancia en el tiempo sin isquemia inducida). Las mediciones del grupo control fueron realizadas conforme al protocolo experimental, no se realizó oclusión de la AMS por lo que se asume que se realizaron en tejido sano de un animal anestesiado.

Mediciones con obstrucción de perfusión completa: La isquemia fue inducida a través de una oclusión total de la AMS. Las desventajas de este procedimiento son:

- La reperfusión de sangre se sigue por un edema, que influye a las mediciones de impedancias.
- El procedimiento quirúrgico es muy traumático para el animal y las características de tejidos son influidos por otros factores fisiológicos (como cambio en la presión sanguínea).
- En la vida real, la isquemia no se induce por cierre total de la perfusión, sin embargo, este procedimiento da los mejores resultados en las mediciones.

Mediciones de perfusión reducida: Se realizaron experimentos en los cuales la perfusión a los tejidos intestinales no fue cortada todo el tiempo del experimento. La AMS fue aislada en forma quirúrgica, la isquemia se induce por la oclusión de esta arteria. Luego de cortar la perfusión al tejido por un tiempo corto (1 hora) y por un tiempo moderado (2 horas), se restablece el flujo sanguíneo "reperfusión".

Simultáneamente se realizaron mediciones de impedancia y pH-intramucoso para establecer una relación pH-impedancia del tejido; con esta información se estimó un índice de daño isquémico que se describe posteriormente.

4.2.3. Problemas Observados Durante los Experimentos

Durante la realización de estos experimentos, notamos varios problemas; Algunos fueron corregidos. En esta sección, se discuten estos problemas.

- La cirugía: la cirugía aplicada en nuestro protocolo es muy compleja y traumática para el animal bajo estudio, la manipulación es muy invasiva y es imposible que suceda en la práctica formal en una sala de terapia intensiva.
- Oxigenación de sangre descontrolada: Se observa que el animal cambia su estado hemodinámico durante la cirugía, esto se relaciona con la administración

de los agentes anestésicos, el nivel de la oxigenación sanguínea influye directamente en el pHi y en forma indirecta a la medición de la impedancia. Para minimizar este efecto se utiliza un ventilador artificial para controlar el nivel de oxígeno en la sangre y también una máquina de anestesia para aplicar la agente anestésico (Halotano).

- Anestesia: se utiliza tres tipos de agentes anestésicos en nuestro protocolo de experimentación, el primero es el SURAL que se emplea como tranquilizante y se aplica intramuscular, el segundo agente es el Metomidil que se administra endovenoso en la oreja para mantener el animal estable durante la cirugía. Como agente local se usa Xilocadina por debajo de la piel y en la parte donde se realizan incisiones quirúrgicas. Se utiliza Halotano mediante la máquina de anestesia en el resto del tiempo del experimento para mantener al animal dormido. Se trata de aumentar el nivel de Halotano cuando se siente que el animal está despertando y/o chocando con el ventilador así como cuando el ritmo cardíaco es irregular.
- Oclusión de la Arteria Mesentérica Superior: se realizó por medio de un cordón que pasa por un tubo plástico luego de rodear la arteria, la seda en el extremo del tubo ocluye el vaso sanguíneo. Esta herramienta propuesta tiene algunas desventajas tales como que como la fuerza ejercida al ocluir la arteria debe ser regulada cuidadosamente para no romper el tejido y asegurara el cierre total del flujo de sangre, también en el caso de reperfusión debe aflojarse lo suficiente para que regrese el flujo sanguíneo. También se presentó otro problema con el sensor de flujo, éste se introduce muy cerca del cordón de oclusión y por la forma y tamaño del mismo resulta que al no estar en una posición adecuada puede por si solo ocluir el vaso sanguíneo limitando o disminuyendo el flujo.
- Los electrodos y Contenido gastrointestinal: una de las dificultades que nos presento durante los experimentos fue el control del contenido gastrointestinal. Este se refiere a la exacta dieta del animal, porque en casos se ve que el animal no estaba en ayuno por error del personal del bioterio. Se presenta casos que las sondas se sumergen en abundancia de contenido gástrico. Esta no afecta en gran medida al resultado de tonometría y calculo de la pHi . Pero afectaba mucho a los resultados de la espectroscopia de impedancia, por la importancia de que los electrodos estén en contacto, o lo mas pegados al tejido bajo estudio. Por la misma razón se trato de cerrar los intestinos amarándoles ligeramente en los laterales cercanos a las sondas.
- Los electrodos: se utilizaron dos tipos de sondas con electrodos de plata, con dos diferentes medidas para cada tipo de sonda, se armaron manualmente en tubo plástico de uso clínico tipo TYGON. Se depositó una capa de cloruro de plata ($AgCl$) sobre los electrodos. Hay que indicar que se trata de armar sondas idénticas, sin embargo no siempre es fácil llegar a esta meta cuando el procesamiento es manual. Esta capa de cloruro de plata en la interfase con el tejido tiene una voltaje capacitivo de DC significativo que limita la señal medida y reduce la precisión de la medición. También las características eléctricas con frecuencias bajas (debajo de 1 kHz) no son estables, cambian en forma relativa y rápida, esto hace que las mediciones a frecuencia bajas poco confiables. Los electrodos se conectan con el sistema de medición usando conectores mecánicos. Sin embargo, estos electrodos dan resultados excelentes con el rango de frecuencias superiores a 2 kHz.
- Conexiones erróneas: Un problema presente durante los primeros 18 animales incluyendo los del estudio piloto; fue la presencia de un pico en los espectros de impedancia al inicio de los experimentos, su duración era muy

aleatoria. Se detectó que éste pico se debe a que el cátodo del Electrocauterio esta conectado con el instrumento y al mismo tiempo con el animal, creando así una tierra física que disminuye la impedancia en un ancho de banda determinado. Por esta razón se aumento el numero de sujetos y se extendió el tiempo de experimentos.

Anexo II , HOJA DE REGISTRO EXPERIMENTAL- ESTUDIO ESPECTRAL IN VIVO
Anexo III , PROGRAMA DE CIRUGÍAS PARA REALIZAR

Capítulo 5

5. Algoritmo para estimar el Daño Isquémico tisular empleando los parámetros de espectroscopia de impedancia

Uno de los objetivos principales de nuestra investigación es el desarrollo de un algoritmo para estimar el nivel de daño isquémico tisular, y su relación con los parámetros de espectroscopia de impedancia. La tarea incluye resolver los siguientes problemas:

- Desarrollar un algoritmo para calcular el nivel de daño isquémico en función de la acidosis del tejido, el tiempo transcurrido, e Índice de Daño Isquémico.
- Desarrollar un modelo eléctrico característico para estimar la impedancia del tejido en los rangos de frecuencias de dispersión α y dispersión β .
- Definir un conjunto de parámetros de la impedancia tisular que mejor caractericen el tejido con diferentes niveles de daño isquémico y desarrollar un algoritmo para extraer dichos parámetros.
- Desarrollar una red neuronal para clasificar el nivel de daño isquémico a partir de los parámetros característicos de la impedancia tisular.

Durante el desarrollo del sistema, todos estos algoritmos se implementan en forma independiente, sin embargo, se integran a un algoritmo para medir el Nivel de Daño tisular. En este algoritmo las entradas son los datos de mediciones de impedancias, y la salida es el Nivel de Daño Isquémico tisular.

5.1. Desarrollo de un algoritmo para estimar el Índice de Daño Isquémico en función de la acidosis del tejido.

- Isquemia: se produce cuando el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno no son suficientes para las necesidades metabólicas del tejido.
- Daño isquémico: se genera cuando el consumo de oxígeno es limitado al suministro, se presenta metabolismo anaeróbico, evacuación celular insuficiente y reducción del volumen extracelular.
- Reperusión: ocurre cuando se restablece el flujo sanguíneo al tejido.

El daño isquémico es el resultado de isquemia durante un periodo prolongado de tiempo, y el nivel de daño está en función de la duración del tejido bajo isquemia.

En este trabajo se trata de calcular el índice de daño isquémico basándose en un algoritmo que relaciona las dos variables asociadas al daño en el tejido, las cuales son: pH intramucoso, parámetro más conocido para caracterizar la isquemia y tiempo de duración de la isquemia. Para calcular un índice de daño isquémico se puede realizar una integración en el tiempo del pHi o calcular el área bajo la curva del curso temporal del pHi medido, el cual representa el nivel de daño isquémico.

En el desarrollo matemático de este algoritmo se propone que los valores iniciales del pHi sean superiores al nivel de pHi del tejido sano (pHi_{sano}); esto quiere decir que, el valor inicial calculado para el índice de daño isquémico es cero ($IDI(t_0) = 0$, t_0 = tiempo inicial del registro).

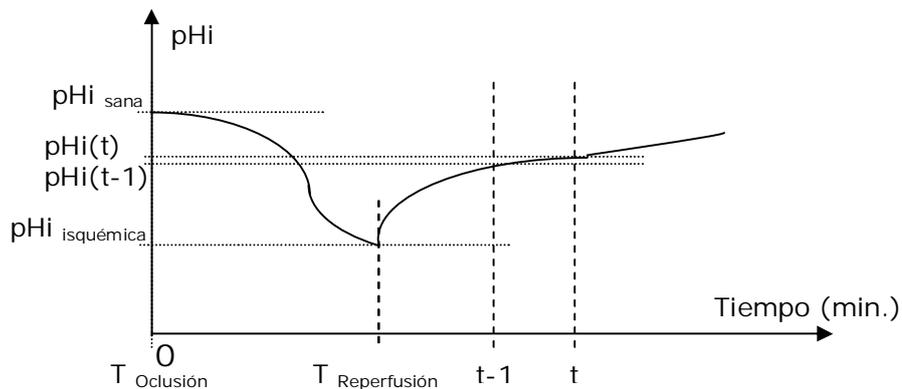


Figura 5.1. Relación entre pH-intramucoso y tiempo, para el cálculo del Índice de daño isquémico propuesto

El índice de daño isquémico en el tiempo t ($IDI(t)$) se calcula de la siguiente manera:

$$IDI(t) = IDI(t-1) + \{ \alpha [pHi(t) - pHi_{sano}] + \beta [pHi(t) - pHi_{isquémica}] \} * [t - (t-1)]$$

Donde α y β son constantes que pueden tomar los siguientes valores:

$\alpha = -1$, $\beta = 0$ cuando $pHi(t) \leq pHi(t-1)$ y $pHi(t) < pHi_{sano}$

$\alpha = 0$, $\beta = 1$ cuando $pHi(t) > pHi(t-1)$ y $IDI(t-1) > 0$

$\alpha = 0$, $\beta = 0$ cuando $pHi(t) > pHi_{sano}$ y $IDI(t) = 0$.

$IDI(t) = 0$ cuando $IDI(t) < 0$.

$pHi_{sano} = 7.2$

$pHi_{isquémica} = pHi(t)_{mínimo}$, que es la medida mínima del pHi desde el inicio del experimento hasta el tiempo t , y $pHi(t)_{mínimo} < pHi_{sano}$.

Cálculo del Nivel de Daño Isquémico (NDI):

Los datos del Índice de daño isquémico (IDI), calculados en el algoritmo anterior, se agruparon en intervalos de valores organizados desde el valor mínimo 0 hasta el valor máximo del IDI crudo calculado. A cada intervalo se le asigna un Nivel de 0 a 3; donde un Nivel 0 significa un tejido sano o que corresponde a un IDI calculado con valor 0, y un Nivel 3 significa que el tejido está muy dañado y que corresponde a valores de IDI grandes, o a tejido con pHi bajo durante un largo período de tiempo. Los niveles 1 y 2 corresponden a valores intermedios de IDI, donde el valor 1 corresponde a valores de IDI de niveles bajos y que el tejido se puede recuperar, y el índice 2 corresponde a más daño que el índice 1, y el tejido necesita alguna forma especial de tratamiento.

Los límites de estos intervalos deben ser cuidadosamente seleccionados y con criterios científicos y puede ser el objetivo de otra investigación. Sin embargo, en esta fase de la investigación se trata de generar este nuevo parámetro y explicar su importancia y significancia en este tipo de aplicaciones, ya que es el mejor parámetro para representar el nivel de daño isquémico.

5.2. Normalización de los parámetros de la impedancia medida

Una forma de eliminar el ruido sistemático y los valores redundantes en los parámetros de espectroscopia de impedancia es mediante la normalización.

Amplitud y Fase Normalizadas: Los parámetros medidos de la impedancia en el sistema de espectroscopia de impedancia prepuesto en este trabajo son la amplitud y fase, en un rango de frecuencias entre 100Hz y 1 MHz.

Teniendo en cuenta que los parámetros resistivos con frecuencia infinita R_{∞} , no dependen de la estructura de los tejidos, ni de la configuración de los electrodos; y que su influencia solamente se debe a la concentración iónica en los tejidos, tanto en animales como en humanos, se puede aproximar para que sea constante (1Ω). Donde los cambios en la concentración iónica en tejido con isquemia temprana no tienen importancia. Por otra parte, los parámetros de fase a frecuencias bajas no presentan cambios significativos con la isquemia, y pueden aproximarse para que sean de 0 grados.

Resistencia y Reactancia: pueden ser calculadas desde los espectros de amplitud y fase normalizadas. Son otra forma de representar los parámetros de la impedancia compleja del tejido isquémico.

Promedios por décadas: Es una forma de eliminar el ruido en los datos espectrales medidos de amplitud y fase, o de resistencia y reactancia; y reducir la dimensionalidad de los parámetros de interés.

Las pendientes: Otro parámetro que puede ser de gran importancia en este trabajo, son los datos de la pendiente tanto en amplitud como en fase, o en resistencia y reactancia. Usando estos datos se pueden relacionar los cambios morfológicos del espectro con el desarrollo de la isquemia. Las mejores pendientes son las calculadas a partir de los datos promediados por décadas; así se obtiene información útil de las frecuencias de corte y de los tiempos de relajación en el tejido, o de las posiciones de polos y ceros en los espectros de interés medidos.

Todos los parámetros anteriores se calculan a partir de los datos medidos de amplitud y fase, utilizando matemática simple. Lo más importante para esta investigación es desarrollar un modelo eléctrico del tejido, y calcular las variables necesarias para estimar los parámetros medidos del tejido en sus diferentes estados de choque o de daño isquémico.

5.3. Modelo eléctrico característico para estimar la impedancia del tejido.

Actualmente la investigación busca la caracterización de los sistemas mediante modelos matemáticos que expliquen la relación entre las variables medidas. En particular para los modelos biológicos se busca equipararlos con modelos eléctricos. En este proyecto se desarrolla un modelo tanto matemático como eléctrico que relaciona todos los parámetros de espectroscopía de impedancia medidos en tejido biológico con los parámetros del modelo eléctrico. En la presente investigación el modelo está propuesto para el tejido intestinal.

Extracción de parámetros del modelo tisular

Es necesario desarrollar un modelo para la impedancia del tejido por las siguientes razones:

Primero, porque modelar los resultados medidos reduce el ruido y los errores sistémicos, y aumenta la certidumbre de la medición. Esto es evidente si se compara un espectro de resistencia obtenido experimentalmente in vivo con un espectro de resistencia ideal, como en la figura (5.4). Dependiendo del ruido mencionado, un espectro obtenido experimentalmente nunca será suave como uno ideal. Mediante el análisis visual, los ojos filtran el ruido y se puede ver la curva del espectro de impedancia ideal. En análisis automático, necesitamos un algoritmo que pueda realizar la filtración de los ojos y eliminar el ruido (sin hacer caso de sus orígenes), y ubicar los puntos medidos en el lugar más probable.

En este trabajo se desarrolla un modelo eléctrico del tejido vivo utilizando los datos medidos para estimar los parámetros del modelo más cercanos a la realidad. Posteriormente se cambian los datos medidos por los datos generados en el modelo simulado, el cual produce datos suavizados, que pueden ser mejor analizados en la computadora.

Segundo, porque los parámetros del modelo extraídos que caracterizan el tejido medido, pueden ser usados para describir y analizar ciertas propiedades del tejido. Muchos cambios químicos y estructurales en el tejido pueden ser observados a través los cambios en los parámetros del modelo. Este modelo aplicado debe aproximarse en forma muy cercana a las variaciones de la impedancia medida, y debe ser consistente (en las mediciones repetidas).

En esta sección se presentan detalles de Circuitos eléctricos equivalentes para el modelo tisular y de los fluidos del cuerpo, junto con los detalles del modelo. Posteriormente se presenta el algoritmo propuesto para la extracción de los parámetros a partir los datos medidos, para estimar el modelo eléctrico del tejido seleccionado; el cual será descrito y comparado con métodos alternativos. También se presenta una guía para el desarrollo de técnicas de estimación de curvas y se aplican a este problema particular. Finalmente se presentan las derivaciones numéricas y analíticas de los parámetros del modelo.

Circuitos eléctricos equivalentes para la estimación tisular y de los fluidos del cuerpo

En 1987, Kanani et al.[47] propusieron diferentes circuitos eléctricos equivalentes para la célula embebida en el tejido. En la figura 5.2.a, R_e es la resistencia de flujo extracelular, C_e es la capacitancia paralela del flujo extracelular, R_m , C_m , R_i , y C_i son las resistencias y capacitancias de las dos capas de la membrana celular y del fluido intracelular, respectivamente. En el rango de frecuencias de 1-500 KHz, este circuito puede ser simplificado como se observa en la figura 5.2.b. Aunque las mediciones de las curvas de admitancia o impedancia no siempre son semicirculares, solamente una parte es semicircular con respecto al centro por debajo el eje real. Hay dos explicaciones propuestas para explicar los resultados experimentales:

1. La capacitancia de fase constante
2. La hipótesis de que las constantes de tiempo $C_m R_i$ para todas las células no son iguales sino distribuidas (se ha propuesto que la función de distribución de las constantes de tiempo debe ser una distribución normal, dado que las células están distribuidas en forma estadística).

Las mediciones, coordinadas del centro y radios de curvas de admitancia o impedancia semicirculares, están calculadas por el método de "fijación de curva por error cuadrático medio". Los parámetros α , f_c , R_e y R_i se obtienen a partir de estas curvas enteras. Sin embargo, en la mayoría de las publicaciones, utilizan la figura 4.2.b para modelar partes del cuerpo humano con circuitos equivalentes.

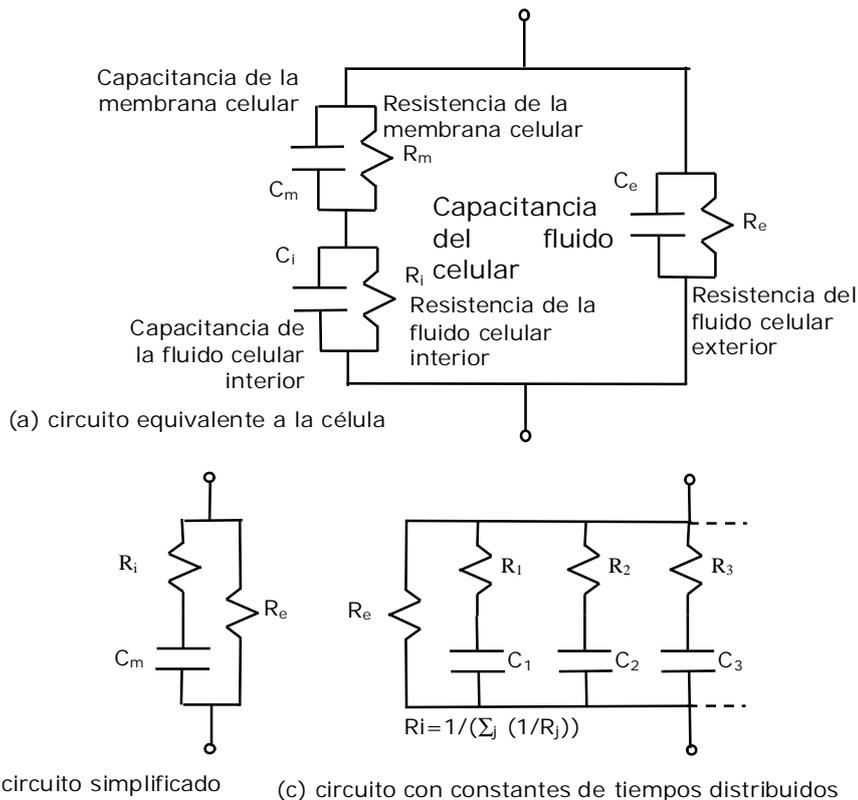


Figura 5.2. Circuitos eléctricos equivalentes para la estimación tisular y de los fluidos del cuerpo

También las mediciones de impedancia tisular in vivo presentan una excelente correlación dentro de los resultados de medición obtenidos y los datos del modelo tisular eléctrico propuesto por Cole y Cole [25]. Este modelo fue introducido en la sección (2.4. Las propiedades eléctricas de los tejidos), y su circuito eléctrico equivalente es el circuito simplificado b en la figura 5.2; que se representa mediante la expresión:

$$Z = R + jX = R_{\infty} + ((R_0 - R_{\infty}) / (1 + (j\omega\tau)^{\alpha}))$$

Donde R_0 es la resistencia del tejido a frecuencia cero y R_{∞} es la resistencia a frecuencia infinita. τ es constante de tiempo característico y α es parámetro que expresa la "depresión" del centro del la curva (figura 5.3.), comparando en la figura 4.2.b. $R_0 = R_e$, y $R_{\infty} = R_e * R_i / (R_e + R_i)$.

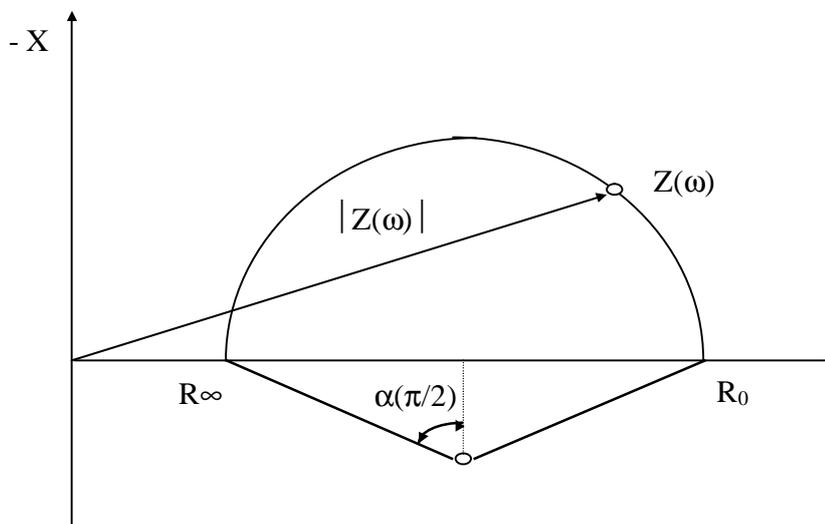


Figura 5.3. Una curva típica de la impedancia compleja del tejido a todas las frecuencias. Este curva puede aproximarse a un parte de círculo. Los parámetros de este modelo R_0 , R_{∞} y α pueden ser calculados desde los parámetros del círculo.

Esta ecuación modela una sola región de dispersión con una sola constante de tiempo; sin embargo, las mediciones de impedancia obtenidas en este trabajo se encuentran en el rango de frecuencias de 100Hz a 1 MHz, lo cual implica las dos regiones de dispersión α y β .

A frecuencias bajas (menores de 2KHz), y altas (mayores de 300KHz), se observa un incremento en las desviaciones de los valores medidos en tejido vivo y los calculados en el modelo.

Otra fuente de diferencias dentro de los datos medidos y modelados en esta ecuación ocurre en tejido isquémico a frecuencias por encima de la frecuencia de dispersión central o de corte. En isquemia, el modelo representado por la ecuación anterior, no es válido a altas frecuencias debido a la formación de curvas de impedancia adicionales en la región de medición. Esto altera la forma de la curva de impedancia, espectros de amplitudes y fases a frecuencias superiores al rango 100-300KHz (dependiendo de la profundidad de la isquemia). Por eso, la estimación del modelo no puede ser aplicada a regiones de frecuencias lejanas de la frecuencia central de la curva anterior, donde crece mucho la desviación entre los datos medidos y los calculados en el modelo.

Este problema se resuelve proponiendo un modelo más complejo que caracterice el tejido en cualquier región de dispersión, α , β , y/o γ , cuando sea necesario, y a diferentes rangos de frecuencias de interés.

Es necesario desarrollar un modelo que incluya las diferentes regiones de dispersión α y β , para todo el rango de frecuencias de interés, más aún cuando la aplicación de la medición y el tejido medido (tejido gastrointestinal) son mucho más complejos que la representación en un simple modelo para tejido normal. Este modelo debe incluir diferentes constantes de tiempo distribuidas en el rango de frecuencias de interés, y el cálculo de sus parámetros de una manera más compleja (ver la figura 5.4).

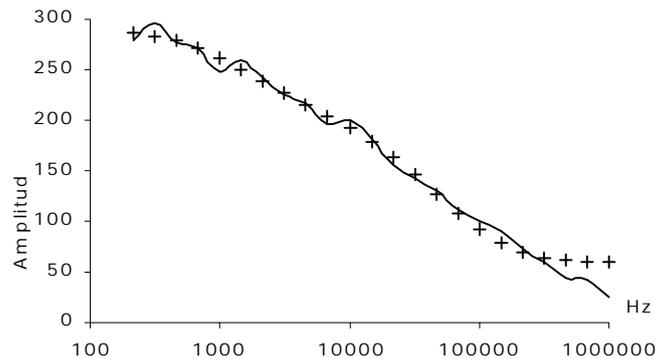


Figura 5.4. diagrama que presenta comparación entre espectro de amplitudes de impedancia medidas en tejido (línea sólida), y espectro ideal de amplitud calculado en modelo que consiste de cinco constantes de tiempos (+), que corresponde a los datos de amplitudes medidas.

En este trabajo se propone un modelo que incluye dos diferentes configuraciones de circuitos equivalentes de impedancia que han sido reportadas y discutidas [Ackman, 8], y que se pueden ser usados más de una vez, según el orden y número de constantes de tiempo que sean necesarias para representar mejor los datos medidos.

En la siguiente gráfica se presenta un modelo con dos constantes de tiempo incluyendo dos circuitos equivalentes de tejido biológico reportados en casi todas las referencias que discuten este tema.

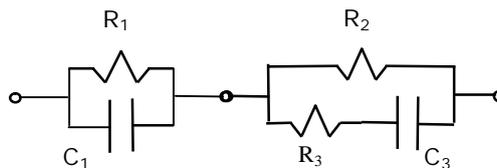


Figura 5.5. Modelo de tejido biológico con dos constantes de tiempo diferentes $\tau_1 = R_1 C_1$, $\tau_2 = (R_2 + R_3) C_2$ y sus componentes resistivos y capacitivos $R_0 = R_1 + R_\infty$, y $R_\infty = R_2 R_3 / (R_2 + R_3)$. Una parte del circuito $R_1 C_1$ muestra el comportamiento del circuito a bajas frecuencias y la otra parte a altas frecuencias.

Una ecuación matemática que describa esta modelo es la función de transferencia de este circuito:

$$Z = R_1 / (1 + j \omega \tau_1) + (R_2 + j \omega R_2 R_3 C_2) / (1 + j \omega \tau_2);$$

comparándola con la formula general de la impedancia de tejido:

$$Z = R + jX = R_\infty + (R_0 - R_\infty) / (1 + j \omega \tau)$$

Donde:

$$\begin{aligned}\tau_1 &= R_1 C_1, \tau_2 = (R_2 + R_3) C_2 \\ R_0 &= R_1 + R_2 \\ R_\infty &= R_2 R_3 / (R_2 + R_3)\end{aligned}$$

Y R_0 es la resistencia del tejido a la frecuencia cero, R_1 es la resistencia a un rango de frecuencias bajas y intermedias, R_2 y R_3 representan la resistencia del tejido a frecuencias altas, y R_∞ es la resistencia a frecuencia infinita. τ_1 y τ_2 son los constantes de tiempos correspondientes.

5.3.1. Algoritmo para la extracción de los parámetros del modelo de impedancias

Primero se explica el método con dos constantes de tiempo y posteriormente se generaliza a varias constantes de tiempo.

En esta parte del modelo se utilizan las variables de los circuitos equivalentes del modelo como sus parámetros, y a partir de estas variables se puede calcular cualquier parámetro o variable de todas las formas de interés conocidas y reportadas.

La técnica de estimación de descenso por gradiente y la evaluación del error mínimo cuadrado de los datos medidos y los calculados a partir del modelo estimado, pueden ser utilizados para la extracción de parámetros de los datos medidos, y estimación del modelo eléctrico del tejido de interés. Los componentes del modelo tisular son los siguientes:

$$\begin{aligned}\tau_1 &= R_1 C_1, \tau_2 = (R_2 + R_3) C_2 \\ R_0 &= R_1 + R_2 \\ R_\infty &= R_2 R_3 / (R_2 + R_3)\end{aligned}$$

Estos parámetros no tienen una relación lineal con la frecuencia, y la estimación de los datos y de estos parámetros no puede ser analítica.

Hay varios métodos numéricos para desarrollar esta tarea. Todos están basados en aproximación numérica del mínimo del error cuadrado de la función del modelo. Esto se hace usando el cálculo del gradiente en forma iterativa para estimar el mínimo. Generalmente, estos métodos sufren severos problemas. El principal problema es que un mínimo local podría ser encontrado en lugar del mínimo absoluto, lo cual introduce un error en los parámetros extraídos, y no pueden ser estimados correctamente. También, estos métodos son muy lentos y toma mucho tiempo su cálculo en la computadora.

Para simplificar este problema, se proponen diferentes aproximaciones de extracciones numéricas de los parámetros del modelo.

Las salidas del procedimiento iterativo para estimar los componentes del modelo son las resistencias del modelo R_1 , R_2 y R_3 en este ejemplo. Los valores de capacitancias del modelo se determinan tomando en cuenta el conocimiento a priori del rango dinámico de los componentes resistivos, y que las constantes de tiempo esperados cubren el rango de frecuencias de interés.

5.3.2. Estimación de parámetros usando el algoritmo de descenso por gradiente

La función de transferencia del modelo propuesto anteriormente con dos constantes de tiempo $Z_{Fun}(i)$, y la función del error cuadrático medio $J(R_x)$ son:

$$Z_{Fun}(i) = R_1 / (1 + j\omega(i) * R_1 * C_1) + (R_2 + j\omega(i) * R_2 * R_3 * C_2) / (1 + j\omega(i) (R_2 + R_3) * C_2);$$

$$J(R_x) = 1/N \sum_i^N (Z_{Fun} - Z_{vivo})^2$$

Donde $\omega(i) = 2 * \pi * f(i)$; y $f(i)$ es la frecuencia $N_0 i$.

$Z_{Fun}(i)$ es la función de transferencia para el cálculo de la impedancia compleja del modelo propuesto, con sus componentes resistivos y capacitivos.

$J(R_x)$ es la función del error, y Z_{vivo} son los datos medidos en tejidos vivos.

Para determinar el conjunto de parámetros óptimos (R_1 , R_2 , y R_3), para los cuales la función del error de la ecuación anterior tenga el mínimo, se debe cumplir el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\partial Z / \partial R_1 = 0$$

$$\partial Z / \partial R_2 = 0$$

$$\partial Z / \partial R_3 = 0$$

Los primeros gradientes (derivadas) de la función del error son:

$$\partial Z / \partial R_1 = 1 / (1 + j\omega_i R_1 C_1)^2$$

$$\partial Z / \partial R_2 = (1 + (j\omega_i R_3 C_2) + (j\omega_i R_3 C_2)^2) / (1 + j\omega_i (R_2 + R_3) C_2)^2$$

$$\partial Z / \partial R_3 = j \omega_i R_2 C_2^2 / (1 + j\omega_i (R_2 + R_3) C_2)^2$$

Donde $\partial Z / \partial R_x$ es el gradiente o la derivada de la función de transferencia Z con respecto al parámetro R_x .

Estas ecuaciones pueden ser resueltas usando métodos iterativos como el método descenso por gradiente de la función de costo, optimizando los parámetros (R_1 , R_2 , y R_3) de la función de transferencia que explica el modelo, y que minimiza el error cuadrático medio dentro los datos de mediciones Z in vivo y los datos calculados del modelo estimado.

Algoritmo del descenso por gradiente

Supone que R_x es un parámetro por estimar y $J(R_x)$ es la función de costo correspondiente, la cual será minimizada. La función $J(R_x)$ es una función diferencial. Este algoritmo inicia con valor de $R_x(0)$ para el punto mínimo, y el algoritmo es iterativo utilizando la siguiente forma:

$$R_x (\text{nueva}) = R_x (\text{anterior}) + \nabla R_x$$

$$R_x (\text{nueva}) = R_x (\text{anterior}) - \mu * \partial J(R_x) / \partial R_x, \text{ donde } \mu \text{ es la tasa de convergencia}$$

$\nabla R_x = - \mu * \partial J(R_x) / \partial R_x$, la componente del error. Donde $J(R_x)$ es la función de costo para calcular el error, y será calculada por medio del algoritmo de descenso por gradiente, donde

La nueva estimación de R_x está en la dirección que $J(R_x)$ decrementa. El parámetro μ es muy importante y tiene un poder crucial en la convergencia del algoritmo. Sí es muy pequeño, la corrección ΔR_x es pequeña y la convergencia hacia el punto óptimo será muy lenta. En otro caso, si es muy grande, el algoritmo puede oscilar alrededor del valor óptimo y la convergencia no será posible. Sin embargo, si el parámetro se escoge apropiadamente, el algoritmo converge a un punto de $J(R_x)$, el cual puede ser un mínimo local o global, o un punto de oscilación (saddle point). En otras palabras, se converge a un punto donde el gradiente se hace cero, y esto depende de la posición inicial; y la velocidad de la convergencia depende a la forma de la función de costo $J(R_x)$.

Desarrollo matemático:

$$Z_{\text{Fun}} = R_1 / (1 + j \omega(i) * R_1 * C_1) + (R_2 + j \omega(i) * R_2 * R_3 * C_2) / (1 + j \omega(i) (R_2 + R_3) * C_2);$$

$$J(R_x) = 1/N \sum_i^N (Z_{\text{Fun}} - Z_{\text{vivo}})^2$$

$$\partial J(R_x) / \partial R_x = \partial (1/N \sum_i^N (Z_{\text{Fun}} - Z_{\text{vivo}})^2) / \partial R_x = 2/N \sum_i^N \partial Z_{\text{Fun}}(R_x) / \partial R_x * (Z_{\text{Fun}} - Z_{\text{vivo}})$$

En forma matricial

$$R_x = \begin{array}{c} \left| \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{array} \right|_{\text{nuevo}} = \begin{array}{c} \left| \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{array} \right|_{\text{Anterior}} + \nabla \begin{array}{c} \left| \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{array} \right| \end{array}$$

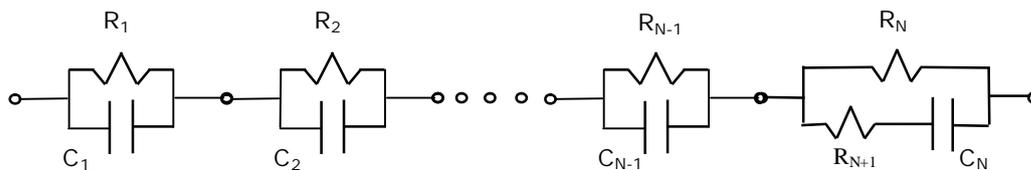
$$\nabla \begin{array}{c} \left| \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{array} \right| = -\mu \begin{array}{c} \left| \begin{array}{c} \partial J(R_1) / \partial R_1 \\ \partial J(R_2) / \partial R_2 \\ \partial J(R_3) / \partial R_3 \end{array} \right|_{R_{\text{Anterior}}} = -\mu \frac{2}{N} \sum_i^N \begin{array}{c} \left| \begin{array}{c} 1 / (1 + j \omega_1 R_1 C_1)^2 \\ \frac{1 + (j \omega_1 R_3 C_2) + (j \omega_1 R_3 C_2^2)}{(1 + j \omega_1 (R_2 + R_3) C_2^2)} \\ j \omega_1 R_2 C_2^2 / (1 + j \omega_1 (R_2 + R_3) C_2^2) \end{array} \right| \end{array}$$

Para resolver el problema de la estimación de los parámetros del modelo hay que contestar la siguiente pregunta: ¿Cuál es la R que minimiza el error cuadrático medio, y la dirección inversa al vector Gradiente ∇J ?

Este estudio se puede generalizar para aplicación con modelos de tejido biológico más complejo que incluye más constantes de tiempo diferentes. En la práctica, para este proyecto, se trata de modelar con circuitos de cuatro y de cinco constantes de tiempo diferentes tratando a minimizar el error cuadrático medio, y que el comportamiento del modelo sea lo más parecido al tejido vivo. Posteriormente serán comparadas estas opciones y discutidas cuidadosamente.

5.3.3. Estimación de parámetros de un modelo con múltiples constantes de tiempo distribuidas

En forma general y en caso de simular un tejido complejo (tejido gástrico intestinal) que consta de una estructura compleja y variada de células y capas celulares, en un modelo eléctrico, se propuso un modelo dinámico que puede simular todo tipo de tejido. Generalizando el modelo anterior para N constantes de tiempo diferentes:



$$\tau_1 = R_1 C_1, \tau_2 = R_2 C_2, \tau_{N-1} = R_{N-1} C_{N-1}, \tau_N = (R_N + R_{N+1}) C_N$$

$$R_0 = R_1 + R_2 + \dots + R_{N-1} + R_N$$

$$R_\infty = R_N R_{N+1} / (R_N + R_{N+1})$$

Figura 5.6. Modelo de tejido biológico con N constantes de tiempo diferentes $\tau_1 = R_1 C_1, \tau_2 = R_2 C_2, \tau_{N-1} = R_{N-1} C_{N-1}, \tau_N = (R_N + R_{N+1}) C_N$ y sus componentes resistivos y capacitivos $R_0 = R_1 + R_2 + \dots + R_{N-1} + R_N$, y $R_\infty = R_N R_{N+1} / (R_N + R_{N+1})$. Las partes del circuito $R_1 C_1$ muestran el comportamiento del circuito a bajas frecuencias y el efecto del cambio de diferentes capas tisulares, la parte $(R_N + R_{N+1}) C_N$ muestra el comportamiento del circuito a altas frecuencias y las otras partes presentan el comportamiento a frecuencias entremedias.

$$Z_{Fun} = R_1 / (1 + j \omega(i) \tau_1) + R_2 / (1 + j \omega(i) \tau_2) + \dots + R_{N-1} / (1 + j \omega(i) \tau_{N-1}) + (R_N + j \omega(i) * R_N * R_{N+1} * C_N) / (1 + j \omega(i) (R_N + R_{N+1}) * C_N); \quad (.. x.2)$$

Y la función de costo se calcula usando la fórmula:

$$J(R_x) = 1/N \sum_i^N (Z_{Fun} - Z_{Vivo})^2$$

A continuación se exponen las fórmulas matriciales para el cálculo de los parámetros resistivos del modelo propuesto del tejido celular, con N constantes de tiempo. Este cálculo se hace en forma iterativa; y la estimación se realiza por medio del algoritmo de descenso por gradiente. Los límites de la estimación tienen un error cuadrático medio que es el objetivo a alcanzar, o con el número de iteraciones máximo de este algoritmo.

$$R_x = \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \vdots \\ R_N \\ R_{N+1} \end{array} \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ \text{nuevo} \end{array} = \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \vdots \\ R_N \\ R_{N+1} \end{array} \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ \text{Anterior} \end{array} + \nabla \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \vdots \\ R_N \\ R_{N+1} \end{array}$$

$$\nabla \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \vdots \\ R_N \\ R_{N+1} \end{array} = -\mu \begin{array}{c} \partial J(R_1)/\partial R_1 \\ \partial J(R_2)/\partial R_2 \\ \vdots \\ \partial J(R_N)/\partial R_N \\ \partial J(R_{N+1})/\partial R_{N+1} \end{array} \quad R_{\text{Anterior}}$$

$$R_x = \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \vdots \\ R_N \\ R_{N+1} \end{array} \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ \text{nuevo} \end{array} = \begin{array}{c} R_1 \\ R_2 \\ \vdots \\ R_N \\ R_{N+1} \end{array} \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ \text{Anterior} \end{array} = -\mu \frac{2}{N} \sum_i^N \begin{array}{c} 1/(1+j\omega_i \tau_1)^2 \\ 1/(1+j\omega_i \tau_2)^2 \\ \vdots \\ \frac{1 + (j\omega_i R_{N+1} C_N) + (j\omega_i R_{N+1} C_N^2)}{(1 + j\omega_i (R_N + R_{N+1}) C_N)^2} \\ j \omega_i R_N C_N^2 / (1 + j\omega_i (R_N + R_{N+1}) C_N^2) \end{array}$$

En este modelo se prepusieron los valores de capacitancias en forma que las frecuencias de corte de los componentes del modelo cubren el rango de frecuencias de interés 100 Hz – 1 MHz.

Esquema del modelo usado en esta tesis

Para esta tesis se propuso un modelo con cinco constantes de tiempo diferentes como está mostrado en la siguiente gráfica. En este modelo se fijaron los valores de las capacitancias: $C_1=3.3E-06$ F, $C_2=1.0E-06$ F, $C_3=1.0E-07$ F, $C_4=1.0E-08$ F, y $C_5=1.0E-09$ F, para cada espectro de impedancia medido en tejido intestinal. Los valores de las resistencias del modelo fueron estimados usando el algoritmo de descenso por gradiente. El algoritmo se corrió con los siguientes criterios:

$\mu = 0.005$. Tasa de contingencia

Error mínimo = 0.0005;

Número de Iteraciones Máximo = 2.5e4.

Este algoritmo se desarrolló y programó en el lenguaje MATLAB, y los programas correspondientes serán presentados en los anexos del presente manuscrito.

Las variables para estimar en este algoritmo son las resistencias del modelo, R_1, R_2, \dots, R_6 ; minimizando el error entre los parámetros de espectroscopia de impedancia, como amplitudes, o resistencias y reactancias medidos en tejido intestinal, con los parámetros correspondientes calculados a partir del presente modelo.

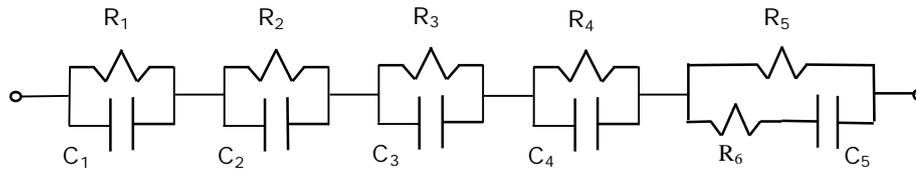


Figura 5.7. Esquema del modelo de tejido biológico con 5 constantes de tiempo diferentes $\tau_1 = R_1 C_1$, $\tau_2 = R_2 C_2$, $\tau_{N-1} = R_{N-1} C_{N-1}$, $\tau_N = (R_N + R_{N+1}) C_N$ y sus componentes resistivos y capacitivos $R_0 = R_1 + R_2 + \dots + R_{N-1} + R^\infty$, y $R^\infty = R_N R_{N+1} / (R_N + R_{N+1})$, y las capacitancias $C_1 = 3.3 \times 10^{-6}$ F, $C_2 = 1.0 \times 10^{-6}$ F, $C_3 = 1.0 \times 10^{-7}$ F, $C_4 = 1.0 \times 10^{-8}$ F, y $C_5 = 1.0 \times 10^{-9}$ F. Las partes del circuito $R_1 C_1$ muestran el comportamiento del circuito a bajas frecuencias y el efecto de cambio de diferentes capas tisulares, la parte $(R_5 + R_6) C_5$ muestra el comportamiento del circuito a altas frecuencias y las otras partes $(R_2 C_2, R_3 C_3$ y $R_4 C_4)$ presentan el comportamiento a tres rangos de frecuencias entremedias.

Anexo I, los programas en el lenguaje MATLAB, para la estimación del modelo.

5.4. Definición de los parámetros más característicos de espectroscopia de impedancia

A partir de las amplitudes y fases medidas, se calcularon la amplitud y fase normalizadas, resistencias y reactancias, promedios por décadas de los parámetros anteriores y las pendientes calculadas de los promedios por décadas. Los parámetros del modelo que son las resistencias estimadas en el modelo.

Todos estos parámetros de los experimentos y grupos, se comparan con las variables hemodinámicas, con la acidosis "pHi" de los tejidos caracterizados, con los niveles de daño isquémico, y con los índices de daño isquémico calculados en el algoritmo propuesto anteriormente. Esta comparación se realiza mediante un proceso estadístico para definir los parámetros que tienen más significancia estadística, y para diferenciar los estados de daño que sufre el tejido comparando valores de los parámetros agrupados por tiempo con la duración de isquemia inducida a los tejidos. El análisis de varianza es una herramienta útil para este tipo de análisis. Otra prueba estadística que relaciona los parámetros calculados con los parámetros medidos, con el fin de caracterizar la isquemia y el nivel de daño isquémico, es la correlación.

Estas pruebas se realizan usando un paquete de estadística comercial "STATISTICA".

Se seleccionaron 12 parámetros de mayor significancia estadística y con alto factor de correlación para que sean utilizados para el análisis siguiente en redes neuronales, para la clasificación y reconocimiento de patrones desarrollados en esta investigación. Todo con el objetivo de estimar el nivel de daño isquémico. En esta selección se trata de escoger parámetros de diferentes tipos de informaciones de la impedancia (amplitudes, fases, pendientes, y del modelo) y que no tengan mucha redundancia en aquellas informaciones.

5.5. Red neuronal para clasificar el nivel de daño isquémico a partir de los parámetros característicos de la impedancia tisular.

Este proyecto requiere de un instrumento que sea capaz de medir las propiedades eléctricas del tejido y analizarlas, con el fin de estimar el grado o el nivel de daño isquémico. Para ello es importante escoger la mejor herramienta para analizar los datos. La experiencia práctica indica que las redes neuronales artificiales tienen el poder y la flexibilidad requeridos para realizar este análisis.

Las Redes Neuronales Artificiales (RNAs) son una herramienta de análisis no lineal apropiada para resolver problemas típicos de clasificación y reconocimiento de patrones, análisis de datos y control no lineal. Las RNAs tienen el poder de memorizar y extrapolar la solución de un problema a partir de un conjunto de ejemplos. Esta característica hace de las RNAs una técnica preferida para resolver cierta clase de problemas, cuando la relación entre las variables de entrada y de salida no es conocida, pero está disponible un conjunto de ejemplos que muestran la relación entre la entrada y la salida. Otra característica importante de las RNAs es su alta velocidad de procesamiento una vez entrenadas.

Existen muchas de redes neuronales, y en el estudio preliminar se propone utilizar una red de procesamiento hacia adelante (feedforward neural network) y la red de cuantificación vectorial de aprendizaje LQV (Learning Vector Quantization "LVQ" Networks) (ver capítulo 2.5.).

El objetivo de usar las redes neuronales es determinar los niveles de homogeneidad y de generalización de los parámetros de impedancia para representar y diferenciar las clases propuestas para las etapas de daño que se indujo en los tejidos del protocolo animal así como los niveles de isquemia en los tejidos (pHi) y los diferentes niveles de daño isquémico estimados para el tejido desde los datos de isquemia y sus duraciones.

En los resultados presentados en esta tesis en capítulos próximos, se utiliza una metodología simple para esta aplicación, se adoptan dos estructuras generales de los dos diferentes tipos de redes. Los números de elementos de procesamientos de sus capas de entradas, las capas ocultas en las redes de retropropagación, las capas de entradas y la capa Kohonen en las redes de cuantificación de vector de aprendizaje son los mismos para todas las aplicaciones. Lo único que cambia es el número de neuronas en las capas de salida, donde en cada análisis éstas dependerán del número de clases en las salidas de la aplicación.

Todas las redes tienen en la capa de entradas 12 neuronas que presentan los dos parámetros característicos selectos de los de la impedancia compleja de los tejidos. Las redes de retropropagación tienen otras tres capas ocultas con 12 neuronas en la primera y segunda capa y 5 neuronas en la tercera capa. El número de neuronas en la capa de salida depende del número de clases en la salida de la aplicación como se menciono anteriormente. El número de elementos de procesamiento en las redes de Kohonen es casi 50 elementos, y el número de elementos en la salida son como la red mencionado anteriormente.

Para cada aplicación o análisis los datos incluidos se separan en dos grupos, datos de entrenamiento y datos de prueba. Los datos de entrenamiento son los selectos de los tres cuartos de los espectros incluidos, y los datos de prueba son del último cuarto de los datos mencionados. El orden en que se toman los espectros es que de cada cuatro espectros se seleccionan tres para entrenamiento y uno para prueba.

Capítulo 6

Resultados Experimentales

La parte experimental de este proyecto consiste en diferentes etapas:

- Realizar los estudios animales y medir la impedancia y pHi en el tejido intestinal.
- Analizar los datos medidos, normalizar los datos, modular el tejido o extraer los parámetros de la impedancia tisular.
- Desarrollar un algoritmo basado en una red neuronal artificial para medir el nivel de daño isquémico.
- Examinar el funcionamiento del algoritmo de medición de daño isquémico y presentar sus resultados.

En este capítulo, primero se resume el estudio realizado en el animal, luego se presentan resultados de mediciones de impedancia en tejido intestinal como ejemplos típicos, indicando algunas características específicas de los parámetros medidos y se comparan entre diferentes grupos experimentales, enseguida se muestran los resultados del proceso de modelación de la impedancia y se presentan patrones de daño típicos de los parámetros característicos de la impedancia tisular, posteriormente se presentan los resultados del algoritmo de cálculo del nivel de daño isquémico. Finalmente, se describen diferentes redes neuronales artificiales para la estimación del nivel de isquemia o pHi , niveles de daño isquémico y las clases que presentan los diferentes estados de daño inducidos al tejido bajo estudio en los experimentos realizados.

6.1. Resumen de los experimentos del modelo animal realizados

Durante el curso de cinco meses, fueron realizados 36 experimentos con el modelo animal. Estos experimentos resultan en 4200 espectros de impedancia registrado en tejido intestinal durante más que 160 horas de mediciones de impedancias realizadas. También, fue registrado el pHi del tejido durante más que 120 horas.

Se condujeron cuatro tipos de experimentos: control o mediciones de base, obstrucción total de perfusión u oclusión de la arteria mesentérica superior y luego la reperfusión (dos grupos de diferentes tiempos de duración de oclusión) y obstrucción total de perfusión. La diferencia entre estos experimentos fue explicada en la sección anterior. Las mediciones con oclusión total y reperfusión después de un tiempo reducido de oclusión consisten en:

- Mediciones de base o control (0-240 minutos);
- Isquemia por oclusión u obstrucción total de perfusión (0-240 minutos).
- Reperfusión (60-120 minutos), después 60-120 minutos de oclusión;
- Mediciones post-muerte (mediciones después muerte son iguales a isquemia profunda con obstrucción de perfusión total.

Los primeros nueve experimentos fueron un estudio piloto, y los nueve experimentos siguientes fueron excluidos por errores en el control del instrumental quirúrgico y el efecto de la falsa conexión de tierra con el animal; Aunque los últimos dieciocho experimentos fueron más controlados, hubo cinco experimentos que no fueron satisfactorios por varias razones (ver la Tabla 6.2). Además de que no todos los datos de mediciones de impedancia y/o pHi en los experimentos fueron con salidas

satisfactorias o buenas. Las razones de estos son errores en la dieta del animal y el control del contenido gástrico, error en el control de reperfusión sanguínea que no llega a ser total por falso contacto con el instrumental de monitoreo del flujo sanguíneo y errores en el control del animal bajo experimentos como anestesia y presiones sanguíneas, el control de la temperatura del animal, la cantidad de líquido inyectada o introducida al animal donde en muchas ocasiones fue demasiado, esto último fue debido principalmente a la repetición del cálculo del gasto cardíaco.

Cabe mencionar que fue usado el método de interpolación (función SPLINE, en el lenguaje de programación MATLAB) para interpolar todos los datos faltantes a los tiempos de mediciones de interés, recordando que las mediciones de espectroscopia de impedancia fueron tomadas por intervalos de 2 minutos y realizando mediciones entre dos sondas, las mediciones de variables hemodinámicas se realizaron por intervalos de 15-30 minutos y tomando en cuenta las fallas en los instrumentos de medición; Por todo lo anterior para cada espectro medido de impedancia se interpolan todas las variables hemodinámicas que corresponden a su tiempo y se anexaron como sus datos de referencia.

Tabla 6.1 lista de 14 clases de diferentes etapas en los experimentos realizados en el presente protocolo animal ^{Nota 1}.

| Clase | Etapas | Código |
|-------|---|--------|
| 1 | Mediciones de base, o antes de oclusión | 0 |
| 2 | Espectro a 1 hora de oclusión total | 11 |
| 3 | Espectro a 2 horas de oclusión total | 12 |
| 4 | Espectro a 3 horas de oclusión total | 13 |
| 5 | Espectro a 4 horas de oclusión total | 14 |
| 6 | Espectro a 1 hora de reperfusión después 1 hora de oclusión | 20 |
| 7 | Espectro a 2 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión | 21 |
| 8 | Espectro a 3 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión | 23 |
| 9 | Espectro a 1 hora de reperfusión después 2 hora de oclusión | 26 |
| 10 | Espectro a 2 horas de reperfusión después 2 hora de oclusión | 27 |
| 11 | Espectros post muerte en el grupo experimental (control) | 31 |
| 12 | Espectros post muerte en el grupo de reperfusión a 1 hora de oclusión | 32 |
| 13 | Espectros post muerte en el grupo de reperfusión a 2 hora de oclusión | 33 |
| 14 | Espectros post muerte en el grupo de oclusión total | 34 |

Nota 1: las primeras 10 clases son el objetivo de estudio y comparación en esta parte de la tesis.

Tabla 6.2 lista de los últimos 18 experimentos realizados con el protocolo animal.

| No. Sujeto | Grupo | Descripción del experimento | Tipo de sondas ¹ | PHi ² | Oclusión AMS | Resultado experimento |
|------------|-------|--|-----------------------------|------------------|--------------|------------------------|
| 19 | 4 | Obstrucción total 240 minutos | A, B | Sí | Sí | Éxito |
| 20 | 1 | control (mediciones de base) | A, B | Sí | No | Éxito |
| 21 | 3 | Reperusión después 2 horas de oclusión | A, B | No | Sí | Éxito |
| 22 | 2 | Reperusión después 1 hora de oclusión | A, B | Sí | Sí | Éxito |
| 23 | 4 | Obstrucción total 240 minutos | A, B | Sí | Sí | Éxito |
| 24 | 2 | Reperusión después 1 hora de oclusión | A, B | Sí | Sí | Sin éxito ³ |
| 25 | 2 | Reperusión después 1 hora de oclusión | A, B | Sí | Sí | Sin éxito ⁴ |
| 26 | 3 | Reperusión después 2 horas de oclusión | A, B | No | Sí | Sin éxito ⁵ |
| 27 | 2 | Reperusión después 1 hora de oclusión | A, B | Sí | Sí | Sin Éxito ⁶ |
| 28 | 3 | Reperusión después 2 horas de oclusión | A | Sí | Sí | Éxito |
| 29 | 1 | control (mediciones de base) | A | Sí | Sí | Éxito |
| 30 | 3 | Reperusión después 2 horas de oclusión | A | Sí | Sí | Éxito |
| 31 | 4 | Obstrucción total 240 minutos | A | Sí | Sí | Sin Éxito ⁷ |
| 32 | 1 | control (mediciones de base) | A | Sí | Sí | Éxito |
| 33 | 2 | Reperusión después 1 hora de oclusión | A | Sí | Sí | Éxito |
| 34 | 4 | obstrucción total 240 minutos | A | Sí | Sí | Éxito |
| 35 | 2 | reperusión después 1 hora de oclusión | A | Sí | Sí | Éxito |
| 36 | 1 | control (medicines de base) | A | Sí | No | Éxito |

Nota:

¹ Tipo de sonda (sección 3.3.8):

- 1 A: sonda con cuatro electrodos de plata, 5.4mm de diámetro, 0.5 mm de ancho y 1.5mm de separación entre electrodo.
- 2 B: sonda con cuatro electrodos de plata, 5.4mm de diámetro, 1.5 mm de ancho y 4 mm de separación entre electrodo.

Para el análisis de resultados se utilizaron los datos de la sonda A.

² mediciones de la pHi del tejido Sí/No.

³ los intestinos parecieron dañados desde el inicio del experimento, el pHi inicio muy bajo 6.85, y hubo mucho contenido gástrico alrededor de las sondas al fin del experimento. Se diluye mucho la sangre del animal de tanta solución salina inyectada durante el curso del experimento.

⁴ El animal no estaba en ayuno, choque de temperatura y falso contacto con la tierra.

⁵ Espectros erróneos, con picos debido a contacto con tierra de la mesa de cirugía.

⁶ la reperusión fue limitada porque el Sensor del flujómetro estaba ocluyendo la arteria mesentérica superior. Problemas de ventilación y baja en el suministro de oxígeno.

⁷ estomago con mucho contenido sólido e intestino llenos de contenido gástrico. Además de complejidad en la cirugía y perdida de alrededor de 20 ml de sangre.

En la siguiente lista se presenta una codificación para clasificar los tipos de mediciones de espectros y las sondas en la base de datos adquirida en los experimentos.

Identificación de Espectros o tipos de mediciones utilizadas en las tablas y base de datos.

- 0 : Espectro en vivo antes de oclusión
- 1 : Espectro en vivo con oclusión
- 2 : Espectro en vivo con Reperusión
- 3 : Espectro en el animal muerto
- 4 : Espectro de referencia (Calibración usando la resistencia de referencia)
- 5 : Espectro en solución Salina
- 6 : Espectro no Conocido
- 7 : Espectro en vivo con intestino fuera de Animal

Codificación de Sonda

- Sonda tipo A = 1
- Sonda tipo B = 2
- Sonda tipo C = 3

Ejemplo

- Sonda #1 tipo A: 1A = 11
- Sonda #1 tipo B: 1B = 21
- Sonda #3 tipo A: 3A = 13
- Sonda #5 tipo B: 5B = 25

6.2. Resultados de mediciones Hemodinámicas

Esta sección esta dedicada a la representación típica de algunos datos de mediciones Hemodinámicas en el tejido vivo durante los experimentos con oclusión (obstrucción de perfusión) total y reperfusión después de diferentes tiempos de oclusión, durante 4 horas de mediciones. Los resultados incluyen los promedios y desviaciones estándares de los variables de interés de todos los datos medidos en los experimentos incluidos. Las variables como el flujo sanguino en la arteria mesentérica superior, la frecuencia cardiaca, la resistencia vascular sistémica, la Presión de Oxígeno arterial y el bicarbonato arterial mediados son graficados en el tiempo de medición separados por grupo. El promedio y la desviación estándar se realizo para los datos de mediciones por intervalos de tiempo de 30 minutos.

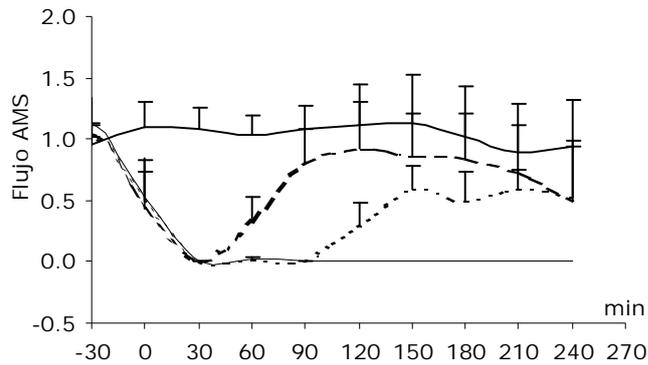


Figura 6.1. *diagrama que muestra los promedios y desviaciones estándares del flujo sanguíneo en la arteria mesentérica superior separadas por grupo en el tiempo de mediciones: grupo1 (línea sólida), grupo2 (línea con rayas), grupo3 (línea punteada), y grupo4 (línea fina). El tiempo 0 es el inicio de oclusión, la reperfusión en el grupo2 inicia a los 60 minutos, y en el grupo 3 a los 120 minutos.*

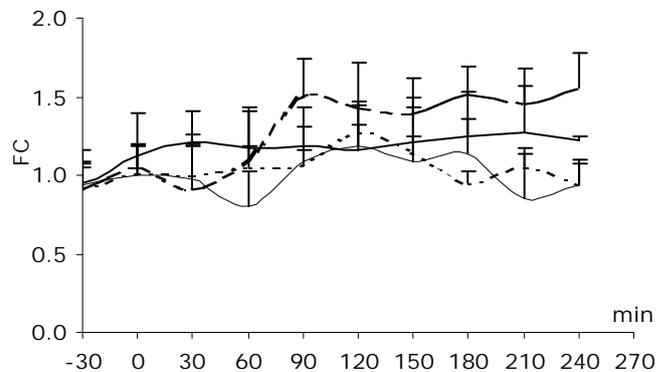


Figura 6.2. *diagrama que muestra los promedios y desviaciones estándares de las frecuencias cardiacas mediadas en el tiempo separadas por grupo: grupo1 (línea sólida), grupo2 (línea con rayas), grupo3 (línea punteada), y grupo4 (línea fina). El tiempo 0 es el inicio de oclusión, la reperfusión en el grupo2 inicia a los 60 minutos, y en el grupo 3 a los 120 minutos.*

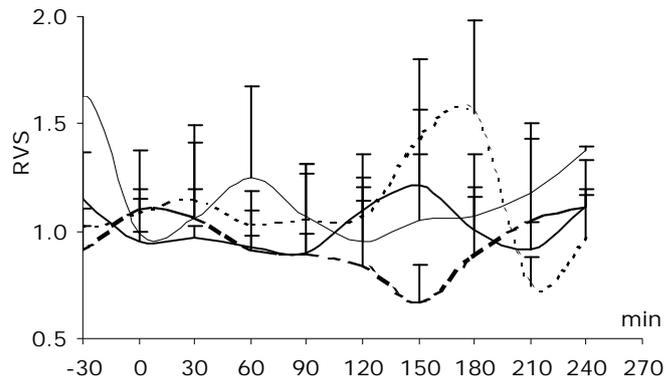


Figura 6.3. diagrama que muestra los promedios y desviaciones estándares de la Resistencia Vascular sistemática para el tiempo separadas por grupo: grupo1 (línea sólida), grupo2 (línea con rayas), grupo3 (línea puntuada), y grupo4 (línea fina). El tiempo 0 es el inicio de oclusión, la reperusión en el grupo2 inicia a las 60 minutos, y en el grupo 3 a las 120 minutos.

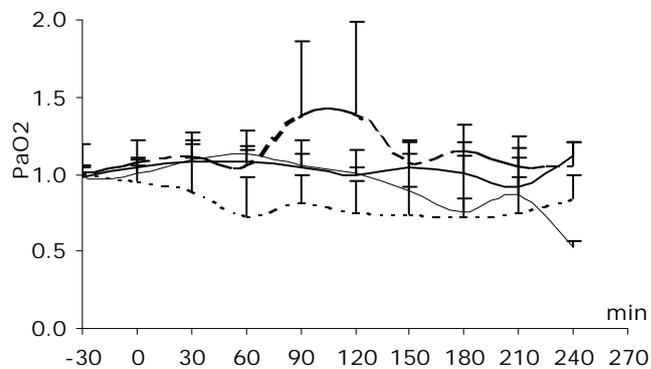


Figura 6.4. diagrama que muestra los promedios y desviaciones estándares de la Presión Parcial de Oxígeno arterial mediados en el tiempo, separados por grupo: grupo1 (línea sólida), grupo2 (línea con rayas), grupo3 (línea puntuada), y grupo4 (línea fina). El tiempo 0 es el inicio de oclusión, la reperusión en el grupo2 inicia a los 60 minutos, y en el grupo 3 a los 120 minutos.

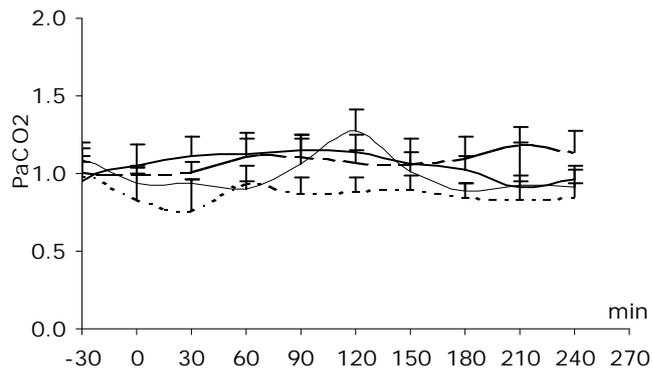


Figura 6.5. diagrama que muestra el promedio y desviaciones estándares de la Presión Parcial de bicarbonato arterial mediados en el tiempo separadas por grupo: grupo1 (línea sólida), grupo2 (línea con rayas), grupo3 (línea puntuada), y grupo4 (línea fina). El tiempo 0 es el inicio de oclusión, la reperusión en el grupo2 inicia a los 60 minutos, y en el grupo 3 a los 120 minutos.

6.3. Resultados de mediciones de pHi

La grafica 6.6. presenta mediciones del pHi en el intestino de cuatro diferentes animales y grupos experimentales.

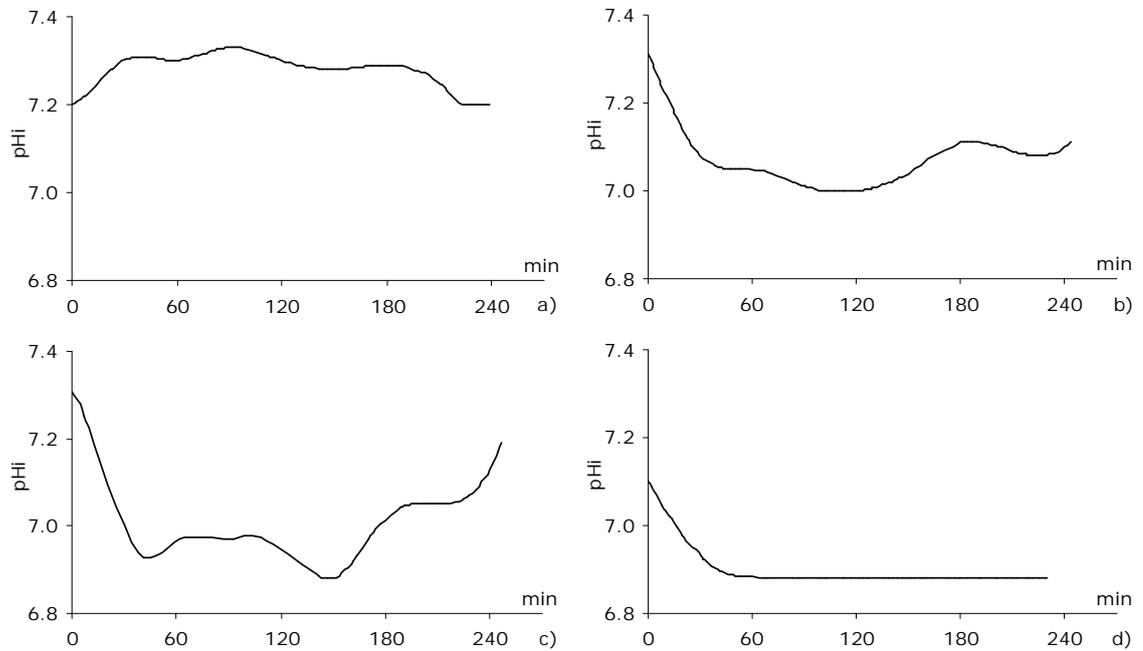


Figura 6.6. graficas típicas de las mediciones de pHi en tejido intestinal en cuatro experimentos de grupos diferentes: a) mediciones de pHi en grupo control, "experimento # 20"; b) mediciones de pHi de un experimento del segundo grupo, isquemia con reperusión después de 1 hora de oclusión total, "experimento #22"; c) mediciones de pHi en experimento del tercer grupo, isquemia con reperusión después de 2 horas de oclusión total, "experimento # 30"; y d) mediciones de pHi en experimento del cuarto grupo isquemia a cuatro horas de oclusión total y sin reperusión, "experimento #34".

6.4. Resultados del Algoritmo de calculo del Nivel de Daño Isquémico NDI

La certidumbre de medición del pHi en el tejido es crucial para cuantificar el nivel de isquemia y por consiguiente el nivel de daño isquémico usando el algoritmo desarrollado para esta tesis (sección 5.1.). Sin embargo, las mediciones del pHi muestran un alto nivel de variaciones en los experimentos registrados. En la misma forma el Índice de Daño Isquémico IDI propuesto y calculado en base al pHi tendrá las variaciones correspondientes. Aquí se muestran comparaciones de graficas promedios del pHi medido en tejido gastrointestinal y el índice de daño isquémico IDI calculados y promediados por grupos de experimentación según el protocolo animal.

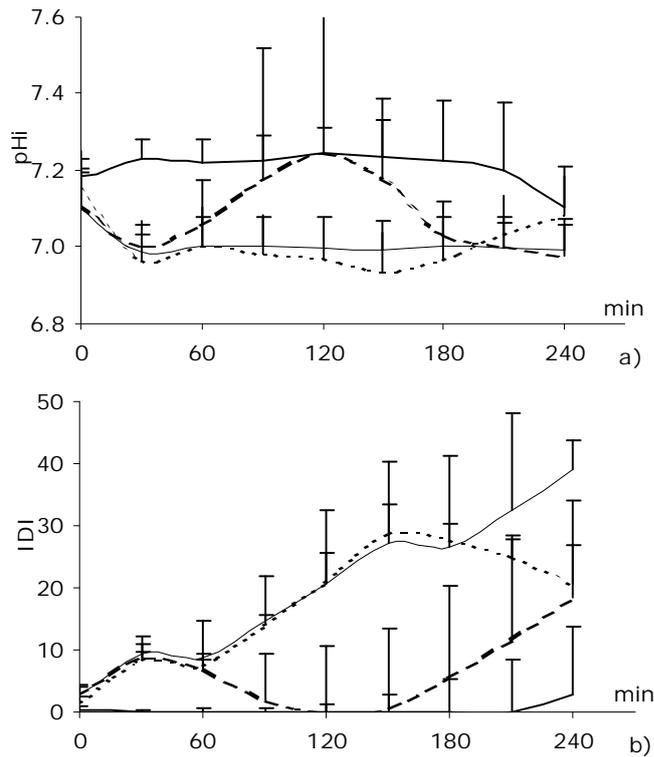


Figura 6.7. Esquemas de graficas de los valores promedios y desviaciones estándares cada 30 minutos y por grupo experimental de los parámetros de pHi medidos en tejido intestinal vivo, e índice de daño isquémico IDI calculados durante 240 minutos para todos los experimentos incluidos. La gráfica a) muestra los promedios por grupo del pHi; y b) el Índice de Daño Isquémico IDI calculado de los valores promedios del pHi anteriores usando el algoritmo propuesto en esta tesis. Grupo 1 o grupo control (líneas sólidas); Grupo 2 o grupo de reperusión a 1 hora de oclusión total (líneas con rayas); Grupo 3 o grupo de reperusión a 2 hora de oclusión total (líneas punteada), y Grupo 4 o grupo de 4 hora de oclusión total (líneas finas).

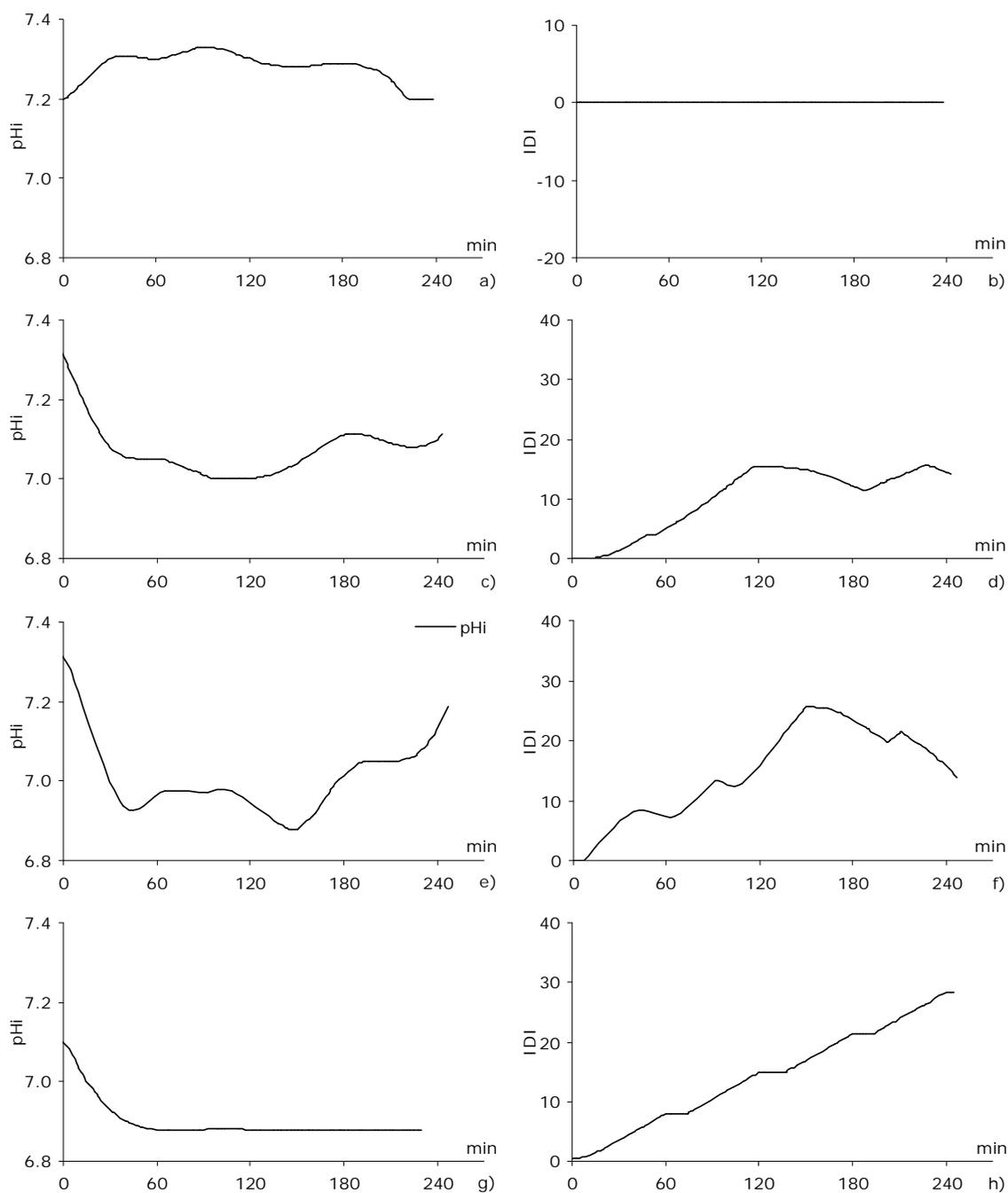


Figura 6.8. comparación entre resultados de los parámetros de pH_i medidos en tejido vivo y los Índices de Daño Isquémico correspondientes contra el tiempo durante 240 minutos en cuatro experimentos diferentes. Cada experimento es de un grupo de estudio animal diferente: las graficas a) y b) muestran los resultados del pH_i y el Índice de daño isquémico respectivamente en el experimento #20, y grupo 1 control; c) y d) son resultados del pH_i y Índice de daño isquémico respectivamente en el experimento #22, grupo 2 mediciones de isquemia con reperfusión a 1 hora de oclusión total; e) y f) son resultados del pH_i y Índice de daño isquémico respectivamente en el experimento #30, grupo 3 mediciones de isquemia con reperfusión a 2 horas de oclusión total; y las graficas finales g) y h) son resultados del pH_i y Índice de daño isquémico respectivamente en el experimento #34, grupo 4 mediciones de isquemia a 4 horas de oclusión total".

6.5. Resultados de mediciones de espectroscopia de impedancia

La mayoría de esta sección esta dedicada a la representación típica de los datos de mediciones de impedancia en el tejido intestinal vivo durante experimentos con oclusión total y reperfusión después de diferentes tiempos de oclusión y en 4 horas de la inducción de isquemia. Estos resultados son muy importantes para el desarrollo del algoritmo para la medición y calculo del índice de daño isquémico. Los datos están presentados para mostrar algunas propiedades básicas de las mediciones de espectroscopia de impedancias en experimentos de control y reperfusión.

6.5.1. Representación de resultados en el dominio de tiempo

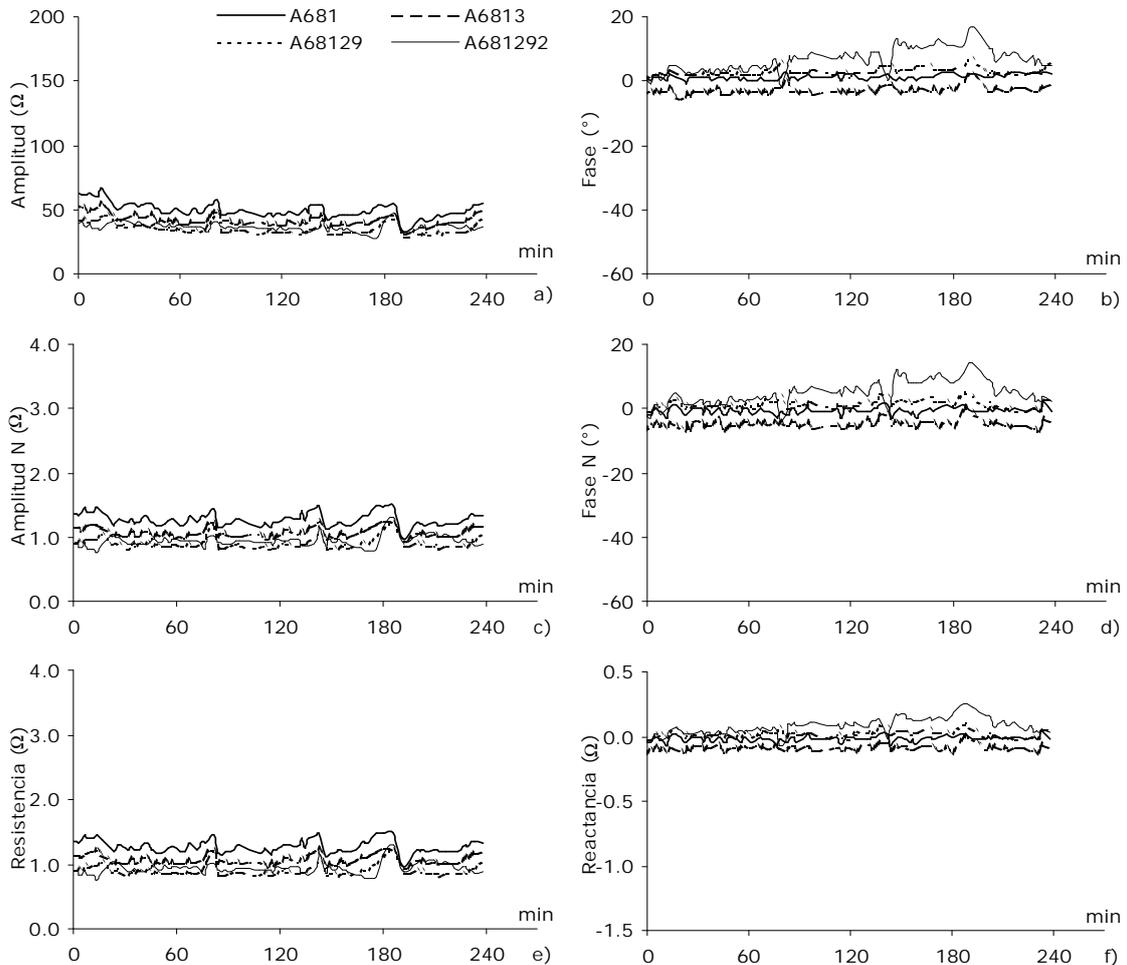


Figura 6.9. graficas típicas de impedancia en tejido intestinal en el caso de mediciones de base (control) durante 240 minutos, sin isquemia. Seis presentaciones de los parámetros de la impedancia compleja están graficadas en el tiempo: a) Amplitudes de impedancia medidas en tejido intestinal vivo; b) fases de la impedancia medidas en tejido intestinal vivo; c) Amplitudes normalizada de la impedancia; d) fases normalizada de la impedancia; e) las resistencias; y f) las reactancias. Cada grafica tiene esquemas de resultados de mediciones a cuatro frecuencias: 681 Hz (línea sólida), 6.81kHz (línea con rayas), 68.13kHz (línea puntuada), y 681.29kHz (línea fina). Experimento # 20 con sonda tipo A, numero 1 (sonda 11), grupo 1. la resistencia y reactancia están calculados de los datos de amplitudes y fase normalizados. Las amplitudes se normalizan proporcionalmente a la amplitud de la frecuencia 464.159kHz, y la fase relativamente a la fase con frecuencia de 464 Hz.

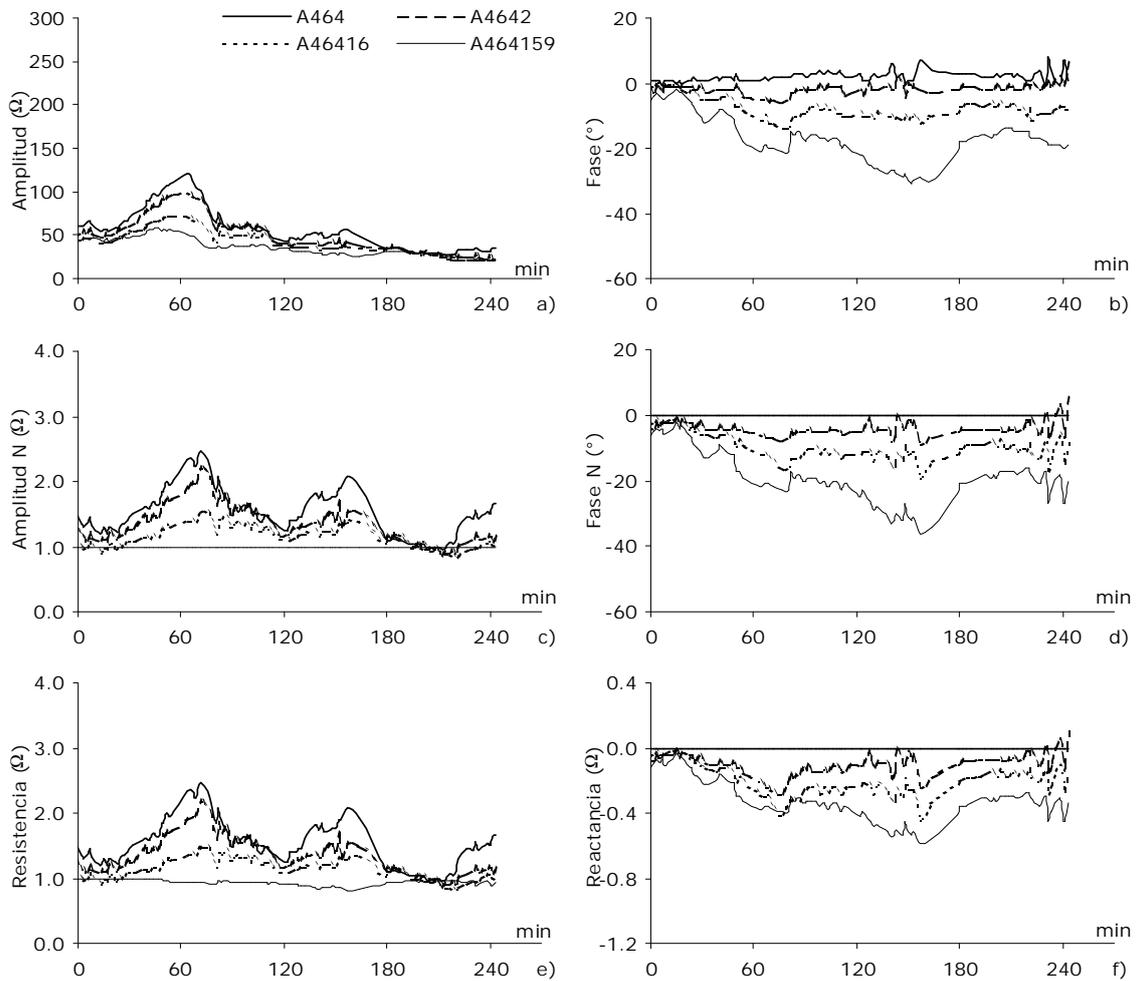


Figura 6.10. graficas típicas de impedancia en tejido intestinal en el segundo grupo de reperfusión después 1 hora de oclusión. La isquemia fue introducida en el tiempo 0, la reperfusión en el tiempo 60 minutos y el tiempo máximo de mediciones es 240 minutos. Seis presentaciones de los parámetros de la impedancia compleja están graficadas en el tiempo: a) Amplitudes de impedancia medidas en tejido intestinal vivo; b) fases de la impedancia medidas en tejido intestinal vivo; c) Amplitudes normalizadas de la impedancia; d) fases normalizadas de la impedancia; e) las resistencias; y f) las reactancias. Cada grafica tiene esquemas de resultados de mediciones a cuatro frecuencias: 681 Hz (línea sólida), 6.81kHz (línea con rayas), 68.13kHz (línea puntuada), y 681.29kHz (línea fina). Experimento #22 con sonda tipo A, numero 6 (sonda 16), grupo 2. la resistencia y reactancia están calculados de los datos de amplitudes y fase normalizados. Las amplitudes se normalizan proporcionalmente a la amplitud de la frecuencia 464.159kHz, y la fase relativamente a la fase con frecuencia de 464 Hz.

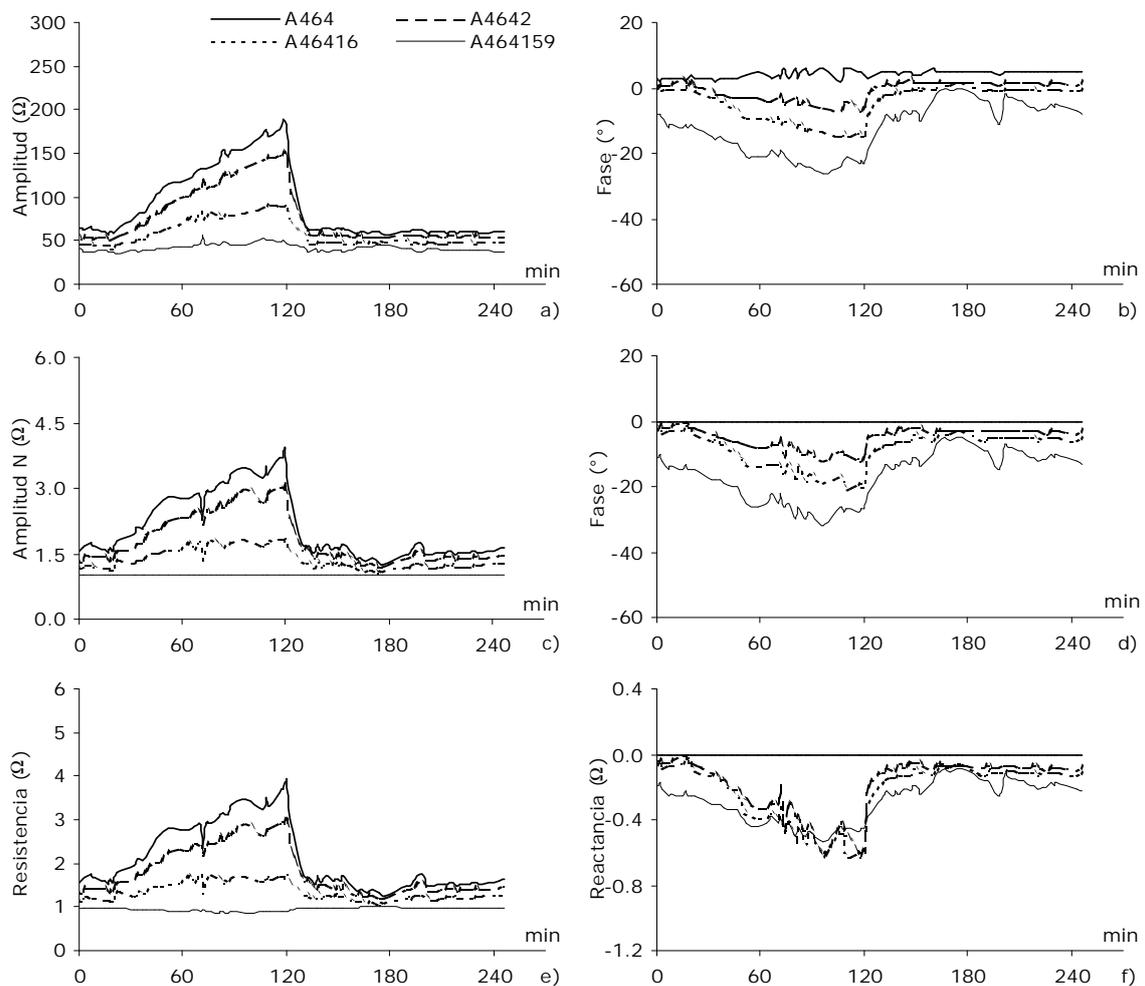


Figura 6.11. gráficas típicas de impedancia en tejido intestinal en el tercer grupo de reperusión después de 2 horas de oclusión. La oclusión fue introducida en el tiempo 0, la reperusión en el tiempo 120 minutos y el tiempo máximo de mediciones es 240 minutos. Seis presentaciones de los parámetros de la impedancia compleja están graficadas en el tiempo: a) Amplitudes de impedancia medidas en tejido intestinal vivo; b) fases de la impedancia medidas en tejido intestinal vivo; c) Amplitud normalizada de la impedancia; d) fase normalizada de la impedancia; e) resistencias; y f) la reactancias. Cada grafica tiene esquemas de resultados de mediciones a cuatro frecuencias: 681 Hz (línea sólida), 6.81kHz (línea con rayas), 68.13kHz (línea puntuada), y 681.29kHz (línea fina). Experimento #28 con sonda tipo A, numero 6 (sonda 16), grupo 3. la resistencia y reactancia están calculados de los datos de amplitudes y fase normalizados. Las amplitudes se normalizan proporcionalmente a la amplitud de la frecuencia 464.159kHz, y la fase relativamente a la fase con frecuencia de 464 Hz.

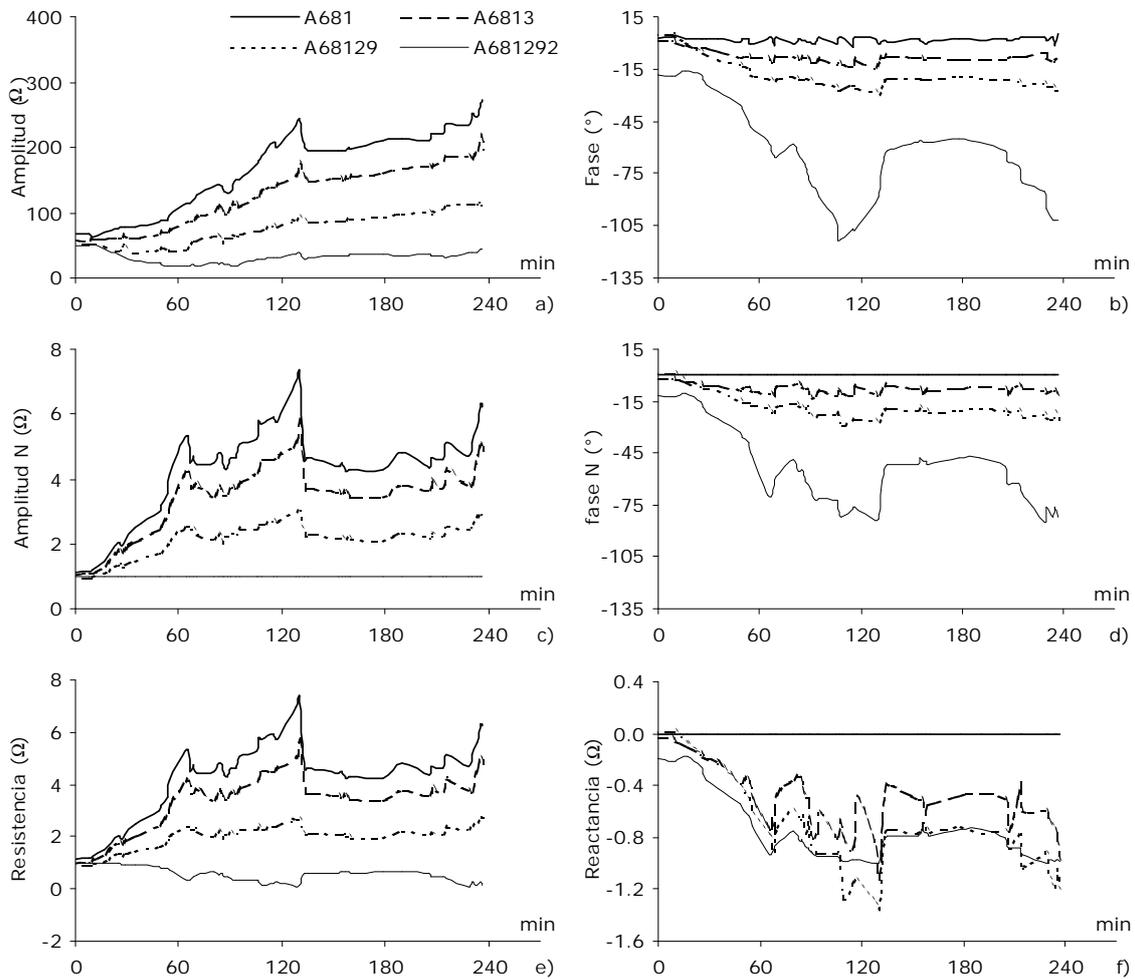


Figura 6.12. graficas típicas de impedancia en tejido intestinal en el cuarto grupo de oclusión total durante 240 minutos. La isquemia fue introducida en el tiempo 0, y sin reperusión. Seis presentación de los parámetros de la impedancia compleja están graficadas en el tiempo: a) Amplitud de impedancia como salida real; b) fase de la impedancia, salida real; c) Amplitud normalizada de la impedancia; d) fase normalizada de la impedancia; e) resistencia; y f) la reactancia. Cada grafica tiene esquemas de resultados de mediciones a cuatro frecuencias: 681 Hz (línea sólida), 6.01kHz (línea con rayas), 68.13kHz (línea puntuada), y 681.29kHz (línea fina). Experimento # 34 con sonda tipo A, numero 6 (sonda 16), grupo 4. las amplitudes están normalizados proporcionalmente a la amplitud a la frecuencia 464.159kHz, y la fase relativamente a la fase con frecuencia de 464 Hz.

En las gráficas típicas de impedancia en tejido intestinal a diferentes grados de daño isquémico presentados en las figuras anteriores, cada gráfica inicia con el tiempo 0, instante cuando se indujo la isquemia, conforme progresa el tiempo de la oclusión la isquemia y daño isquémico se hacen más profundos.

Los resultados anteriores muestran que la impedancia cambia relativamente rápido con el progreso de la isquemia. Cambios relativos de amplitudes de impedancias con frecuencias bajas son mayores a cambios relativos de amplitudes de impedancia con frecuencias altas. Los cambios en la amplitud de la impedancia y la resistencia son muy similares. Valores de ambos parámetros se aumentan con la isquemia. Los cambios en la fase de impedancia y la reactancia son un poco diferentes. Sin embargo, ambos tienden de bajar con isquemia.

Las mediciones varían significativamente en diferentes experimentos del mismo grupo, o en el mismo experimento con diferentes sondas. Sin embargo, un patrón de respuesta principal es identificado y comparado en las figuras anteriores. Siempre las amplitudes de impedancia aumentan con el progreso del tiempo de la abstracción total del suministro de sangre del tejido celular (Oclusión de la Arteria Mesentérica superior) y la fase decrece. Una observación importante es la respuesta de la impedancia a la reperfusión sanguínea al tejido después de una hora o dos horas de oclusión de la arteria mesentérica superior, los espectros tienden a parecerse a los espectros de control.

Una característica observada importante es el retraso en tiempo de la inducción de isquemia y el momento cuando la impedancia medida aumenta, el tiempo de retraso dentro la inducción de reperfusión y el tiempo de la reacción en los parámetros de impedancia medidos en el tejido. El tiempo del cambio en la impedancia varía entre experimento, algunas veces el cambio es inmediato y rápido, otras veces es lento ó tardado.

En la figura 6.13. se muestra comparaciones entre espectros de amplitudes de impedancia en tejido intestinal con experimentos de sujetos diferentes que son del mismo grupo experimental y las mediciones realizada en la misma generación de sondas.

En la Figura 6.14. se muestran comparaciones de espectros de amplitudes de impedancia en tejido intestinal de los mismos experimentos y a diferentes sondas que son de la misma generación.

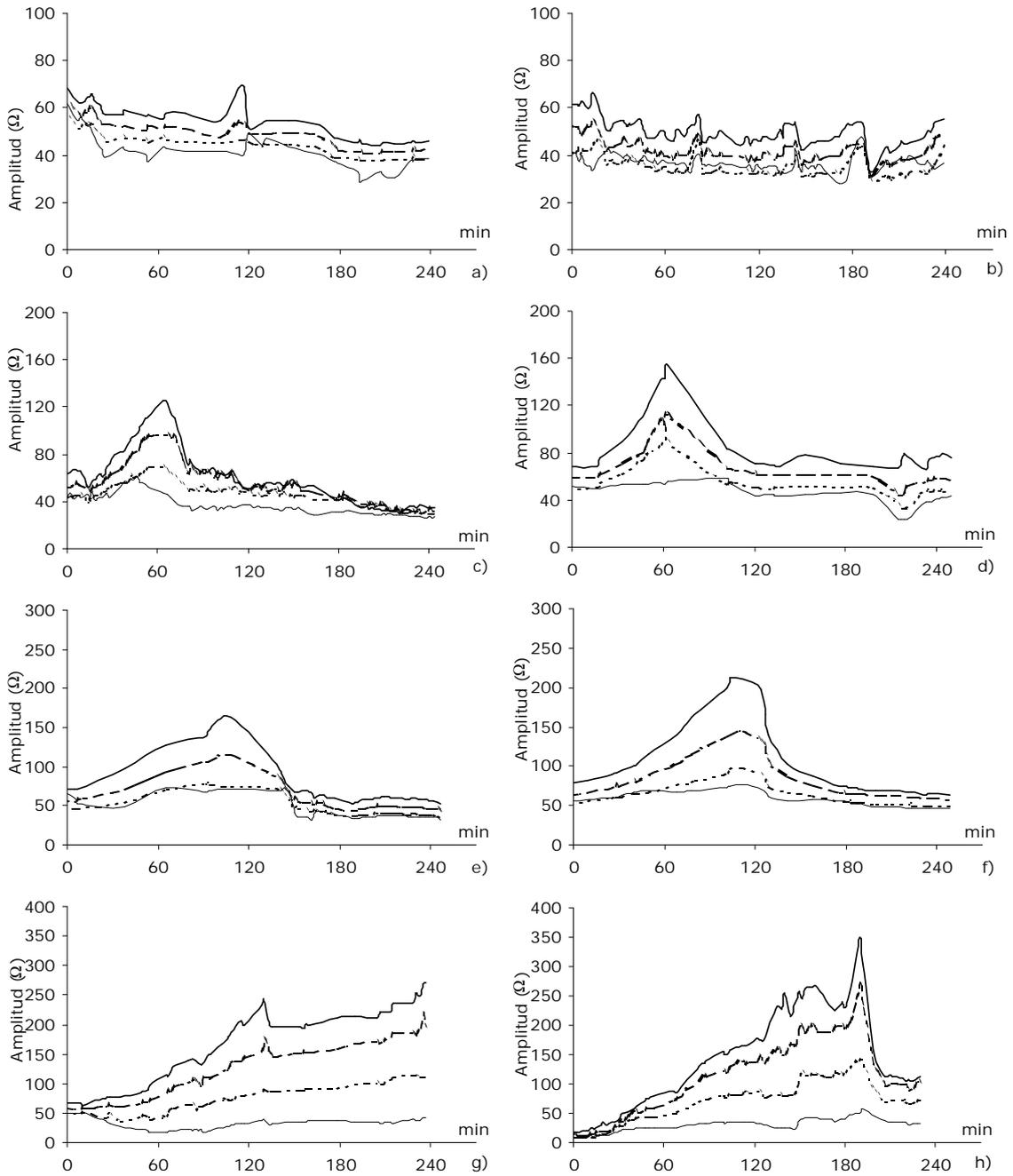


Figura 6.13. presentaciones de graficas de amplitudes de impedancia medidas en tejido intestinal vivo durante 240 minutos. Las dos graficas en la misma linea son de dos diferentes experimentos que tiene el mismo grupo del protocolo animal y usando sondas de la misma generacion. En cada columna de graficas se muestran espectros de experimentos de grupos diferentes: a) y b) resultados de amplitudes en experimento #36, y experimento #20 respectivamente, ambos del grupo #1 "control"; c) y d) resultados de amplitudes en experimento #22, y experimento #33 respectivamente, ambos del grupo #2 "mediciones de ischemia con reperfusion despues de 1 hora de oclusion total"; e) y f) resultados de amplitudes en experimento #30 y experimento #28 respectivamente del grupo #3 "mediciones de ischemia con reperfusion despues de 2 hora de oclusion total"; g) y h) resultados de amplitudes del experimento #34, y experimento #19 respectivamente del grupo #4 "mediciones de ischemia a 4 hora de oclusion total". Cada grafica tiene esquemas de amplitudes medidas a cuatro frecuencias: 681 Hz (linea solida), 6.81kHz (linea con rayas), 68.13kHz (linea puntuada), y 681.29kHz (linea fina).

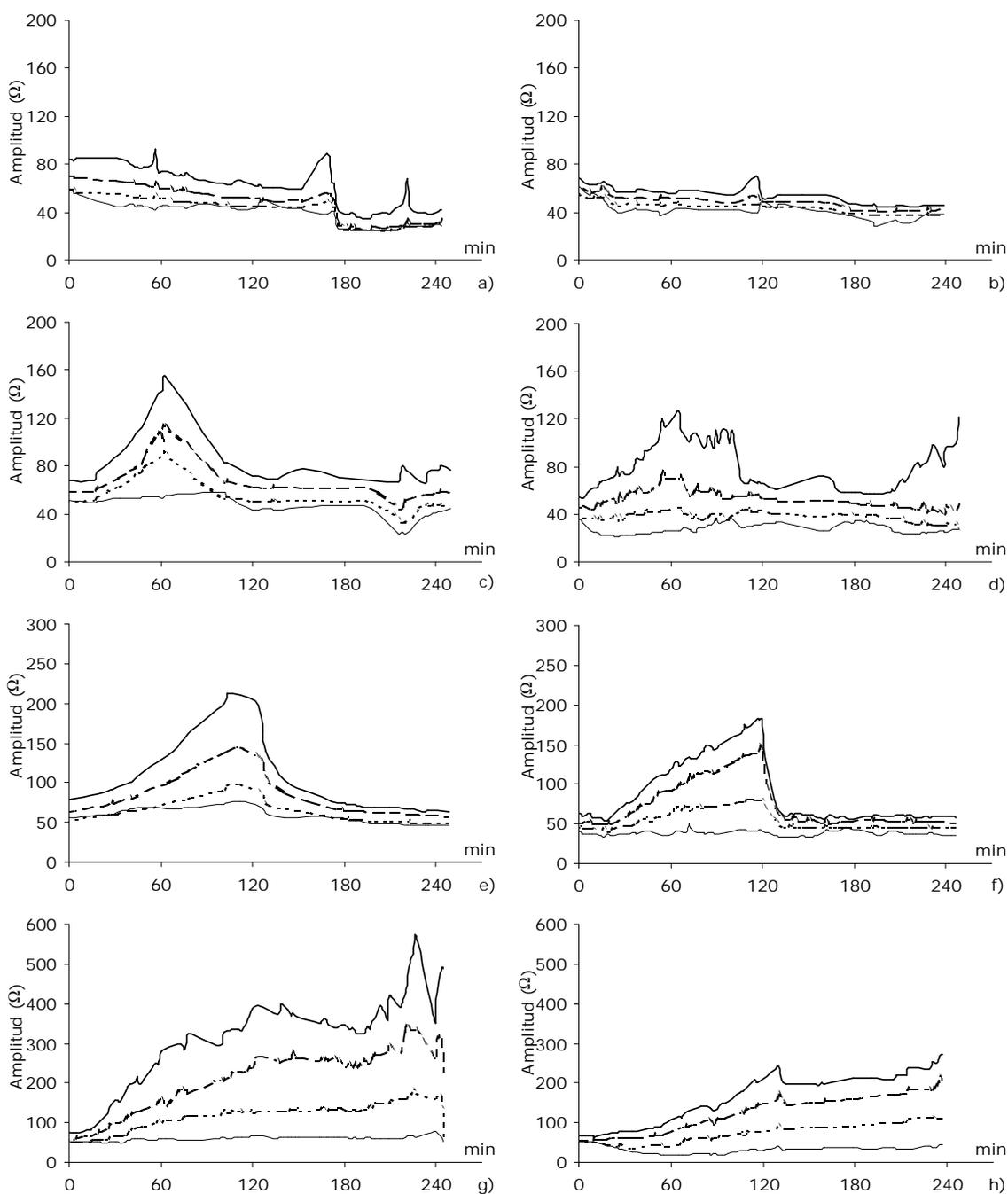


Figura 6.14. presentaciones de graficas de amplitudes de impedancia medidas en tejido intestinal vivo durante 240 minutos. Las dos graficas en la misma linea son resultados con dos diferentes sondas en el mismo experimento, las sondas son de la misma generaci3n. En cada columna de graficas se muestran datos de experimentos de grupos diferentes: las graficas a) y b) resultados de amplitudes en el experimento #36 del grupo #1 "control", con las sondas #11, y #13 respectivamente; c) y d) resultados de amplitudes en el experimento #33 del grupo #2 "mediciones de ischemia con reperfusi3n despu3s de 1 hora de oclusi3n total", con las sondas #11, y #16 respectivamente; e) y f) resultados de amplitudes en el experimento #28, grupo #3 "mediciones de ischemia con reperfusi3n despu3s de 2 hora de oclusi3n total", con las sondas #11, y #16 respectivamente; g) y h) resultados de amplitudes en el experimento #34 del grupo #4 "mediciones de ischemia a 4 hora de oclusi3n total", con las sondas #11, y #13 respectivamente. Cada grafica tiene esquemas de amplitudes medidas a cuatro frecuencias: 681 Hz (linea s3lida), 6.81kHz (linea con rayas), 68.13kHz (linea puntuada), y 681.29kHz (linea fina).

6.5.2. Representación de Resultados en el dominio de frecuencia

Presentaciones espectrales típicas de los parámetros de impedancias medidos en tejido isquémico en las figuras 6.15, 6.16. cada grafica tiene curvas de impedancia compleja registradas con cinco instantes del tiempo separados alrededor de una hora entre mediciones: al momento de la introducción de la isquemia “tiempo cero”; después de una hora de isquemia, al momento de la reperfusión en el segundo grupo del experimento animal; después de dos horas de isquemia en los últimos dos grupos del protocolo animal, a una hora de reperfusión en el segundo grupo y al momento de la reperfusión en el tercer grupo; después de tres horas de isquemia en el cuarto grupo del protocolo animal y a dos horas y una hora de reperfusión en el segundo y tercer grupo respectivamente; Después de cuatro horas de isquemia en el cuarto grupo y a tres horas y dos horas de reperfusión en el segundo y tercer grupo respectivamente, así como antes de la eutanasia del animal al finalizar el experimento. Los tiempos de los espectros mostrados no están separados por una hora exacta, se aproximó al tiempo registrado más cercano al instante de tiempo de referencia.

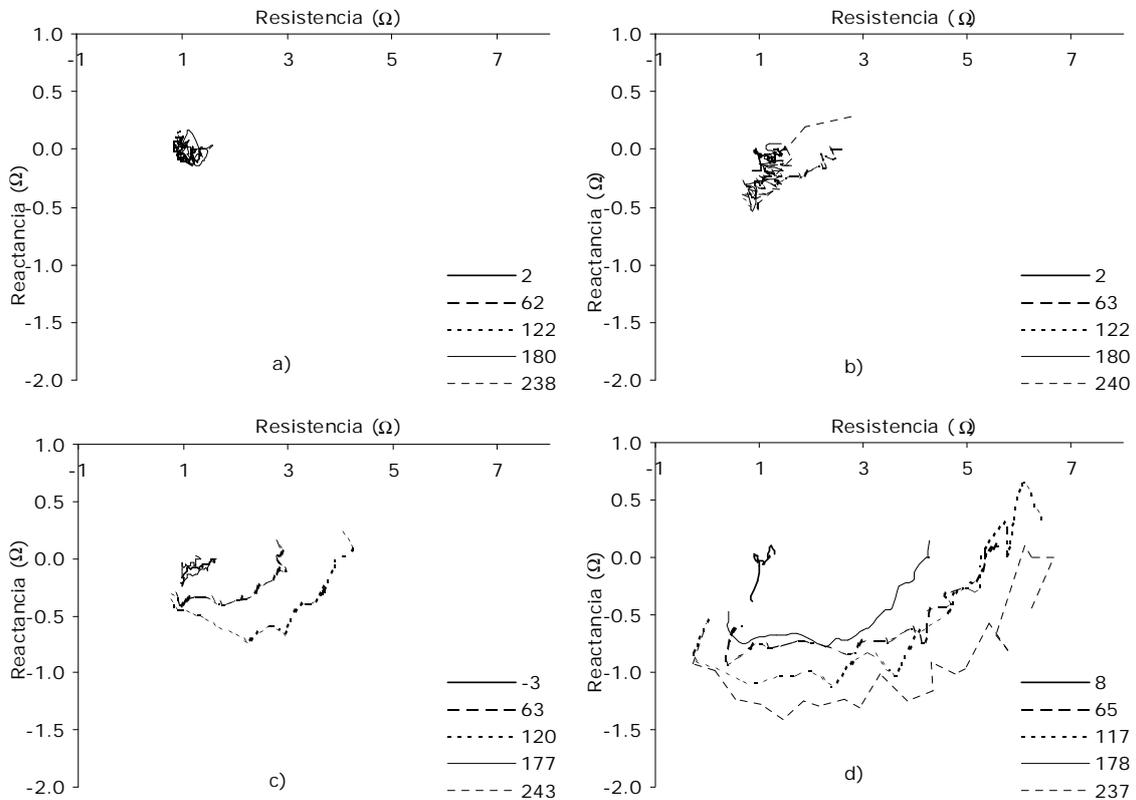


Figura 6.15. Gráficas típicas de espectros de impedancia compleja en tejido intestinal registrados a cinco instantes de tiempo separados por aproximadamente una hora. Cada grafica corresponde a un grupo experimental diferente: a) espectros de reactancia contra resistencia en el experimento #20 sonda #11, y grupo control; b) espectros de reactancia contra resistencia en el experimento #22 sonda #16 y grupo de isquemia con reperfusión a 1 hora de oclusión; c) espectros de reactancia contra resistencia en el experimento #28 sonda #16 y grupo de isquemia con reperfusión a 2 horas de oclusión; d) espectros de reactancia contra resistencia en el experimento #34 sonda #13 y grupo de isquemia a cuatro horas de oclusión. Tiempo inicial (línea sólida), a 1 hora (línea con rayas), a dos horas (línea puntuada), a tres horas (línea fina), y a cuatro horas (línea con rayas fina). Se escogieron los espectros en tiempos los más cercanos a las horas indicadas.

La Figura 6.16. tiene graficas de amplitudes de impedancia contra el logaritmo de frecuencia. La dispersión β puede ser reconocida fácilmente (ver capitulo 2) en todas las etapas de isquemia y daño isquémico. Las amplitudes de impedancia incrementan significativamente con la isquemia a todo el rango de frecuencias. Sin embargo el incremento en las amplitudes a bajas frecuencias es mayor y mucho mas claro que el incremento a altas frecuencias donde es mínimo.

En las graficas de fase de impedancia contra el logaritmo de la frecuencia. También, la dispersión β es fácilmente reconocido en todas las etapas de la isquemia. Las fases de impedancia decrecen significativamente con la isquemia a todo el rango de frecuencias. Sin embargo el cambio con la isquemia en la fase a frecuencias intermedias y altas es mayor y mucho mas claro que a bajas frecuencias donde el cambio es mínimo.

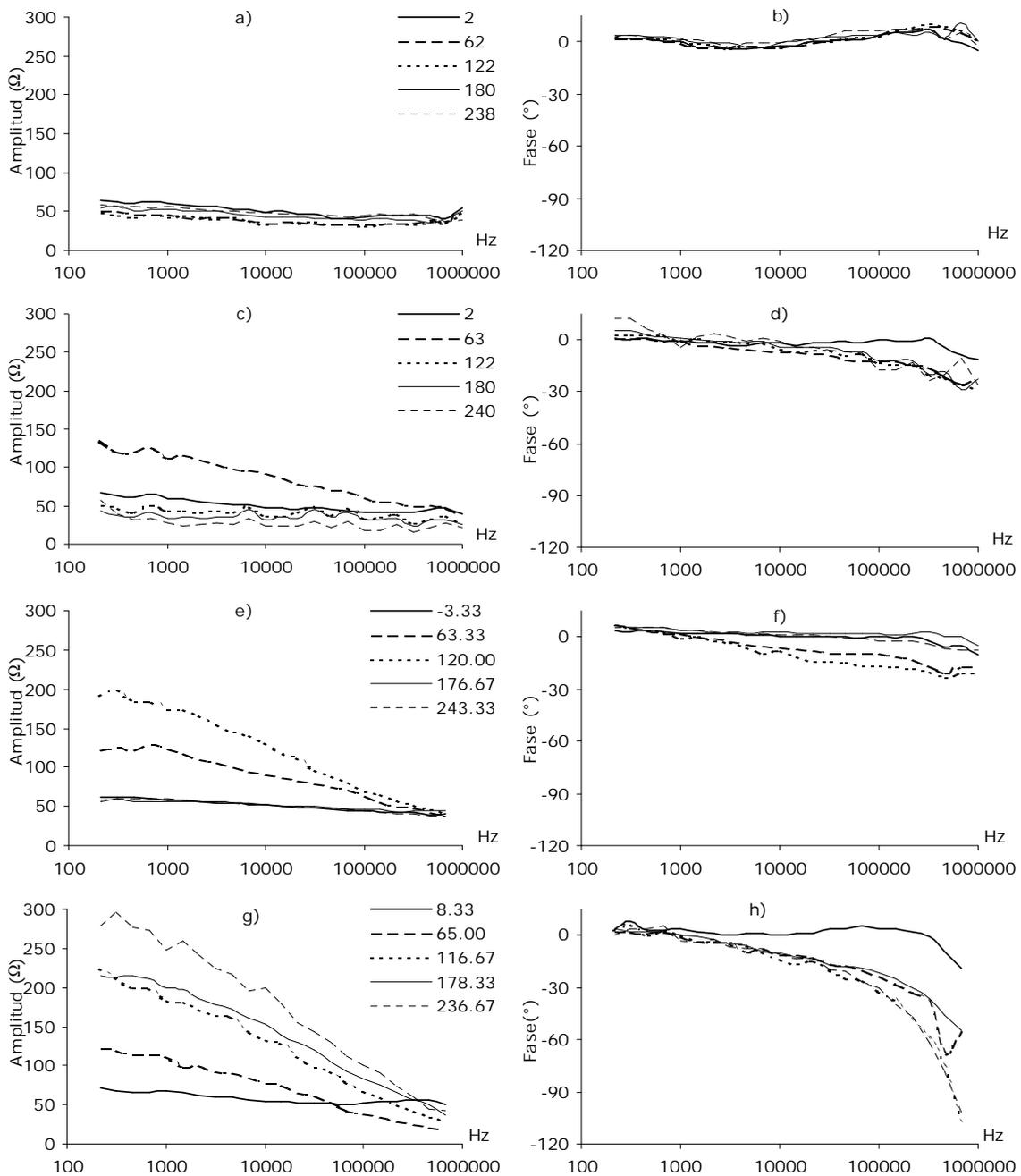


Figura 6.16. graficas típicas de espectros de impedancia en tejido intestinal registrados a cinco instantes de tiempo separados por aproximadamente una hora de periodo. Cada grafica es de un experimento correspondiente a un grupo diferente: a) y b) espectros de amplitudes y fases respectivamente del experimento #20, sonda #11, y grupo control; c) y d) espectros de amplitudes y fases respectivamente del experimento #22, sonda #16, y grupo de isquemia con reperfusion a 1 hora de oclusion; e) y f) espectros de amplitudes y fases respectivamente del experimento #28, sonda #16 en el grupo de isquemia con reperfusion a 2 hora de oclusion; g) y h) espectros de amplitudes y fases respectivamente del experimento #34, sonda #13, y grupo de isquemia con 4 horas de oclusion y sin reperfusion. Tiempo inicial (linea sólida), a 1 hora (linea con rayas), a dos horas (linea puntuada), a tres horas (linea fina), y a cuatro horas (linea con rayas fina). Se escogieron los espectros en los tiempos más cercanos a las horas indicadas.

6.6. Resumen de Resultados de Mediciones de Espectroscopia de Impedancia

Comparación de mediciones promedias cada 30 minutos de las amplitudes de espectroscopia de impedancia a una frecuencia de 68 KHz.

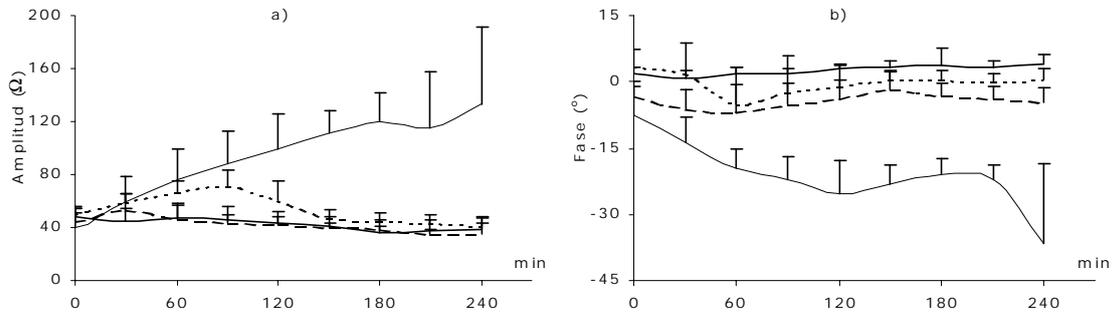


Figura 6.17. *diagrama que muestra los promedios y desviaciones estándares de las amplitudes y fases a la frecuencia de 68129 Hz en el tiempo, medidos en tejido gastrointestinal separadas por grupo: grupo1 (línea sólida), grupo2 (línea con rayas), grupo3 (línea puntuada), y grupo4 (línea fina).*

En la figura 6.18, Se presentan gráficas promedio por grupo de las amplitudes y fases de impedancia medidas para los cuatro grupos experimentales, se selecciona una frecuencia para cada década en el rango de frecuencias de mediciones.

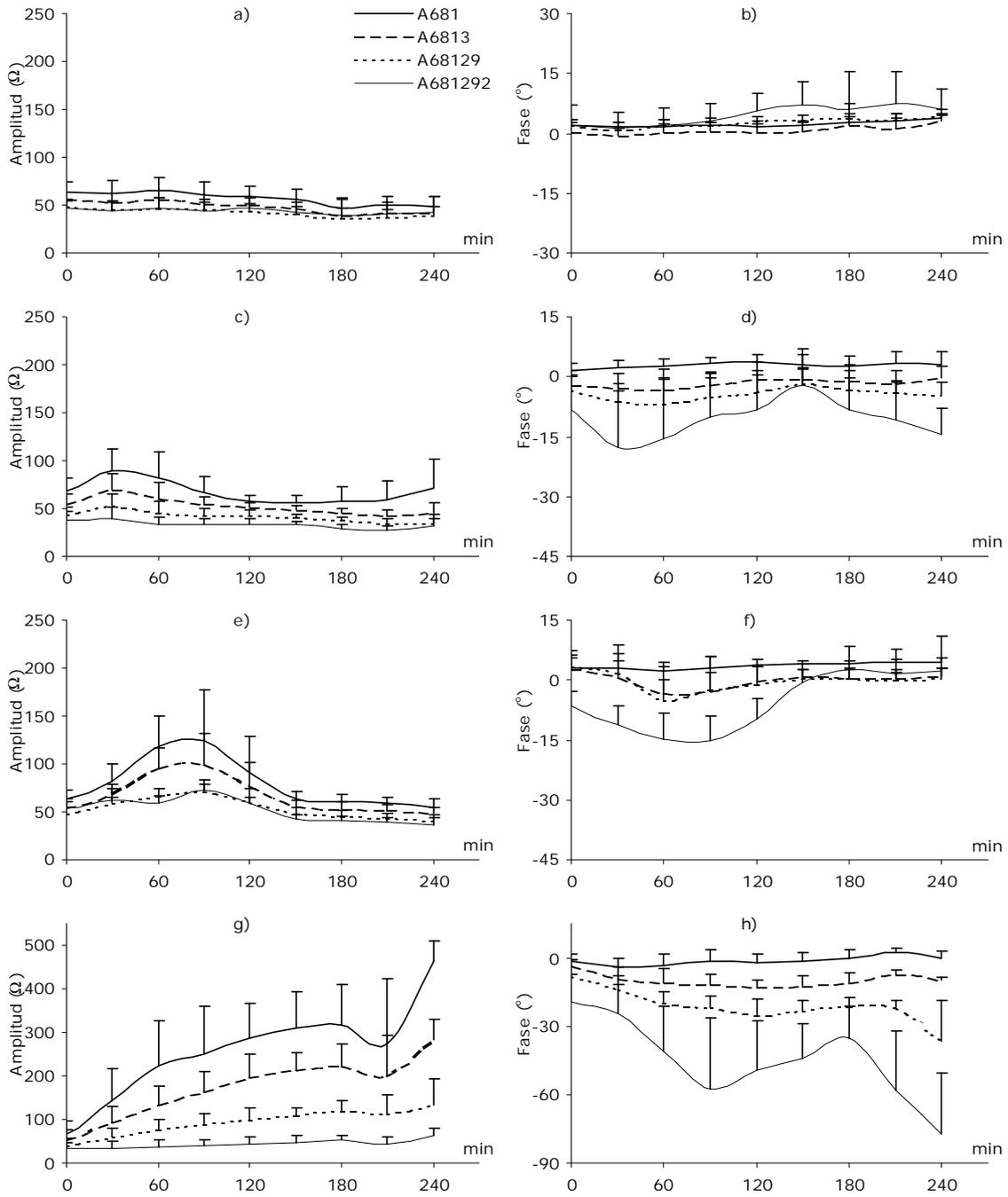


Figura 6.18. presentaciones de graficas de amplitudes y fases de impedancia medidas en tejido intestinal vivo durante 240 minutos, promediadas por tiempo de 30 minutos y para los cuatro grupos: a) y b) resultados promedios de amplitudes y fases respectivamente del grupo #1 "control"; c) y d) resultados promedios de amplitudes y fases respectivamente del grupo #2 "isquemia con reperfusión después de 1 hora de oclusión total"; e) y f) resultados promedios de amplitudes y fases respectivamente del grupo #3 "isquemia con reperfusión después de 2 hora de oclusión total"; g) y h) resultados promedios de amplitudes y fases respectivamente del grupo #4 "isquemia a 4 hora de oclusión total". Cada grafica tiene esquemas de amplitudes y fases promediadas a cuatro frecuencias: 681 Hz (línea sólida), 6.81kHz (línea con rayas), 68.13kHz (línea puntuada), y 681.29kHz (línea fina).

6.7. Resultados del Modelo de impedancia propuesto para el tejido.

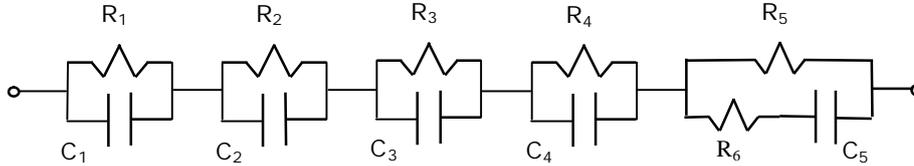


Figura 6.19. Esquema del modelo de tejido biológico con 5 constantes de tiempo diferentes utilizado en esta tesis. Las capacitancias $C_1=3.3E-06$ F, $C_2=1.0E-06$ F, $C_3=1.0E-07$ F, $C_4=1.0E-08$ F, y $C_5=1.0E-09$ F. Las resistencias en el circuito R_1, R_2, \dots, R_6 están estimados para cada espectro medido en tejido vivo usando el algoritmo descenso por gradiente (sección 4.3).

Los parámetros del modelo extraídos que caracterizan el tejido medido pueden ser usados para la descripción y análisis de ciertas propiedades del tejido. Muchos cambios químicos y estructurales en el tejido pueden ser observados a través de los cambios en los parámetros del modelo. También, la estimación de los resultados medidos a un modelo reduce el ruido, los errores sistémicos y aumenta la certidumbre de la medición. Por lo anterior, los resultados de mediciones de impedancia del tejido (presentados en secciones anteriores) son ajustados a un modelo propuesto (figura 6.19) con cinco constantes de tiempo diferentes: $\tau_1 = R_1 C_1$, $\tau_2 = R_2 C_2$, $\tau_3 = R_3 C_3$, $\tau_4 = R_4 C_4$, $\tau_5 = (R_5 + R_6) * C_5$. En el algoritmo para la estimación del modelo se fijaron las capacitancias a los siguientes valores: $C_1=3.3E-06$ F, $C_2=1.0E-06$ F, $C_3=1.0E-07$ F, $C_4=1.0E-08$ F, y $C_5=1.0E-09$ F. El algoritmo de descenso por gradiente fue usado para la estimación de valores de las resistencias en el modelo. Para cada espectro de impedancia medido en tejido intestinal (capítulo 5.3), se estimaron las seis resistencias del modelo así, con capacitancias propuestas se puede recalcular cualquiera otro parámetro de impedancia como amplitudes o fases a cualquiera frecuencia simulando el funcionamiento del tejido.

Las curvas de resistencias, reactancias, amplitudes y/o fases calculadas o ajustadas en el modelo y las lineales medidas en tejido vivo correspondientes están presentadas en las figuras 6.20, y 6.21. se puede notar que las curvas ajustadas aproximan muy bien los datos medidos. En el rango de altas frecuencias, los datos medidos y modelados empiezan a desviarse. Esta desviación es dependiente a la isquemia y el funcionamiento del instrumento, varía de un experimento a otro. La diferencia dentro los datos medidos y modelados puede ser positiva o negativa. La importancia de fijar un modelo fue evaluada sobre los datos experimentales, con la siguiente hipótesis: Se puede concluir que los espectros de impedancia medidos y modelados están relacionados linealmente. La estadística de correlación fue usada para este propósito. En todos los experimentos realizados, la probabilidad calculada para el rechazo de la hipótesis propuesto fue debajo de $p < 0.05$. Este indica que los conjuntos de datos están relacionados linealmente. Los resultados de correlación entre parámetros medidos en vivo y estimados en el modelo que corresponden respectivamente están presentados en la tabla 6.3.

Características de los parámetros del modelo de impedancias del tejido

Los parámetros del modelo extraídos y los parámetros característicos de la impedancia medidos en tejido varían con la isquemia, una de los cambios en los parámetros del modelo comparado con los de la impedancia medida están presentes en la Figura 6.20.

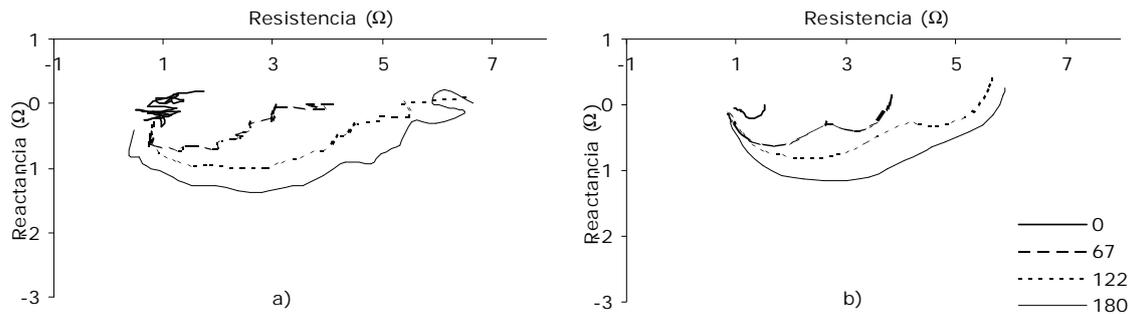


Figura 6.20. comparaciones espectrales en el plano Nyquist entre parámetros de mediciones en tejido intestinal y parámetros calculados en el modelo respectivamente: grafica a) espectros de la reactancia contra resistencia de datos medidos en vivo; y b) espectros de las reactancias contra resistencias con datos calculados en el modelo propuesto y que corresponden a los datos en la grafica a. Los espectros de comparación están a cuatro diferente instantes de tiempo separados por alrededor de una hora; tiempo inicial de la isquemia (línea sólida), a 1 hora (línea con rayas), a dos horas (línea puntuada), y a tres horas (línea fina). Los datos son del experimento #19 sonda #16.

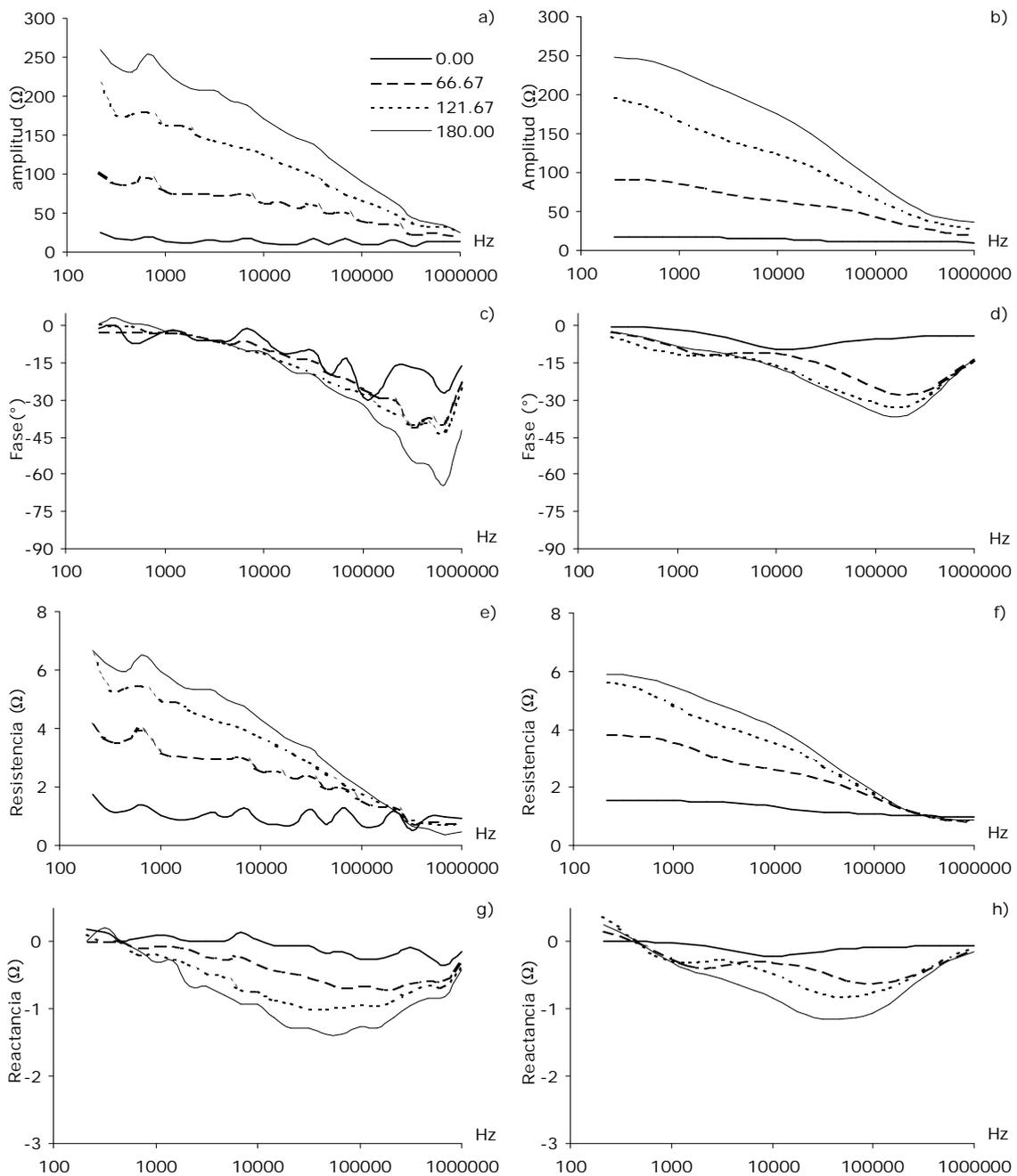


Figura 6.21. comparaciones espectrales entre parámetros medidos en tejido intestinal y parámetros calculados en el modelo respectivamente: grafica a) y b) espectros de amplitudes contra el logaritmo de frecuencias para datos medidos en vivo y estimados en el modelo respectivamente; c y d) espectros de fases contra el logaritmo de frecuencias para datos medidos en vivo y estimados en el modelo respectivamente; e) y f) espectros de resistencias contra el logaritmo de frecuencias para datos medidos en vivo y estimados en el modelo respectivamente; g y h) espectros de reactancias contra el logaritmo de frecuencias para datos medidos en vivo y estimados en el modelo respectivamente. Los espectros de comparación están a cuatro diferente instantes de tiempo separados por alrededor de una hora; Tiempo inicial de la isquemia (línea sólida), a 1 hora (línea con rayas), a dos horas (línea puntuada), y a tres horas (línea fina). Los datos son del experimento #19 sonda #16.

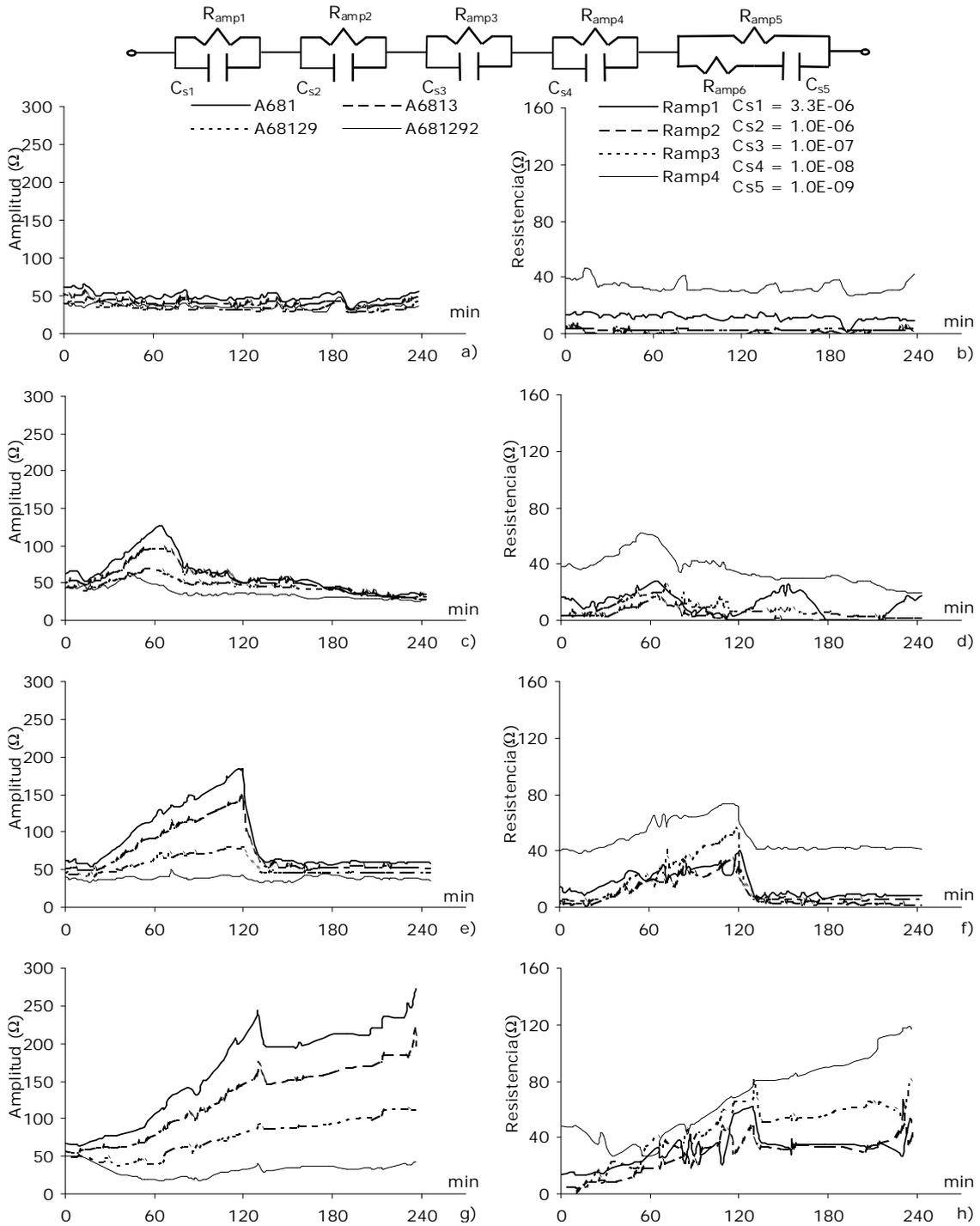


Figura 6.22. graficas que muestran los típicos cambios en el tiempo de las amplitudes de impedancia medidos en tejido intestinal a cuatro frecuencias de décadas diferentes; comparados con valores de las primeras cuatro resistencias estimadas del modelo para el mismo tejido y que corresponden a los sujetos de los datos de amplitudes indicados: las graficas a) y b) amplitudes medidos y resistencia estimadas de experimento #20, sonda #11, y grupo #1 de control; c) y d) amplitudes medidos y resistencia estimadas de experimento #22, sonda #16, y grupo #2; e) y f) amplitudes medidos y resistencia estimadas de experimento #28, sonda #16, y grupo #3; g) y h) amplitudes medidos y resistencia estimadas de experimento #34 sonda #13, y grupo #4. las amplitudes a frecuencia 681Hz (línea sólida), a frecuencia 6.81KHz (línea con rayas), a frecuencia 68.1KHz (línea puntuada), y a frecuencia 681KHz (línea fina). Los datos de resistencia estimados del modelo: Ramp1 (línea sólida), Ramp2 (línea con rayas), Ramp3 (línea puntuada), y Ramp4 (línea fina).

Tabla 6.3. presenta los resultados de correlación entre parámetros de impedancia medidos en el tejido intestinal y sus correspondientes parámetros calculados desde las variables estimadas del modelo.

| Correlaciones (tabla_todosidis_28agosto02.sta) Las correlaciones marcadas * no son significativas ($p < 0.05$) | | | | | | | |
|---|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Orden | Parámetros medidos en vivo | Parámetros calculados en el modelo | Coefficiente De Correlación | Orden | Parámetros medidos en vivo | Parámetros calculados en el modelo | Coefficiente De Correlación |
| 1 | A215 | A215_M | 0.995691 | 24 | F215 | F215_M | -0.40041 |
| 2 | A316 | A316_M | 0.996049 | 25 | F316 | F316_M | -0.19149 |
| 3 | A464 | A464_M | 0.997696 | 26 | F464 | F464_M | 0.012235* |
| 4 | A681 | A681_M | 0.997613 | 27 | F681 | F681_M | 0.098923 |
| 5 | A1000 | A1000_M | 0.997956 | 28 | F1000 | F1000_M | 0.235905 |
| 6 | A1468 | A1468_M | 0.998061 | 29 | F1468 | F1468_M | 0.345229 |
| 7 | A2154 | A2154_M | 0.997787 | 30 | F2154 | F2154_M | 0.441642 |
| 8 | A3162 | A3162_M | 0.998308 | 31 | F3162 | F3162_M | 0.551487 |
| 9 | A4642 | A4642_M | 0.997795 | 32 | F4642 | F4642_M | 0.656472 |
| 10 | A6813 | A6813_M | 0.996331 | 33 | F6813 | F6813_M | 0.786533 |
| 11 | A10000 | A10000_M | 0.997631 | 34 | F10000 | F10000_M | 0.839334 |
| 12 | A14678 | A14678_M | 0.998186 | 35 | F14678 | F14678_M | 0.891345 |
| 13 | A21544 | A21544_M | 0.997332 | 36 | F21544 | F21544_M | 0.911862 |
| 14 | A31623 | A31623_M | 0.995641 | 37 | F31623 | F31623_M | 0.926681 |
| 15 | A46416 | A46416_M | 0.995567 | 38 | F46416 | F46416_M | 0.905075 |
| 16 | A68129 | A68129_M | 0.991041 | 39 | F68129 | F68129_M | 0.924067 |
| 17 | A100000 | A100000_M | 0.991753 | 40 | F100000 | F100000_M | 0.862056 |
| 18 | A146780 | A146780_M | 0.988743 | 41 | F146780 | F146780_M | 0.865557 |
| 19 | A215443 | A215443_M | 0.977728 | 42 | F215443 | F215443_M | 0.871408 |
| 20 | A316228 | A316228_M | 0.941953 | 43 | F316228 | F316228_M | 0.820773 |
| 21 | A464159 | A464159_M | 0.869715 | 44 | F464159 | F464159_M | 0.723012 |
| 22 | A681292 | A681292_M | 0.749686 | 45 | F681292 | F681292_M | 0.556265 |
| 23 | A1000000 | A1000000_M | 0.624756 | 46 | F1000000 | F1000000_M | 0.397511 |

* los parámetros de fase a la frecuencia de 464 Hz, medida en tejido "F464", y Calculada en el modelo "F464_M" no están significativamente correlacionados ($p < 0.05$).

En la Tabla 6.3. Se observa que las correlaciones entre parámetros de amplitudes medidos en tejido intestinal vivo, y los correspondientes parámetros de amplitudes calculados en el modelo propuesto son muy grandes. La correlación entre parámetros de fases medidos en tejido intestinal vivo, y los correspondientes parámetros de fases calculados en el modelo propuesto son grandes en la mayoría de los parámetros, existe una correlación muy pequeña con parámetros de frecuencias bajas a fase de 464Hz, la correlación no tiene significancia estadística ($p < 0.05$).

6.8. Análisis Estadísticos

En la tabla 6.4. están presentados los resultados de la clasificación propuesta por Clase de los espectros o casos medidos en el tejido intestinal en los experimentos incluidos con éxito. La tabla incluye el Índice para cada clase, su código propuesto en la Tabla 6.1 en este capítulo, y número de casos o espectros que están incluidos en cada clase.

Tabla 6.4.

| Clases | | Código | Número de casos |
|-------------------------|--|--------|-----------------|
| 1 | Mediciones de base, o antes de oclusión | 0 | 708 |
| 2 | Espectro a 1 hora de oclusión total | 11 | 271 |
| 3 | Espectro a 2 horas de oclusión total | 12 | 165 |
| 4 | Espectro a 3 horas de oclusión total | 13 | 85 |
| 5 | Espectro a 4 horas de oclusión total | 14 | 86 |
| 6 | Espectro a 1 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión | 21 | 109 |
| 7 | Espectro a 2 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión | 22 | 86 |
| 8 | Espectro a 3 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión | 23 | 111 |
| 9 | Espectro a 1 hora de reperfusión después 2 hora de oclusión | 26 | 76 |
| 10 | Espectro a 2 horas de reperfusión después 2 hora de oclusión | 27 | 88 |
| Número de casos totales | | | 1785 |

Tabla 6.5. están mostrados los límites de los 4 intervalos de Niveles de daño isquémico NDI clasificados desde los valores de Índices de daño isquémico IDI, los cuales son calculados por el algoritmo correspondiente desde los valores medidos de pHi.

| NDI | Número de casos total*: 1653 | | | |
|-----------------|------------------------------|-------------------|--------------------|------------|
| Nivel | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Valores límites | $IDI \leq 3$ | $3 < IDI \leq 15$ | $15 < IDI \leq 25$ | $25 < IDI$ |
| Número de casos | 796 | 495 | 223 | 139 |

* hay 132 casos que no tienen resultados de pHi, y IDI en la tabla de resultados finales "sujeto #21".

Tabla 6.6. están mostrados los límites de los 4 intervalos propuestos* de Niveles de pHi "NpHi", clasificados desde los valores de pHi medidos en tejido vivo para los experimentos incluidos en los resultados (ver Tabla 6.2.).

| NpHi | Número de casos total*: 1651 | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Nivel | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Valores límites | $pHi \geq 7.09$ | $7.09 > pHi \geq 6.99$ | $6.99 > pHi \geq 6.91$ | $6.91 > pHi$ |
| Número de casos | 796 | 495 | 224 | 136 |

* los 4 intervalos están propuestos sin mucha de criterios científicos, nada mas para la simulación de los cuatro niveles de NDI, en la tabla anterior, para realizar las comparaciones estadísticas correspondientes.

Tabla 6.7. promedios, desviaciones estándares, valores máximos, valores mínimos, y varianzas de algunos parámetros selectos de impedancia tisular características del tejido en isquemia con oclusión (datos de todos los sujetos del grupo 4 incluidos en el protocolo de experimentación de la Tabla 6.2.).

| Parámetros | Promedio | Std | max | min | varianza |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A681 | 157.0751 | 127.0591 | 570 | 16.9 | 16144.02 |
| A6813 | 111.8736 | 78.04313 | 342 | 16.3 | 6090.73 |
| A68129 | 70.16574 | 35.07073 | 181 | 15 | 1229.956 |
| A681292 | 44.06423 | 16.90852 | 98.2 | 13.9 | 285.8981 |
| F681 | -0.10705 | 3.949076 | 10 | -12 | 15.5952 |
| F6813 | -5.0932 | 6.818267 | 8 | -22 | 46.48877 |
| F68129 | -10.4282 | 11.83826 | 8 | -56 | 140.1445 |
| F681292 | -22.8829 | 27.83977 | 18 | -114 | 775.0525 |
| Resi681 | 3.397612 | 2.477599 | 14.96021 | 0.641115 | 6.138496 |
| Resi6813 | 2.398713 | 1.369185 | 7.801673 | 0.659004 | 1.874668 |
| Resi68129 | 1.473896 | 0.460756 | 3.036344 | 0.71192 | 0.212296 |
| Resi681292 | 0.81276 | 0.309249 | 1.641346 | -0.40599 | 0.095635 |
| React681 | -0.05183 | 0.200997 | 0.825853 | -1.17817 | 0.0404 |
| React6813 | -0.34058 | 0.399156 | 0.373128 | -1.49967 | 0.159326 |
| React68129 | -0.37771 | 0.422908 | 0.149618 | -1.889 | 0.178851 |
| React681292 | -0.30919 | 0.328228 | 0.313097 | -1.53754 | 0.107734 |
| Ramp1 | 38.40551 | 51.24323 | 463.2652 | 0.049523 | 2625.869 |
| Ramp2 | 30.79045 | 44.60421 | 327.4715 | 0.085835 | 1989.536 |
| Ramp3 | 40.29526 | 47.69714 | 237.7265 | 0.85817 | 2275.017 |
| Ramp4 | 65.99696 | 43.76562 | 228.9151 | 8.580309 | 1915.43 |
| Ramp5 | 2.08E+54 | 4.15E+55 | 8.26E+56 | 1.256426 | 1.7E+111 |
| Ramp6 | 2.08E+54 | 4.15E+55 | 8.26E+56 | 1.256426 | 1.7E+111 |

Tabla 6.7. Presenta algunos parámetros de impedancia medidos en tejido isquémico como amplitudes y fases "una medición a una frecuencia de cada década", variables de resistencias y reactividades calculadas desde los datos de amplitudes y fases normalizadas "una medición en cada década", la seis resistencias estimadas en el modelo eléctrico propuesto del tejido Ramp1 – Ramp6; Donde la estimación es ajustando los datos de amplitudes medidos en tejido vivo.

6.8.1. Análisis de Significancia

El análisis de significancia estadística se realiza usando un paquete de estadística comercial "STATISTICA".

En este parte se trata de contestar dos hipótesis principales: 1) que los cambios en las medidas de la espectroscopia de impedancia en tejido vivo con isquemia inducida durante un tiempo determinado son estadísticamente significativos; y 2) que aquellos cambios mejor representan niveles de daño isquémico que niveles de isquemia en el tejido bajo estudio.

El análisis de varianzas es una prueba estadística para analizar si más de dos grupos difieren significativamente entre sí en cuanto a sus medias y varianzas. La hipótesis propuesta que los cambios en los parámetros de espectroscopia de impedancia son estadísticamente significativos: a) a diferentes clases agrupando los espectros debido al tipo de isquemia inducida y su tiempo por horas [ver la tabla 6.1.]; b) a diferentes niveles de isquemia "niveles de la pHi"; y c) a diferentes niveles de Daño isquémico NDI; Y cuales parámetros que mejor presentan estos cambios, y cuales no.

En la Tabla 6.8. están mostrados los efectos principales del análisis multivariado MANOVA entre los parámetros de espectroscopia de impedancia y todos los grupos de clasificación mencionados anteriormente. Se toman como variables independientes: 1- la Clase de cada espectro (clasificado por grupo experimental, tipo de espectro, y tiempos), "CALSE"; 2- el Nivel de isquemia referido al nivel de pHi en el tejido, "NPHI"; y 3- el nivel de Daño Isquémico, "NDI"; Se elimina o se controla el efecto de los sujetos y sonadas tomándolos como variables de covarianza. Las variables dependientes son los parámetros de la espectroscopia de impedancia como los datos de amplitudes y fase medidos en el tejido gastrointestinal a todas las frecuencias del espectro "A215-A1000000, y F215-F1000000"; las variables derivadas de las amplitudes y fases como las amplitudes y fase normalizadas "A215_N-A1000000_N, F215_N-F1000000_N"; Las resistencias y reactancias calculadas de los amplitudes y fases normalizados "RESI215- RESI 1000000, REACT215- REACT1000000"; promedios por década de amplitudes "PROMAMPI, PROMAMPII, PROMAMPIII, PROMAMPIV"; promedios por década de resistencias " RESI_I, RESI_II, RESI_III, RESI_IV"; promedios por década de reactancias "REACT_I, REACT_II, REACT_III, REACT_IV; las pendientes calculados de los valores promediados por décadas con diferentes combinaciones de amplitudes "PDAMPI_II, PDAMPI_III, PDAMPI_IV, PDAMPII_III, PDAMPII_IV, PDAMPIII_IV"; las pendientes de resistencias "PDRESII_II, PDRESII_III, PDRESII_IV, PDRESIII_III, PDRESIII_IV, PDRESIII_IV"; las pendientes de reactancias "PDRESCTI_II, PDRESCTI_III, PDRESCTI_IV, PDRESCTII_III, PDRESCTII_IV, y PDRESCTIII_IV"; los datos de resistencias estimados para el modelo del tejido biológico con dos diferentes entrenamientos: 1- entrenamiento de estimaciones de las resistencias nombradas Ramp1, Ramp2, Ramp3, Ramp4, Ramp5, y Ramp6 que correspondan a las seis resistencias del modelo, usando los datos de amplitudes medidos en el tejido vivo para el ajuste de los datos de estimaciones en el algoritmo correspondiente; y 2- entrenamiento de estimaciones de las resistencias nombradas Rcomp1, Rcomp2, Rcomp3, Rcomp4, Rcomp5, y Rcomp6 que corresponden a las seis resistencias del modelo, usando los datos complejos de resistencias y reactancias calculadas desde los datos de amplitudes y fases medidas en el tejido vivo para el ajuste de los datos de estimaciones en el algoritmo correspondiente, mencionando que los datos de fase son normalizados, restando el valor de fase a la frecuencia de 215 Hz; los datos de amplitudes y fases calculados en el modelo estimado desde las resistencias Ramp1-Ramp6 "A215_M-A1000000_M, Y F215_M-F1000000_M, y que

correspondan a las amplitudes y fases medidos en tejido vivo (A215-A1000000, Y F215-F1000000) mencionados anteriormente”.

Tabla 6.8.

| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-IDI * Parámetro que no tenga significancia estadística | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Variable Dependientes | Efecto principal: CLASE(p-level) | Efecto principal: NDI(p-level) | Efecto principal: NPHI (p-level) |
| A215 | 0 | 9.36E-27 | 5.48E-10 |
| A316 | 0 | 4.4E-27 | 4.65E-12 |
| A464 | 0 | 3.22E-27 | 6.12E-12 |
| A681 | 0 | 2.23E-30 | 5.33E-14 |
| A1000 | 0 | 4.57E-30 | 1.77E-14 |
| A1468 | 0 | 0 | 1.83E-15 |
| A2154 | 0 | 0 | 7.53E-17 |
| A3162 | 0 | 0 | 7.95E-19 |
| A4642 | 0 | 0 | 2.67E-19 |
| A6813 | 0 | 0 | 8.21E-22 |
| A10000 | 0 | 0 | 3.56E-21 |
| A14678 | 0 | 0 | 3.17E-21 |
| A21544 | 0 | 0 | 1.14E-20 |
| A31623 | 0 | 0 | 1.98E-22 |
| A46416 | 0 | 0 | 2.77E-20 |
| A68129 | 0 | 0 | 1.55E-18 |
| A100000 | 0 | 0 | 4.55E-17 |
| A146780 | 0 | 0 | 3.54E-15 |
| A215443 | 0 | 5.52E-29 | 3.61E-11 |
| A316228 | 0 | 1.08E-25 | 9.59E-10 |
| A464159 | 0 | 2.7E-19 | 9.95E-09 |
| A681292 | 0 | 5.17E-18 | 4.7E-06 |
| A1000000 | 0 | 8.03E-13 | 0.00114 |
| F215 | 2.55E-26 | 0.001553 | 0.048098 |
| F316 | 2.14E-25 | 0.006435 | 0.029132 |
| F464 | 0 | 0.167074* | 0.000322 |
| F681 | 0 | 0.163572* | 0.009255 |
| F1000 | 0 | 0.161238* | 3.93E-05 |
| F1468 | 0 | 0.015575 | 2.55E-06 |
| F2154 | 0 | 0.030543 | 1.66E-06 |
| F3162 | 0 | 0.004798 | 1.33E-05 |
| F4642 | 0 | 4.45E-05 | 4.11E-05 |
| F6813 | 0 | 3.37E-05 | 4.42E-06 |
| F10000 | 0 | 2.05E-06 | 2.48E-06 |
| F14678 | 0 | 5.13E-08 | 7.54E-06 |
| F21544 | 0 | 5.31E-09 | 1.43E-06 |
| F31623 | 0 | 2.9E-09 | 1.92E-07 |
| F46416 | 0 | 2.3E-10 | 1.43E-07 |
| F68129 | 0 | 7.24E-09 | 4.53E-08 |
| F100000 | 0 | 1.78E-07 | 7.66E-08 |
| F146780 | 0 | 6.58E-07 | 9.01E-08 |
| F215443 | 0 | 1.79E-05 | 1.22E-07 |
| F316228 | 0 | 3.49E-05 | 9.37E-06 |
| F464159 | 0 | 0.00018 | 0.000111 |

| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-IDI | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| * Parámetro que no tenga significancia estadística | | | |
| Variable Dependientes | Efecto principal: CLASE(p-level) | Efecto principal: NDI(p-level) | Efecto principal: NPHI (p-level) |
| F681292 | 0 | 0.000775 | 0.000986 |
| F1000000 | 0 | 0.000328 | 0.179671* |
| A215_N | 0 | 1.51E-07 | 0.000197 |
| A316_N | 0 | 2.84E-08 | 1.48E-05 |
| A464_N | 0 | 1.19E-08 | 2.52E-06 |
| A681_N | 0 | 1.59E-09 | 1.23E-06 |
| A1000_N | 0 | 1.58E-09 | 1.09E-06 |
| A1468_N | 0 | 2.24E-10 | 3.6E-07 |
| A2154_N | 0 | 4.3E-10 | 4.51E-07 |
| A3162_N | 0 | 1.18E-10 | 1.41E-07 |
| A4642_N | 0 | 2.99E-11 | 1.97E-07 |
| A6813_N | 0 | 1.36E-10 | 8.82E-08 |
| A10000_N | 0 | 1.7E-10 | 1.02E-07 |
| A14678_N | 0 | 8.04E-10 | 2.42E-08 |
| A21544_N | 0 | 3.44E-09 | 1.87E-08 |
| A31623_N | 0 | 3.58E-08 | 5.11E-08 |
| A46416_N | 0 | 3.35E-07 | 5.3E-09 |
| A68129_N | 0 | 3.98E-06 | 4.93E-09 |
| A100000_N | 0 | 4.72E-06 | 1.04E-09 |
| A146780_N | 0 | 3.54E-05 | 5.84E-09 |
| A215443_N | 0 | 0.00289 | 2.36E-06 |
| A316228_N | 0 | 0.001025 | 2.13E-09 |
| A464159_N | * | * | * |
| A681292_N | 9.33E-08 | 5.46E-06 | 4.6E-07 |
| A1000000_N | 0 | 3.09E-06 | 0.136291* |
| F215_N | 3.1E-05 | 0.033678 | 0.388799* |
| F316_N | 1.31E-05 | 0.332165* | 0.668341* |
| F464_N | * | * | * |
| F681_N | 0.938389* | 0.493502* | 0.69016* |
| F1000_N | 5.42E-07 | 0.159962* | 0.793015* |
| F1468_N | 7.94E-18 | 0.001211 | 0.30139* |
| F2154_N | 4.06E-28 | 0.000269 | 0.025453 |
| F3162_N | 3.94E-28 | 2.84E-06 | 0.046956 |
| F4642_N | 0 | 2.65E-09 | 0.075989* |
| F6813_N | 0 | 9.86E-09 | 0.019659 |
| F10000_N | 0 | 3.04E-11 | 0.009925 |
| F14678_N | 0 | 1.08E-12 | 0.014688 |
| F21544_N | 0 | 2.28E-13 | 0.00311 |
| F31623_N | 0 | 2.58E-13 | 0.000724 |
| F46416_N | 0 | 1.53E-13 | 0.001971 |
| F68129_N | 0 | 1.78E-11 | 0.000341 |
| F100000_N | 0 | 3.6E-09 | 0.000372 |
| F146780_N | 0 | 4.09E-08 | 0.000146 |
| F215443_N | 0 | 3.87E-06 | 4.06E-05 |
| F316228_N | 0 | 1.39E-05 | 0.000611 |
| F464159_N | 0 | 0.000102 | 0.001456 |
| F681292_N | 0 | 0.000451 | 0.008837 |
| F1000000_N | 0 | 0.000133 | 0.412007* |
| RESI215 | 0 | 1.45E-07 | 0.00018 |
| RESI316 | 0 | 2.79E-08 | 1.36E-05 |

| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-IDI | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| * Parámetro que no tenga significancia estadística | | | |
| Variable Dependientes | Efecto principal: CLASE(p-level) | Efecto principal: NDI(p-level) | Efecto principal: NPHI (p-level) |
| RESI464 | 0 | 1.19E-08 | 2.52E-06 |
| RESI681 | 0 | 1.65E-09 | 1.21E-06 |
| RESI1000 | 0 | 1.64E-09 | 1.02E-06 |
| RESI1468 | 0 | 2.39E-10 | 3.41E-07 |
| RESI2154 | 0 | 4.58E-10 | 4.11E-07 |
| RESI3162 | 0 | 1.36E-10 | 1.22E-07 |
| RESI4642 | 0 | 4.2E-11 | 1.38E-07 |
| RESI6813 | 0 | 2.94E-10 | 8.91E-08 |
| RESI10000 | 0 | 4.11E-10 | 9.78E-08 |
| RESI14678 | 0 | 2.46E-09 | 2.45E-08 |
| RESI21544 | 0 | 1.37E-08 | 1.3E-08 |
| RESI31623 | 0 | 1.61E-07 | 5.09E-08 |
| RESI46416 | 0 | 2.24E-06 | 4.86E-09 |
| RESI68129 | 0 | 4.3E-05 | 7.33E-09 |
| RESI100000 | 0 | 9.47E-05 | 3.37E-09 |
| RESI146780 | 0 | 0.008407 | 5.36E-07 |
| RESI215443 | 0 | 0.332372* | 0.079497* |
| RESI316228 | 2.08E-06 | 0.11341* | 0.056889* |
| RESI464159 | 0 | 0.000258 | 0.000159 |
| RESI681292 | 0 | 1.46E-06 | 1.02E-05 |
| RESI1000000 | 0 | 3.61E-07 | 0.516541* |
| REACT215 | 6.9E-14 | 0.014821 | 0.118682* |
| REACT316 | 2.77E-22 | 0.060427* | 0.370899* |
| REACT464 | * | * | * |
| REACT681 | 0.019294 | 0.051134* | 0.367009* |
| REACT1000 | 0 | 0.002208 | 0.121756* |
| REACT1468 | 0 | 1.1E-05 | 0.003164 |
| REACT2154 | 0 | 5.16E-07 | 0.0013 |
| REACT3162 | 0 | 7.1E-10 | 0.003136 |
| REACT4642 | 0 | 2.74E-13 | 0.004021 |
| REACT6813 | 0 | 6.87E-13 | 0.000417 |
| REACT10000 | 0 | 6.64E-15 | 5.77E-05 |
| REACT14678 | 0 | 3.12E-15 | 6.2E-05 |
| REACT21544 | 0 | 5.28E-14 | 0.000114 |
| REACT31622 | 0 | 1.33E-13 | 4.32E-05 |
| REACT46416 | 0 | 1.25E-12 | 4.85E-05 |
| REACT68129 | 0 | 5.86E-11 | 2.93E-05 |
| REACT100000 | 0 | 5.33E-09 | 1.41E-05 |
| REACT146780 | 0 | 2.5E-08 | 9.79E-06 |
| REACT215443 | 0 | 1.7E-06 | 1.54E-05 |
| REACT316228 | 0 | 2.8E-06 | 7.73E-05 |
| REACT464159 | 0 | 2.7E-05 | 0.006531 |
| REACT681292 | 0 | 0.003872 | 0.018683 |
| REACT1000000 | 0 | 0.001462 | 0.118396* |
| PROMAMPI | 0 | 8.79E-09 | 6.88E-06 |
| PROMAMPII | 0 | 9.02E-11 | 1.51E-07 |
| PROMAMPIII | 0 | 2.85E-08 | 7.43E-09 |
| PROMAMPIV | 0 | 0.466425* | 6.97E-06 |
| RESI_I | 0 | 8.86E-09 | 6.46E-06 |
| RESI_II | 0 | 1.19E-10 | 1.27E-07 |

| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-IDI | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| * Parámetro que no tenga significancia estadística | | | |
| Variable Dependientes | Efecto principal: CLASE(p-level) | Efecto principal: NDI(p-level) | Efecto principal: NPHI (p-level) |
| RESI_III | 0 | 1.51E-07 | 6.19E-09 |
| RESI_IV | 2.68E-15 | 0.002621 | 0.827003* |
| REACT_I | 0.000114 | 0.504942* | 0.439516* |
| REACT_II | 0 | 1.98E-12 | 0.000354 |
| REACT_III | 0 | 2.94E-13 | 2.72E-05 |
| REACT_IV | 0 | 1.78E-05 | 0.008923 |
| PDAMPI_II | 0 | 2.76E-05 | 0.000273 |
| PDAMPI_III | 0 | 8.87E-08 | 8.54E-05 |
| PDAMPI_IV | 0 | 3.25E-09 | 8.26E-06 |
| PDAMP_II_III | 0 | 2.46E-11 | 7.87E-06 |
| PDAMP_II_IV | 0 | 8.6E-12 | 1.56E-07 |
| PDAMP_III_IV | 0 | 3.64E-10 | 7.4E-09 |
| PDRESII_II | 0 | 1.88E-05 | 0.000242 |
| PDRESII_III | 0 | 5.04E-08 | 7.38E-05 |
| PDRESII_IV | 0 | 6.91E-07 | 3.62E-06 |
| PDRESIII_III | 0 | 1.47E-11 | 6.28E-06 |
| PDRESIII_IV | 0 | 1.54E-11 | 1.49E-07 |
| PDRESIII_IV | 0 | 3.58E-09 | 2.41E-08 |
| PDREACTI-II | 0 | 5.21E-13 | 0.000482 |
| PDREACTI_III | 0 | 1.08E-12 | 0.000222 |
| PDREACTI_IV | 0 | 1.55E-05 | 0.026185 |
| PDREACTII_III | 0 | 0.137804* | 0.076142* |
| PDREACTII_IV | 1.53E-21 | 3.27E-05 | 0.568301* |
| PDREACTIII_IV | 0 | 4.52E-14 | 0.000351 |
| RAMP1 | 0.004983 | 0.135449* | 0.456817* |
| RAMP2 | 0 | 1.23E-13 | 3.25E-06 |
| RAMP3 | 0 | 1.14E-23 | 3.32E-08 |
| RAMP4 | 0 | 0 | 1.25E-29 |
| RAMP5 | 0.000297 | 0.000863 | 0.116911* |
| RAMP6 | 0.000297 | 0.000863 | 0.116911* |
| RCOMPX1 | 3E-08 | 0.013749 | 0.223436* |
| RCOMPX2 | 0 | 2.04E-10 | 0.000118 |
| RCOMPX3 | 0 | 1.9E-20 | 3.73E-06 |
| RCOMPX4 | 0 | 1.94E-28 | 6.86E-21 |
| RCOMPX5 | 0.009199 | 0.266656* | 0.505823* |
| RCOMPX6 | 0.009199 | 0.266656* | 0.505823* |
| A215_M | 0 | 1.02E-25 | 9.21E-10 |
| A316_M | 0 | 4.49E-27 | 5.41E-11 |
| A464_M | 0 | 3.05E-28 | 3.13E-12 |
| A681_M | 0 | 1.16E-29 | 1.2E-13 |
| A1000_M | 0 | 0 | 2.69E-15 |
| A1468_M | 0 | 0 | 6.21E-17 |
| A2154_M | 0 | 0 | 4.87E-18 |
| A3162_M | 0 | 0 | 1.47E-18 |
| A4642_M | 0 | 0 | 3.81E-19 |
| A6813_M | 0 | 0 | 2.37E-20 |
| A10000_M | 0 | 0 | 7.02E-22 |
| A14678_M | 0 | 0 | 8.29E-23 |
| A21544_M | 0 | 0 | 3.81E-22 |
| A31623_M | 0 | 0 | 2.94E-20 |

| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-IDI | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| * Parámetro que no tenga significancia estadística | | | |
| Variable Dependientes | Efecto principal: CLASE(p-level) | Efecto principal: NDI(p-level) | Efecto principal: NPHI (p-level) |
| A46416_M | 0 | 0 | 8.94E-18 |
| A68129_M | 0 | 0 | 7.5E-16 |
| A100000_M | 0 | 0 | 7.38E-15 |
| A146780_M | 0 | 0 | 7.49E-15 |
| A215443_M | 0 | 0 | 6.54E-15 |
| A316228_M | 0 | 0 | 1.59E-14 |
| A464159_M | 0 | 2.03E-28 | 6.73E-14 |
| A681292_M | 0 | 8.3E-27 | 2.69E-13 |
| A1000000_M | 0 | 6.75E-26 | 8.03E-13 |
| F215_M | 7.75E-07 | 0.027648 | 0.279189 |
| F316_M | 2.39E-08 | 0.014059 | 0.194037* |
| F464_M | 2.53E-10 | 0.005558 | 0.12745* |
| F681_M | 4.68E-13 | 0.001199 | 0.082767* |
| F1000_M | 9.53E-17 | 9.89E-05 | 0.052995* |
| F1468_M | 4.58E-21 | 3.55E-06 | 0.024568 |
| F2154_M | 7.17E-26 | 1.94E-07 | 0.004359 |
| F3162_M | 0 | 5.32E-08 | 0.000294 |
| F4642_M | 0 | 3.93E-08 | 3.06E-05 |
| F6813_M | 0 | 5.31E-09 | 6.71E-06 |
| F10000_M | 0 | 6.16E-11 | 7.99E-07 |
| F14678_M | 0 | 4.66E-13 | 2.32E-08 |
| F21544_M | 0 | 2.81E-14 | 6.04E-10 |
| F31623_M | 0 | 3.17E-14 | 1.26E-10 |
| F46416_M | 0 | 2.59E-13 | 8.13E-10 |
| F68129_M | 0 | 5.59E-12 | 5.91E-08 |
| F100000_M | 0 | 2.15E-10 | 2.83E-06 |
| F146780_M | 0 | 1.07E-08 | 2.54E-05 |
| F215443_M | 0 | 6.55E-07 | 9.57E-05 |
| F316228_M | 9.66E-22 | 2.09E-05 | 0.000388 |
| F464159_M | 6.74E-10 | 0.000213 | 0.002401 |
| F681292_M | 0.000109 | 0.000993 | 0.014018 |
| F1000000_M | 0.005395 | 0.004195 | 0.04867 |

* Parámetro que no tenga significancia estadística ($p < 0.05$)

Tabla 6.8. en la primera columna están mostrados los efectos principales de la Clase, en un análisis multivariado MANOVA usando los parámetros de clases "CLASE", Nivel de pHi "NPHI", y Nivel de Daño Isquémico "NDI" como variables independientes. Y los parámetros de la espectroscopia de impedancia como variables dependientes. Este análisis mismo se repitió para mostrar los efectos principales de nivel de pHi "NpHi" y los resultados están en la segunda columna, y finalmente los efectos principales de Nivel de Daño Isquémico "NDI" como en la tercera columna. A continuación van mencionando los parámetros que no tuvieron significancia estadística para cada análisis: 1) en el análisis de efectos principales del variable clase "CLASE", los parámetros que no tienen significancia estadística $P < 0.05$ son: A464159_N, F464_N, F681_N y React464; 2) en el análisis de los efectos principales del variable Nivel de PHI "NPHI", los parámetros que no tienen significancia estadística $P < 0.05$ son: F1000000, A464159_N, A1000000_N, F215_N-F1468_N, F4642_N, F1000000_N, RESI215443, RESI316228, RESI1000000, REACT215-REACT1000, RESI I, REACTI, PDREACTII_III, PDREACTII_IV, RAMP1, RAMP5, RAMP6, RCOMPX5, RCOMPX6, F215_M-

F1000-M; y 3) en el análisis de los efectos principales del variable Nivel de Daño Isquémico "IDI", los parámetros que no tienen significancia estadística $P < 0.05$ son: F464-F1000, A464159_N, F316_N-F1000_N, RESI215443, RESI316228, REACT316-REACT681, PROMAMP1V, REACTIV, PDREACTII_III, RAMP1, RCOMPX5, RCOMPX6.

En la Tabla 6.9. están mostrados los resultados de un análisis de correlación entre los parámetros de espectroscopia de impedancia y los parámetros de pH*i* medidos en el tejido intestinal, su correspondiente Índice de daño Isquémico "IDI", calculado en el algoritmo desarrollado en esta investigación. los parámetros de espectroscopia de impedancia; amplitudes y fases, amplitudes y fases normalizados, resistencias y reactancias, promedios y pendientes calculadas de las variables anteriores. Las variables estimadas del modelo como las resistencias del modelo en dos diferentes entrenamientos y los datos de amplitudes y fases calculados en el modelo de la primera estimaciones que correspondan a las amplitudes y fases medidos en tejido vivo.

En las ultimas columnas de la tabla, están presentados los resultados de análisis de correlación usando un paquete de estadística "STATISTICA". Están marcados los variables con correlaciones que no tengan significancia ($P < 0.05$).

Tabla 6.9.

| Correlaciones | | |
|--|-----------|------------|
| +, ** son Parámetros con mayor correlación con pH <i>i</i> y IDI respectivamente | | |
| *, ** Parámetros con correlaciones que no tengan significancia a $p < 0.05$ | | |
| | PHI | IDI |
| A215 | -0.31677 | 0.398036 |
| A316 | -0.30036 | 0.372572 |
| A464 | -0.29599 | 0.36622 |
| A681 | -0.29956 | 0.384862 |
| A1000 | -0.28697 | 0.368479 |
| A1468 | -0.2852 | 0.371727 |
| A2154 | -0.2834 | 0.375222 |
| A3162 | -0.2801 | 0.37934 |
| A4642 | -0.27751 | 0.383873 |
| A6813 | -0.28043 | 0.396632 |
| A10000 | -0.26765 | 0.381012 |
| A14678 | -0.2665 | 0.381005 |
| A21544 | -0.26458 | 0.380205 |
| A31623 | -0.26469 | 0.384548 |
| A46416 | -0.24723 | 0.354895 |
| A68129 | -0.24222 | 0.351615 |
| A100000 | -0.20693 | 0.303326 |
| A146780 | -0.18024 | 0.260493 |
| A215443 | -0.15045 | 0.206877 |
| A316228 | -0.08014 | 0.117437 |
| A464159 | -0.04162* | 0.045118** |
| A681292 | -0.01852* | 0.020071** |
| A1000000 | 0.109123 | -0.12805 |
| F215 | -0.06075* | 0.20303 |
| F316 | -0.02356* | 0.164807 |
| F464 | 0.083669 | 0.061261 |
| F681 | 0.115061 | 0.024221** |
| F1000 | 0.177941 | -0.04625** |
| F1468 | 0.229247 | -0.11612 |

| Correlaciones | | |
|--|-----------------------|------------------------|
| +, ** son Parámetros con mayor correlación con pH _i y IDI respectivamente | | |
| *, ** Parámetros con correlaciones que no tengan significancia a $p < 0.05$ | | |
| F2154 | 0.241822 | -0.14311 |
| F3162 | 0.290358 | -0.2245 |
| F4642 | 0.327013 | -0.2726 |
| F6813 | 0.345149 | -0.3159 |
| F10000 | 0.358853 | -0.32642 |
| F14678 | 0.380822 | -0.37199 |
| F21544 | 0.387341 | -0.38924 |
| F31623 | 0.390151 | -0.42101 |
| F46416 | 0.405734 | -0.42796 |
| F68129 | 0.402801 | -0.45241 |
| F100000 | 0.380029 | -0.41052 |
| F146780 | 0.379145 | -0.41348 |
| F215443 | 0.370264 | -0.41763 |
| F316228 | 0.368377 | -0.4034 |
| F464159 | 0.34266 | -0.36545 |
| F681292 | 0.344469 | -0.36318 |
| F1000000 | 0.304686 | -0.28027 |
| A215_N | -0.39518 | 0.428993 |
| A316_N | -0.38315 | 0.40848 |
| A464_N | -0.37581 | 0.396056 |
| A681_N | -0.38122 | 0.420861 |
| A1000_N | -0.37164 | 0.405063 |
| A1468_N | -0.37178 | 0.414465 |
| A2154_N | -0.37263 | 0.420161 |
| A3162_N | -0.37201 | 0.427618 |
| A4642_N | -0.37241 | 0.441613 |
| A6813_N | -0.3782 | 0.45696 |
| A10000_N | -0.36897 | 0.447856 |
| A14678_N | -0.36975 | 0.451714 |
| A21544_N | -0.37085 | 0.454922 |
| A31623_N | -0.37833 | 0.465882 |
| A46416_N | -0.36456 | 0.450105 |
| A68129_N | -0.36831 | 0.453403 |
| A100000_N | -0.33965 | 0.438819 |
| A146780_N | -0.32699 | 0.423895 |
| A215443_N | -0.32342 | 0.381288 |
| A316228_N | -0.12962 | 0.2398 |
| A464159_N | * | ** |
| A681292_N | 0.050388* | -0.0578** |
| A1000000_N | 0.255836 | -0.30033 |
| F215_N | -0.16283 | 0.203611 |
| F316_N | -0.12633 | 0.126123 |
| F464_N | * | ** |
| F681_N | 0.05635* | -0.05071** |
| F1000_N | 0.163549 | -0.15592 |
| F1468_N | 0.247406 | -0.24601 |
| F2154_N | 0.278619 | -0.28128 |
| F3162_N | 0.322389 | -0.36506 |
| F4642_N | 0.355489 | -0.40191 |
| F6813_N | 0.3697 | -0.43708 |
| F10000_N | 0.395396 | -0.45056 |
| F14678_N | 0.415472 ⁺ | -0.48919 ⁺⁺ |

| Correlaciones | | |
|---|-----------------------|------------------------|
| +, ** son Parámetros con mayor correlación con pHi y IDI respectivamente | | |
| *, ** Parámetros con correlaciones que no tengan significancia a $p < 0.05$ | | |
| F21544_N | 0.418878 ⁺ | -0.49619 ⁺⁺ |
| F31623_N | 0.41283 ⁺ | -0.5176 ⁺⁺ |
| F46416_N ^{maxpHi} | 0.43009 ⁺ | -0.51621 ⁺⁺ |
| F68129_N ^{maxIDI} | 0.420343 ⁺ | -0.53158 ⁺⁺ |
| F100000_N | 0.396492 | -0.47728 |
| F146780_N | 0.393381 | -0.47242 |
| F215443_N | 0.37994 | -0.46898 |
| F316228_N | 0.377066 | -0.44476 |
| F464159_N | 0.347746 | -0.39861 |
| F681292_N | 0.347442 | -0.38996 |
| F1000000_N | 0.305699 | -0.30659 |
| RESI215 | -0.39501 | 0.428524 |
| RESI316 | -0.3836 | 0.408808 |
| RESI464 | -0.37581 | 0.396056 |
| RESI681 | -0.38121 | 0.420808 |
| RESI1000 | -0.37165 | 0.405471 |
| RESI1468 | -0.37205 | 0.415222 |
| RESI2154 | -0.37305 | 0.42137 |
| RESI3162 | -0.37259 | 0.428148 |
| RESI4642 | -0.37276 | 0.441815 |
| RESI6813 | -0.37838 | 0.456035 |
| RESI10000 | -0.36975 | 0.446776 |
| RESI14678 | -0.37072 | 0.449531 |
| RESI21544 | -0.37302 | 0.451298 |
| RESI31623 | -0.38148 | 0.45897 |
| RESI46416 | -0.36461 | 0.436966 |
| RESI68129 | -0.36889 | 0.430278 |
| RESI100000 | -0.32567 | 0.398146 |
| RESI146780 | -0.28583 | 0.333486 |
| RESI215434 | -0.23174 | 0.164514 |
| RESI316228 | 0.154559 | -0.20159 |
| RESI464159 | 0.226831 | -0.34228 |
| RESI681292 | 0.200323 | -0.28032 |
| RESI1000000 | 0.275298 | -0.32579 |
| REACT215 | -0.22799 | 0.274566 |
| REACT316 | -0.17895 | 0.204077 |
| REACT464 | * | ** |
| REACT681 | 0.125443 | -0.14888 |
| REACT1000 | 0.245297 | -0.23973 |
| REACT1468 | 0.294312 | -0.30333 |
| REACT2154 | 0.312044 | -0.32018 |
| REACT3162 | 0.336892 | -0.39635 |
| REACT4642 | 0.353906 | -0.428 |
| REACT6813 | 0.361775 | -0.46179 |
| REACT10000 | 0.363013 | -0.46 |
| REACT14678 | 0.373707 | -0.48168 |
| REACT21544 | 0.373703 | -0.48505 |
| REACT31623 | 0.375863 | -0.50858 ⁺⁺ |
| REACT46416 | 0.389425 | -0.50789 ⁺⁺ |
| REACT68129 | 0.387846 | -0.51891 ⁺⁺ |
| REACT100000 | 0.38107 | -0.49914 ⁺⁺ |
| REACT146780 | 0.383194 | -0.49157 ⁺⁺ |

| Correlaciones | | |
|--|-----------------------|------------------------|
| +, ** son Parámetros con mayor correlación con pH _i y IDI respectivamente | | |
| *, ** Parámetros con correlaciones que no tengan significancia a $p < 0.05$ | | |
| REACT215443 | 0.374871 | -0.46878 |
| REACT316228 | 0.382581 | -0.45078 |
| REACT464159 | 0.37948 | -0.40803 |
| REACT681292 | 0.403533 ⁺ | -0.4055 |
| REACT1000000 | 0.332621 | -0.24888 |
| PROMAMPI | -0.38613 | 0.416896 |
| PROMAMPII | -0.37482 | 0.434883 |
| PROMAMPIII | -0.37199 | 0.45866 |
| PROMAMPIV | -0.21585 | 0.298324 |
| RESI_I | -0.38599 | 0.416687 |
| RESI_II | -0.37527 | 0.435096 |
| RESI_III | -0.37409 | 0.450293 |
| RESI_IV | 0.142042 | -0.22797 |
| REACT_I | -0.103 | 0.135755 |
| REACT_II | 0.355736 | -0.42096 |
| REACT_III | 0.385081 | -0.50668 ⁺⁺ |
| REACT_IV | 0.399298 | -0.44508 |
| PDAMPI_II | -0.35397 | 0.336842 |
| PDAMPI_III | -0.37188 | 0.379247 |
| PDAMPI_IV | -0.38916 | 0.417653 |
| PDAMPII_III | -0.36186 | 0.397916 |
| PDAMPII_IV | -0.37919 | 0.437058 |
| PDAMPIII_IV | -0.38185 | 0.466633 |
| PDRESII_II | -0.35548 | 0.340371 |
| PDRESII_III | -0.37318 | 0.387286 |
| PDRESII_IV | -0.38484 | 0.388313 |
| PDRESIII_III | -0.36301 | 0.409333 |
| PDRESIII_IV | -0.37552 | 0.440318 |
| PDRESIII_IV | -0.37153 | 0.457354 |
| PDREACTI_II | -0.37451 | 0.448644 |
| PDREACTI_III | -0.39931 | 0.524761 ⁺⁺ |
| PDREACTI_IV | -0.40563 ⁺ | 0.460466 |
| PDREACTII_III | -0.21699 | 0.373922 |
| PDREACTII_IV | -0.0437 [*] | 0.012595 ^{**} |
| PDREACTIII_IV | 0.171632 | -0.37356 |
| RAMP1 | -0.10947 | 0.127788 |
| RAMP2 | -0.25627 | 0.294369 |
| RAMP3 | -0.29374 | 0.371714 |
| RAMP4 | -0.17834 | 0.325102 |
| RAMP5 | 0.017003 [*] | -0.03419 ^{**} |
| RAMP6 | 0.017003 [*] | -0.03419 ^{**} |
| RCOMPX1 | -0.26966 | 0.290745 |
| RCOMPX2 | -0.30261 | 0.363737 |
| RCOMPX3 | -0.29247 | 0.404569 |
| RCOMPX4 | -0.21546 | 0.311673 |
| RCOMPX5 | 0.100556 | -0.08736 |
| RCOMPX6 | 0.100556 | -0.08736 |
| A215_M | -0.31491 | 0.396547 |
| A316_M | -0.31183 | 0.389367 |
| A464_M | -0.30669 | 0.38185 |
| A681_M | -0.29989 | 0.375345 |
| A1000_M | -0.29221 | 0.370921 |

| Correlaciones | | |
|---|-----------------------|----------|
| +, ++ son Parámetros con mayor correlación con pHi y IDI respectivamente | | |
| *, ** Parámetros con correlaciones que no tengan significancia a $p < 0.05$ | | |
| A1468_M | -0.28486 | 0.36954 |
| A2154_M | -0.27866 | 0.371046 |
| A3162_M | -0.27416 | 0.374117 |
| A4642_M | -0.2711 | 0.377007 |
| A6813_M | -0.26875 | 0.378874 |
| A10000_M | -0.26694 | 0.37971 |
| A14678_M | -0.26527 | 0.378975 |
| A21544_M | -0.26329 | 0.376314 |
| A31623_M | -0.26031 | 0.371742 |
| A46416_M | -0.25458 | 0.36379 |
| A68129_M | -0.2406 | 0.347917 |
| A100000_M | -0.21279 | 0.317156 |
| A146780_M | -0.17142 | 0.270912 |
| A215443_M | -0.12791 | 0.219407 |
| A316228_M | -0.09496 | 0.176369 |
| A464159_M | -0.07577 | 0.1478 |
| A681292_M | -0.06616 | 0.131012 |
| A1000000_M | -0.06151 | 0.121773 |
| F215_M | 0.210408 | -0.23977 |
| F316_M | 0.239158 | -0.25448 |
| F464_M | 0.270066 | -0.26604 |
| F681_M | 0.302452 | -0.27429 |
| F1000_M | 0.334908 | -0.27815 |
| F1468_M | 0.363462 | -0.27545 |
| F2154_M | 0.38353 | -0.26923 |
| F3162_M | 0.393983 | -0.27086 |
| F4642_M | 0.396842 ⁺ | -0.29145 |
| F6813_M | 0.391601 ⁺ | -0.32425 |
| F10000_M | 0.383166 ⁺ | -0.35415 |
| F14678_M | 0.380231 ⁺ | -0.3778 |
| F21544_M | 0.384156 | -0.39556 |
| F31623_M | 0.392869 | -0.40809 |
| F46416_M | 0.404992 | -0.41667 |
| F68129_M | 0.418286 | -0.42365 |
| F100000_M | 0.426088 | -0.42823 |
| F146780_M | 0.420159 | -0.42787 |
| F215443_M | 0.395504 | -0.41853 |
| F316228_M | 0.352198 | -0.39434 |
| F464159_M | 0.297128 | -0.35407 |
| F681292_M | 0.243169 | -0.3064 |
| F1000000_M | 0.200088 | -0.26335 |

* pHi: las correlaciones marcadas no son significantes $p < 0.05$

** IDI-crudo: las correlaciones marcadas no son significantes $p < 0.05$

⁺ índice de los 12 parámetros de impedancia que más correlacionan con el pHi.

⁺⁺ índice de los 12 parámetros de impedancia que más correlacionan con el IDI-crudo.

^{maxpHi} Índice del parámetro que tiene la correlación máxima con la pHi medido

^{maxIDI} Índice del parámetro que tiene la correlación máxima con el NDI calculado

En la Tabla 6.9. se nota que el Nivel de correlación máximo con el pHi es 0.43009, y con el IDI es 0.531577. De los 223 parámetros de espectroscopia de

impedancia hay 33 variables que están mas correlacionados con el pHi que con el IDI "15 %"; en comparación con 190 variables que están mas correlacionados con IDI que con el pHi "85%". También, en la presente tabla hay 9 parámetros que no tienen significancia estadística para ambos variables de pHi e IDI que son: A464159, A681292, A464159_N, A681292_N, Fase464_N, Fase681_N, react464, PdreactII_IV, Ramp5, y Ramp6; y hay dos variables mas que no tienen significancia estadística con el pHi aunque tienen significancia con IDI como son: Fase215, y Fase316; Hay otras dos variables que no tienen significancia estadística con la IDI Fase 681 y Fase1000.

El parámetro que tiene máxima correlación con el pHi medido es F46416_N, que es la fase normalizada a la frecuencia 46416 Hz, el parámetro que más esta correlacionado con el índice de daño isquémico "IDI" calculado por el algoritmo propuesto en esta investigación es F68129_N, que es la fase normalizada de la frecuencia de 68129 Hz.

Los 12 parámetros de espectroscopia de impedancia que tienen máxima significancia estadística de correlación con pHi son: Fase 46416, Fase14678_N - Fase68129_N, React681, PdreactI_IV, Fase46416_M-Fase146780_M.

Los 12 parámetros de espectroscopia de impedancia que tienen máxima significancia estadística de correlación con el IDI son: Fase14678_N - Fase68129_N, react31623-react146780, react_III, PdreactI_III.

6.8.2. Análisis de la significancia de los cambios espectrales para presentar el efecto de la oclusión y reperfusión sanguínea en el tejido bajo estudio

Esta prueba es para mostrar la significancia estadística en los cambios espectrales como resultado de la oclusión así como la reperfusión con el tiempo y si los espectros después de la reperfusión llegan a tener diferencia estadísticamente significativa con espectros cuando el tejido esta sano.

Este análisis se realizó usando el análisis de varianza unidireccional dentro del parámetro Clase que representa clasificaciones de los espectros resultantes en los experimentos incluidos (ver la Tabla 6.1.), como variable independiente y algunos parámetros de amplitudes, fases, o pHi medidos en tejido intestinal como variables dependiente, con la prueba de diferencia significativa mínima LSD. Tres ejemplos de los resultados de este análisis están presentados en las siguientes tablas: 1) en la Tabla 6.10 están presentados los resultados del análisis de varianza entre el parámetro Clase y el parámetro de amplitudes medidos en tejido vivo a la frecuencia de 6.813 KHz "A6813"; 2) en la Tabla 6.10 están presentados los resultados del análisis de varianza entre el parámetro Clase y el parámetro de fases medidos en tejido vivo a la frecuencia de 6.813 KHz "F6813"; y 3) en la Tabla 6.11 están presentados los resultados del análisis de varianza entre el parámetro Clase y el pHi medidos en tejido.

En las siguientes Tabla 6.10, Tabla 6.11 y Tabla 6.10, los códigos de las clases representan la clasificación usada en la Tabla 6.1: {1} que es clase de mediciones de control; {2} mediciones a 1 hora de oclusión total; {3} mediciones a 2 horas de oclusión total; {4} mediciones a 3 horas de oclusión total; {5} mediciones a 4 horas de oclusión total; {6} mediciones a 1 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión; {7} mediciones a 2 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión; {8} mediciones a 3 horas de reperfusión después 1 hora de oclusión; {9} mediciones a 1 hora de reperfusión después 2 hora de oclusión y {10} mediciones a 2 horas de reperfusión después 2 hora de oclusión.

Tabla 6.10.

| Prueba de Diferencia significativa mínima (LSD Test); Variable: A6813 (tabla_todosidis_28agosto02.sta) | | | | | |
|--|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| Los variables Marcados * no son estadísticamente diferentes a $p < .0500$ | | | | | |
| Clase | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} |
| {1} | | 4.75E-06 | 0 | 0 | 0 |
| {2} | 4.75E-06 | | 0 | 0 | 0 |
| {3} | 0 | 0 | | 1.02E-22 | 1.9E-26 |
| {4} | 0 | 0 | 1.01539E-22 | | 0.385195* |
| {5} | 0 | 0 | 1.90299E-26 | 0.385195* | |
| {6} | 0.042592 | 0.40601* | 2.02992E-23 | 0 | 0 |
| {7} | 0.838732* | 0.009541 | 7.02093E-27 | 0 | 0 |
| {8} | 0.043148 | 4.22E-06 | 0 | 0 | 0 |
| {9} | 0.007473 | 0.796945* | 7.10041E-15 | 0 | 0 |
| {10} | 0.946175* | 0.019283 | 7.49989E-26 | 0 | 0 |
| Clase | {6} | {7} | {8} | {9} | {10} |
| {1} | 0.042592 | 0.838732* | 0.043148272 | 0.007473 | 0.946175* |
| {2} | 0.40601* | 0.009541 | 4.21633E-06 | 0.796945* | 0.019283 |
| {3} | 2.03E-23 | 7.02E-27 | 0 | 7.1E-15 | 7.5E-26 |
| {4} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| {5} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| {6} | | 0.1173* | 0.002400818 | 0.410445* | 0.176216* |
| {7} | 0.1173* | | 0.226370475* | 0.029134 | 0.841381* |
| {8} | 0.002401 | 0.22637* | | 0.00045 | 0.15344* |
| {9} | 0.410445* | 0.029134 | 0.000449664 | | 0.046627 |
| {10} | 0.176216* | 0.841381* | 0.153439881* | 0.046627 | |

* las diferencias entre estas clases no son estadísticamente significativas con $p < 0.05$

Tabla 6.11.

| Prueba de Diferencia significativa mínima (LSD Test); Variable: F6813 (tabla_todosidis_28agosto02.sta) | | | | | |
|--|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| Los variables Marcados * no son estadísticamente diferentes a $p < .0500$ | | | | | |
| Clase | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} |
| {1} | | 1.3E-11 | 0 | 0 | 9.41E-25 |
| {2} | 1.3E-11 | | 2.08951E-13 | 7.83E-22 | 5.3E-08 |
| {3} | 0 | 2.09E-13 | | 0.002583 | 0.414334* |
| {4} | 0 | 7.83E-22 | 0.002582798 | | 0.000518 |
| {5} | 9.41E-25 | 5.3E-08 | 0.414333667* | 0.000518 | |
| {6} | 2.46E-06 | 0.73735* | 8.40728E-08 | 4.35E-14 | 3.27E-05 |
| {7} | 0.996568* | 0.000369 | 5.08845E-17 | 2.38E-24 | 1.26E-12 |
| {8} | 0.435251* | 0.000652 | 1.1547E-18 | 1.17E-26 | 3.42E-13 |
| {9} | 0.695058* | 0.000199 | 1.06168E-16 | 9.28E-24 | 1.22E-12 |
| {10} | 0.510471* | 2.99E-05 | 4.05387E-19 | 1.2E-26 | 2.69E-14 |
| Clase | {6} | {7} | {8} | {9} | {10} |
| {1} | 2.46E-06 | 0.996568* | 0.43525077* | 0.695058* | 0.510471* |
| {2} | 0.73735* | 0.000369 | 0.000651596 | 0.000199 | 2.99E-05 |
| {3} | 8.41E-08 | 5.09E-17 | 1.1547E-18 | 1.06E-16 | 4.05E-19 |
| {4} | 4.35E-14 | 2.38E-24 | 1.17184E-26 | 9.28E-24 | 1.2E-26 |
| {5} | 3.27E-05 | 1.26E-12 | 3.4222E-13 | 1.22E-12 | 2.69E-14 |
| {6} | | 0.001082 | 0.002376687 | 0.000571 | 0.000152 |
| {7} | 0.001082 | | 0.598746015* | 0.763047* | 0.624744* |
| {8} | 0.002377 | 0.598746* | | 0.40745* | 0.289749* |
| {9} | 0.000571 | 0.763047* | 0.40744984* | | 0.865915* |
| {10} | 0.000152 | 0.624744* | 0.289748871* | 0.865915* | |

* las diferencias entre estas clases no son estadísticamente significativas con $p < 0.05$

Tabla 6.12.

| Prueba de Diferencia significativa mínima (LSD Test); Variable: PHI (tabla_todosidis_28agosto02.sta) | | | | | |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Los variables Marcados * no son estadísticamente diferentes a $p < .0500$ | | | | | |
| Clase | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} |
| {1} | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| {2} | 0 | | 0.00071 | 0.000316 | 0.005801 |
| {3} | 0 | 0.00071 | | 0.544543* | 0.890158* |
| {4} | 0 | 0.000316 | 0.544543* | | 0.499766* |
| {5} | 0 | 0.005801 | 0.890158* | 0.499766* | |
| {6} | 9.67E-14 | 1.05E-06 | 2.4E-12 | 3.64E-12 | 3.79E-10 |
| {7} | 0.010574 | 7.44E-16 | 1.6E-22 | 1.18E-21 | 4.39E-19 |
| {8} | 0 | 0.032935 | 0.457958* | 0.21879* | 0.585441* |
| {9} | 0 | 2.7E-06 | 0.031542 | 0.125368* | 0.03493 |
| {10} | 0 | 0.090952* | 0.421624* | 0.212897* | 0.530201* |
| Clase | {6} | {7} | {8} | {9} | {10} |
| {1} | 9.67E-14 | 0.010574 | 0 | 0 | 0 |
| {2} | 1.05E-06 | 7.44E-16 | 0.032935 | 2.7E-06 | 0.090952* |
| {3} | 2.4E-12 | 1.6E-22 | 0.457958* | 0.031542 | 0.421624* |
| {4} | 3.64E-12 | 1.18E-21 | 0.21879* | 0.125368* | 0.212897* |
| {5} | 3.79E-10 | 4.39E-19 | 0.585441* | 0.03493 | 0.530201* |
| {6} | | 0.001455 | 7.07E-09 | 5.14E-14 | 3.06E-07 |
| {7} | 0.001455 | | 1.67E-17 | 6.78E-23 | 1.22E-14 |
| {8} | 7.07E-09 | 1.67E-17 | | 0.00941 | 0.892065* |
| {9} | 5.14E-14 | 6.78E-23 | 0.00941 | | 0.011693 |
| {10} | 3.06E-07 | 1.22E-14 | 0.892065* | 0.011693 | |

* las diferencias entre estas clases no son estadísticamente significativas con $p < 0.05$

A dos horas de reperfusión después de 1 hora o dos horas de oclusión, los parámetros de amplitudes y fase no tienen diferencia significativa comparado cuando el animal esta sano con $p < 0.05$.

En la tabla 6.12 se nota que en las clases después de largo tiempo de oclusión total (clase 3, 4 y 5), los cambios en las mediciones de pH_i no presentan significancia estadística. Lo anterior debido a que las mediciones del pH_i no cambian después de que el tejido llega a ser isquémico.

6.9. Relación entre algunos parámetros de espectroscopia de impedancia y pHi medidos en tejido intestinal vivo.

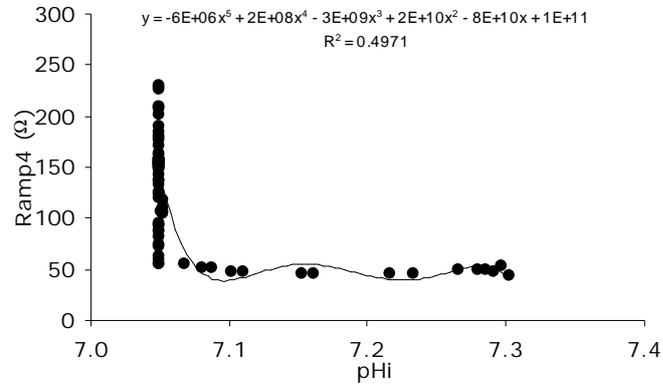


Figura 6.23. grafica de la Relación de correlación dentro los resultados de estimación de la resistencia Ramp4 del modelo del tejido vivo y calculada por el algoritmo de estimación por descenso por gradiente y las mediciones de pHi en el mismo tejido intestinal. Las mediciones fueron durante 240 minutos y son datos del sujeto #34 grupo 4.

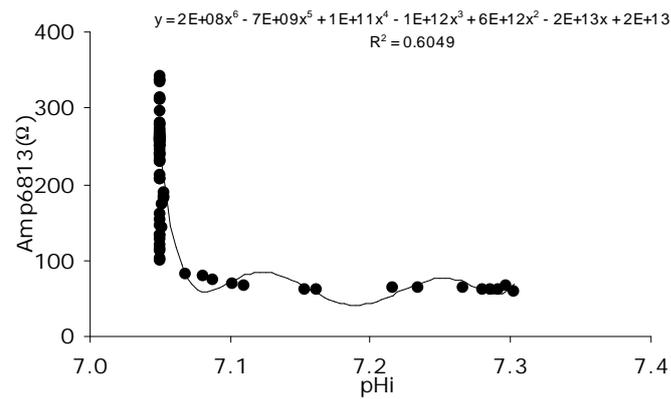


Figura 6.24. grafica de la Relación de correlación dentro las mediciones de las amplitudes de impedancia a la frecuencia 6.813 KHz "Amp6813", y las mediciones del pHi en el tejido intestinal. Las mediciones fueron durante 240 minutos y son datos del sujeto #34 grupo 4.

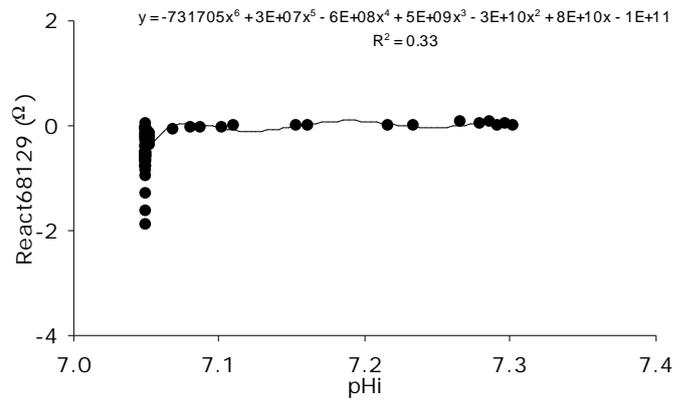


Figura 6.25. gráfica de la Relación de correlación dentro las reactancias de la impedancia calculadas de los amplitudes y fases normalizadas de la frecuencia 68.129 KHz "React68129", y las mediciones del pHi en el tejido intestinal. Las mediciones fueron durante 240 minutos y son datos del sujeto #34 grupo 4.

6.10. Relación entre algunos parámetros de espectroscopia de impedancia y IDI calculado mediante el algoritmo propuesto en esta tesis.

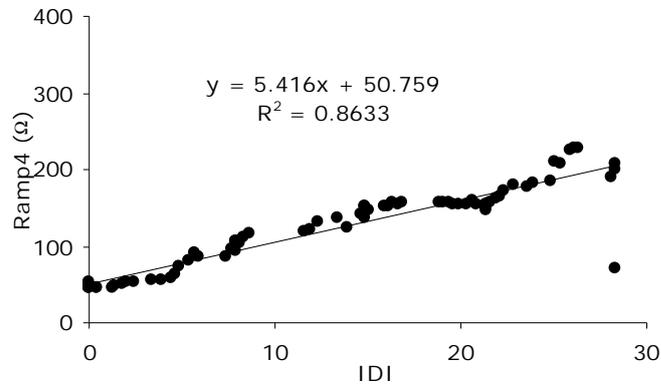


Figura 6.26. grafica de la Relación de correlación dentro los resultados de estimación de la resistencia Ramp4 del modelo del tejido vivo y calculada por el algoritmo de estimación por descenso por gradiente y los resultados del Índice de daño isquémico "IDI" calculado de las mediciones de la pHi en el tejido intestinal. Las mediciones fueron durante 240 minutos y son datos del sujeto #34 grupo 4.

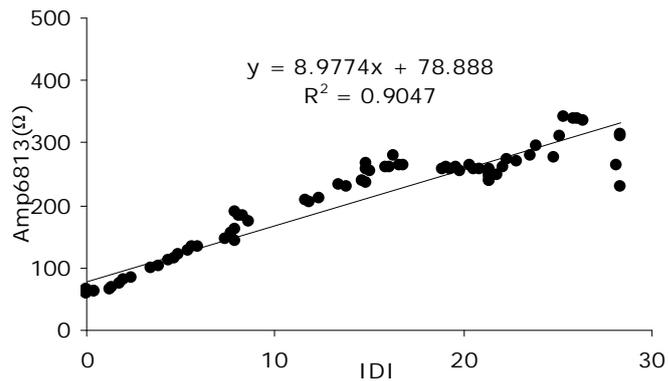


Figura 6.27. grafica de la Relación de correlación dentro las mediciones de las amplitudes de impedancia a la frecuencia 6.813 KHz "Amp6813" y los resultados del Índice de daño isquémico "IDI" calculado de las mediciones del pHi en el tejido intestinal. Las mediciones fueron durante 240 minutos, y son datos del sujeto #34 grupo 4.

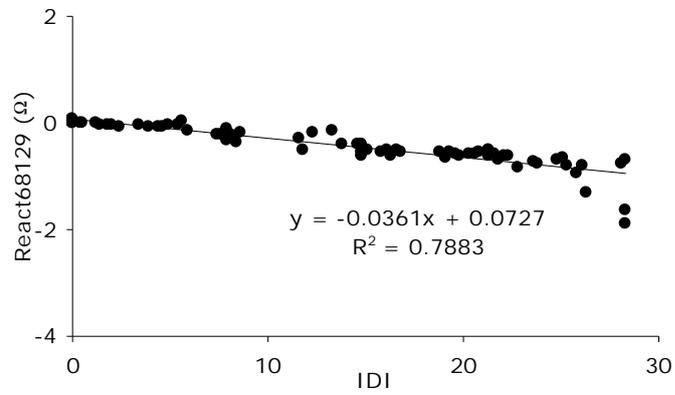


Figura 6.28. grafica de la Relación de correlación las reactancias de la impedancia calculadas de las amplitudes y fases normalizadas de la frecuencia 68.129 KHz "React68129", los resultados del Índice de daño isquémico "IDI" calculado de las mediciones del pH*i* en el tejido intestinal. Las mediciones fueron durante 240 minutos y son datos del sujeto #34 grupo 4.

Comparación entre resultados de espectrometría de impedancia y la pHi medidos en tejido intestinal:

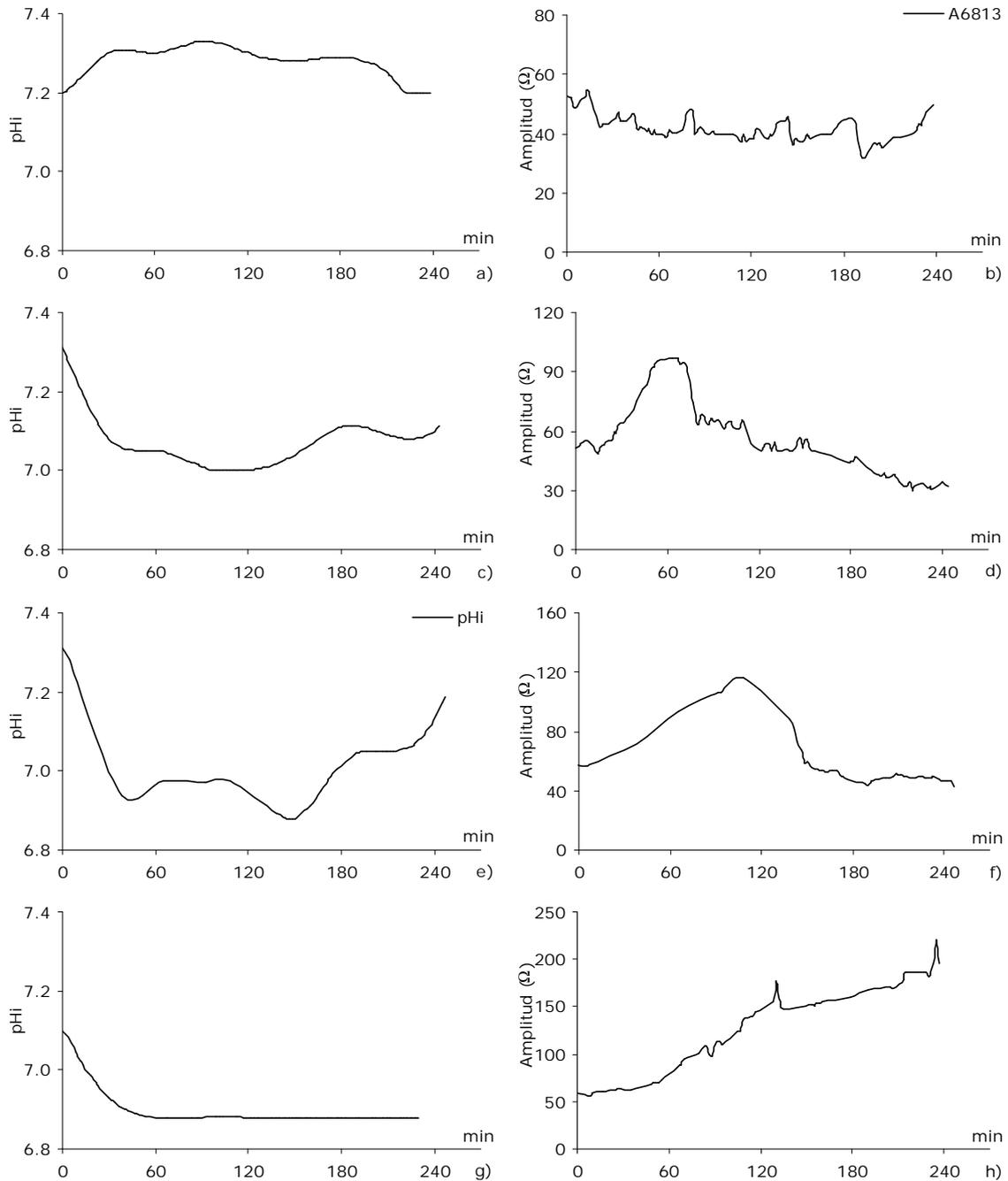


Figura 6.29. presentaciones de graficas de los parámetros de pHi y amplitudes de impedancia medidas en tejido intestinal vivo durante 240 minutos en cuatro experimentos diferentes. Cada experimento es de un grupo diferente en el estudio animal: las graficas a) y b) resultados de la pHi y de amplitudes de impedancia respectivamente en el experimento #20, y grupo #1 "Control"; c) y d) resultados del pHi y de amplitudes de impedancia respectivamente en el experimento #22, grupo #2; e) y f) resultados del pHi y de amplitudes de impedancia respectivamente en el experimento #30, grupo #3; las gráficas g) y h) resultados del pHi y de amplitudes de impedancia respectivamente en el experimento #34, grupo #4 "mediciones de isquemia 4 horas de oclusión total. Resultados de pHi medidos usando el tonómetro, y Las mediciones de amplitudes a la frecuencia 6.813kHz.

Comparación entre resultados de espectrometría de impedancia y la Índice de daño isquémico (IDI) calculados desde los datos de pHi correspondientes:

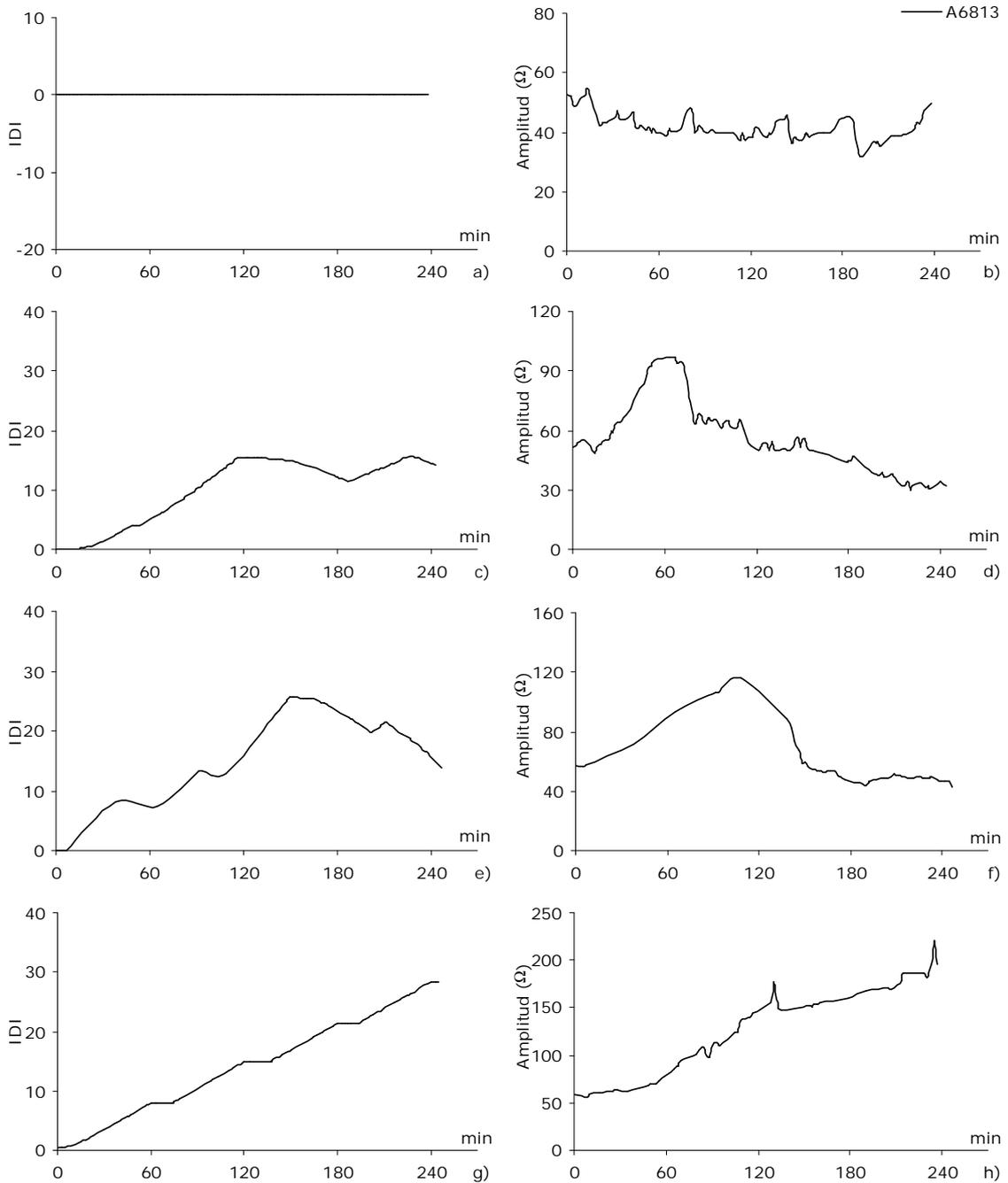


Figura 6.30. comparación entre resultados de los parámetros de pHi medidos en tejido vivo durante 240 minutos y los Índices de Daño Isquémico correspondientes contra el tiempo durante 240 minutos en cuatro experimentos diferentes. Cada experimento es de un grupo de estudio animal diferente: las graficas a) y b) muestran los resultados del pHi y el Nivel de daño isquémico respectivamente en el experimento #20, y grupo 1 control; c) y d) son resultados del pHi y Nivel de daño isquémico respectivamente en el experimento #22, grupo 2 mediciones de isquemia con reperfusión a 1 hora de oclusión total; e) y f) son resultados del pHi y Nivel de daño isquémico respectivamente en el experimento #30, grupo 3 mediciones de reperfusión a 2 horas de oclusión total; y las graficas finales g) y h) son resultados del pHi y Nivel de daño isquémico respectivamente en el experimento #34, grupo 4 mediciones de isquemia a 4 horas de oclusión total".

6.11. Análisis de repetibilidad y estimaciones de generalización (Redes neuronales): estimando NpHi, NDI y Clase de cada espectro.

Los resultados de experimentos que se presentaron anteriormente, tienen varianzas muy altas, son relativamente dependientes de muchos factores complejos. En el actual análisis se va a tratar de mostrar el nivel de generalización en los datos de espectroscopia de impedancia para representar la isquemia, el Índice de Daño Isquémico y la Clase propuesta mediante el protocolo experimental como clasificación de la gravedad de choque por la oclusión y la reperfusión de la arteria mesentérica superior cuya función es el suministro de sangre al intestino delgado.

Se utilizan las redes neuronales para este propósito. Una red simple, fácil de armar y que da idea clara de la reproducibilidad y nivel de generalización en los datos.

En el presente análisis se presenta comparación en el desempeño de dos tipos de redes neuronales: la primera es una red de retropropagación o back propagación, la segunda es la red de clasificación llamada red de cuantificación de vector de aprendizaje (Learning Vector Quantization, LVQ).

Tres combinaciones de tablas de 12 variables en las entradas: 1) A681_N, 2)A6813_N, 3) A68129-N, 4) F6813_N, 5) F68129_N, 6) F681292_N, 7) PDAMP111_IV, 8) PDFASE11_IV, 9) PDRES111_IV, 10) PDREACTI_111, 11) RAMP3, y 12) RAMP4; y las salidas son: a) la primera tabla tiene las salidas que corresponden a las clases en los que pertenecen los espectros, b) la segunda tabla tiene 4 salidas que corresponden a los 4 intervalos de niveles de pHi a los que pertenecen los espectros, c) la tercera tabla tiene 4 salidas que corresponden a los 4 Niveles de daño isquémico o representan 4 intervalos de Niveles de Daño isquémico calculados en el algoritmo propuesto para esta tesis desde los datos del pHi medidos en el tejido intestinal. Cada tabla se separa en dos partes una para el entrenamiento (tres cuartos de los espectros escalados por el orden original), y otra para la prueba(un cuarto de los espectros escalados por el orden original).

Tabla 6.13. muestra resultados con datos de Entrenamiento y prueba de tres redes neuronales de tipo (LVQ) que tienen 12 entradas y 50 nodos en la capa de Kohonen y las salidas son; 1) 5 clases que pertenecen a los datos en este análisis; 2) 4 salidas de los 4 Niveles de pHi "NpHi"; y 3) 4 salidas de las 4 Niveles de Daño Isquémico NDI. Se entrenaron al mismo numero de iteraciones 200000. Los datos de entrenamiento son los selectos de los tres cuartos de los espectros resultantes en los experimentos incluidos en Tabla 6.2 sin los espectros de reperfusión (espectros de todos los grupos en el protocolo animal), los datos de prueba son el ultimo cuarto de los datos mencionados.

| Datos de Clases 0,11, 12, 13, 14 | LVQ | | |
|-------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|
| | Variables | Resultados de datos de Entrenamiento | Resultados de datos de prueba |
| Orden | | | |
| 1 | Clase | 0.96 | 0.90 |
| 2 | NpHi | 0.95 | 0.71 |
| 3 | NDI | 0.96 | 0.88 |

Tabla 6.14. Muestra resultados con datos de entrenamiento y prueba de tres redes neuronales de tipo (Back propagación) que tienen 12 neuronas de entradas, 12 en la primera capa oculta, 12 en la segunda capa oculta, y 5 en la tercera capa oculta, y las salidas son; 1) 5 salidas de las cinco clases que pertenecen los datos en este análisis; 2) 4 salidas de las 4 Niveles de pHi "NpHi"; y 3) 4 salidas de los 4 Niveles de Daño Isquémico NDI; comparadas con resultados de tres redes neuronales de tipo (LVQ) que tienen 12 entradas y 50 nodos en la capa de Kohonen y las mismas salidas. Los datos de entrenamiento son los selectos de las tres cuartas de partes de los espectros resultantes del grupo 4 de oclusion total y sin reperfusion en el protocolo animal en los experimentos incluidos en Tabla 6.2. Los datos de prueba son la ultima cuarta parte de los datos mencionados.

Tabla 6.14.

| Datos Grupo4 | Red de Back propagación | | | |
|-----------------|---|--|---|--|
| | Resultados con Datos entrenamiento | | Resultados con Datos de pruebas | |
| | Porcentaje generalización clases indicados | Porcentaje error clases vecinos | Porcentaje generalización clases indicados | Porcentaje error clases vecinos |
| | Clase | 0.98 | 0.02 | 0.84 |
| NpHi | 0.93 | 0.05 | 0.91 | 0.06 |
| NDI | 0.92 | 0.08 | 0.84 | 0.15 |
| Datos Grupo4 | Red de LVQ | | | |
| | Resultados con Datos entrenamiento | | Resultados con Datos de pruebas | |
| | Porcentaje generalización clases indicados | Porcentaje error clases vecinos | Porcentaje generalización clases indicados | Porcentaje error clases vecinos |
| | Clase | 0.99 | 0.01 | 0.91 |
| NpHi | 0.99 | 0.01 | 0.94 | 0.05 |
| NDI | 0.98 | 0.02 | 0.90 | 0.07 |

Tabla 6.15. Muestra los resultados con datos de entrenamientos y pruebas de una red neuronal de tipo (LVQ) que tiene 12 entradas y 50 nodos en la capa de Kohonen y las salidas son 4 Niveles de Daño Isquémico NDI. Los datos de entrenamiento son los selectos de las tres cuartas de partes de todos los espectros resultantes en los experimentos incluidos en Tabla 6.2, los de prueba son la ultima cuarta parte de los datos mencionados.

| Todos los espectros | Red LVQ | | | |
|---------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|
| | Resultados con Datos entrenamiento | | Resultados con Datos de pruebas | |
| Variables | Porcentaje generalización clases indicados | Porcentaje error clases vecinos | Porcentaje generalización clases indicados | Porcentaje error clases vecinos |
| NDI | 0.91 | 0.05 | 0.83 | 0.12 |

Tabla 6.16. los resultados con datos de entrenamientos y pruebas de dos redes neuronales de tipo (Back propagación) que tienen 12 neuronas de entradas, 12 en la primera capa oculta, 12 en la segunda capa oculta, y 5 en la tercera capa oculta, y 2 salidas de Niveles de pHi ($pHi > 7.15$, y $pHi \leq 7.15$); compradas con resultados de una red neuronal de tipo (LVQ) que tienen 12 entradas y 50 nodos en la capa de Kohonen y las mismas salidas. En la primera renglón "NpHi¹", Los datos de entrenamientos son selectos de las tres cuartas de partes de todos los espectros resultantes en los experimentos incluidos en "Tabla 6.2" sin los espectros de reperfusión, los datos de prueba son de la ultima cuarta parte de los datos mencionados. En el renglón NpHi², Los datos de entrenamientos son selectos de las tres cuartas de partes de todos los espectros resultantes en los experimentos de grupo 4 "isquemia total sin reperfusión" y de prueba son de la ultima cuarta parte de los datos mencionados.

| Datos Sin reperfusión | Back propagación | | LVQ | |
|--|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | Resultados con Datos entrenamiento | Resultados con Datos de pruebas | Resultados con Datos entrenamiento | Resultados con Datos de pruebas |
| NpHi ¹ (Clases 0, 11, 12, 13, 14) | 0.79 | 0.77 | 0.96 | 0.86 |
| NpHi ² (grupo 4) | 0.98 | 0.97 | 1 | 0.93 |

NpHi^{1,2}: Son dos niveles de pHi ($pHi > 7.15$, y $pHi \leq 7.15$).

Capítulo 7

7. Discusiones

Este capítulo se divide en dos grandes secciones: desarrollo del espectrómetro de impedancia compleja y análisis de los resultados de caracterización realizados. Primero se discute el proceso del desarrollo del equipo, llegando a la segunda versión del prototipo del espectrómetro de impedancia; el cual fue usado en la medición de los resultados presentados en esta tesis. Luego, se discute el protocolo y el estudio animal, analizando las dificultades encontradas durante los experimentos animales, y se explican las mejoras aplicadas al protocolo y los experimentos desarrollados. Se analizan las características de los procedimientos de medición de impedancia, de medición del pH_i tisular, y los resultados del algoritmo desarrollado para la estimación del nivel de daño isquémico.

7.1. Diseño del espectrómetro de impedancia

Durante el curso de esta investigación se desarrollaron dos generaciones del espectrómetro de impedancia. Cada generación del instrumento se ha probado y evaluado en una serie de estudios animales^[44, 48]. Durante este proceso se han obtenido conclusiones importantes del funcionamiento del instrumento que brindan futuras mejoras a las aplicaciones realizadas.

La teoría aplicada en la primera generación del espectrómetro de impedancia fue original y por primera vez el desarrollo matemático propuesto fue aplicado al cálculo de impedancia compleja[44], siendo un híbrido entre el método de puente y el método de muestreo sincronizado, y este método se sigue utilizando en las otras generaciones para el prototipo utilizado en esta investigación. Por otro lado, el diseño del hardware y el software también fue original, aunque presenta cierto paralelismo con el diseño de Ristic [1], sólo en algunas etapas, como en la etapa de generación de funciones.

En la primera generación, el instrumento tenía la capacidad de medir la impedancia compleja en un rango de frecuencias de 100 Hz a 300 KHz de manera óptima, empleando una corriente de excitación de 5 mA_{p.p.}. En esta versión se utilizaron componentes electrónicos comerciales y económicos (TL084, XR2228, e inclusive la tarjeta de adquisición "DAS08").

La corriente fue generada utilizando un circuito de retroalimentación con el amplificador operacional TL084. Tomando el voltaje entregado por el AD7008 y convirtiéndolo a corriente, pudiendo cambiar la corriente de salida mediante un potenciómetro[44]. Este circuito tenía diferentes desventajas, como el empleo de un capacitor como interfase entre el AD7008 y el sistema convertidor de voltaje a corriente. Esta capacitancia, junto con la impedancia de entrada de la fuente de corriente forma un filtro pasa-altas y limita el empleo del sistema a frecuencias mayores a 50 Hz. Además, el diseño del control de la fuente de corriente tenía un límite en su respuesta en frecuencia porque los amplificadores (TL084) son de baja respuesta en frecuencia (a menos de 300 KHz), por lo que el rango efectivo fue aproximadamente de 50 Hz a 300 KHz. Por otra parte, los multiplicadores XR2228 utilizados en la primera generación del prototipo presentan buena respuesta en frecuencia, pero es difícil ajustar ambas ganancias para todas las frecuencias, creando un desbalance (errores en amplitud) si no se logra ajustarlos en forma óptima. Los sistemas de control y calibración tenían que ser idénticos para cada multiplicador.

La segunda generación de este prototipo (tampoco es la final) la cual fue utilizada para las mediciones de los resultados presentados en este manuscrito, fue optimizada para operar en un rango de frecuencia de 100Hz-1MHz, y con corriente de excitación de salida controlada con un selector manual que varía de 0.2mA a 10mA (figura 3.13).

La fuente de corriente produce una corriente alterna de salida con una amplitud constante a frecuencias arbitrarias. La amplitud del voltaje de entrada de dicha fuente de corriente es controlada por medio de un amplificador de ganancia programable AD600, y su frecuencia es controlada por la PC programando los generadores de funciones AD7008 (ver la sección 3.3.1.). La fuente de corriente está formada por dos amplificadores operacionales (TL084), y un amplificador operacional de retroalimentación de corriente, y 60MHz de ancho de banda (AD844AN). La configuración de la fuente de corriente elimina por completo el voltaje DC.

En el amplificador de ganancia programable AD600, su ganancia se encuentra controlada por un circuito análogo que selecciona el voltaje de control de la ganancia indicada. A través de dicho amplificador AD600 se puede variar el voltaje de control de corriente en la entrada de la fuente de corriente, el cual debe encontrarse en un valor aproximado de 900 mV para que el valor de corriente sea de 5 mA. La frecuencia de la corriente en la fuente de corriente es la frecuencia de la señal generada en el generador de funciones de la señal del tejido "AD7008".

Cabe mencionar que el sistema manual de control de amplitud de la corriente utilizado tiene dos inconvenientes: 1) a bajas corrientes como 0.2 mA, un alto nivel de ruido contamina las señales generadas; y 2) con la corriente alta de 10mA, el voltaje en la salida del AD600 pasa los límites en la entrada de la fuente de corriente para mantener la corriente en el rango lineal; el voltaje de entrada del AD844 debe mantenerse por debajo de 1V.

El multiplicador AD539 análogo que tiene dos canales de señales idénticas, entrada común y control de ganancia lineal, es utilizado para desplazar los dos circuitos integrados de multiplicadores XR2228 utilizados en la primera generación. Este elimina el problema del ajuste de ganancias para todas las frecuencias y el desbalance (errores en amplitud) en los multiplicadores desplazados.

Las Señales de Tejido y de Referencia están acondicionadas antes de ser adquiridas por el convertidor analógico-digital (ADC) del microcontrolador. Dichas señales se amplifican para maximizar el funcionamiento y la resolución del equipo, además se suma un offset de 2.5 Volts a cada señal. El rango en el que funciona el ADC es de 0 a +5 Volts. Con el propósito de aprovechar todo el rango de operación del ADC, la amplificación se lleva a cabo con un amplificador con ganancia controlada por voltaje (AD600), y la suma del offset se lleva a cabo con amplificadores operacionales (TL082). El control de ganancia se realiza a través de un circuito análogo que selecciona el voltaje de control de la ganancia indicada (ver Figura 3.22). a través de dicho control se puede variar la ganancia del amplificador AD600 de 2dB hasta 40 dB, usando un selector análogo manual en esta generación del prototipo.

Con respecto a la tarjeta de adquisición DAS08 utilizada en la primera versión, presentaba un problema en su dependencia de la velocidad de la PC y por otro lado, con los tiempos de interrupción, los cuales afectan la adquisición de datos en diferentes formas. En la presente generación, y para el uso práctico del prototipo se reemplazó con un sistema de adquisición y comunicación compuesto principalmente por un microcontrolador microchip modelo PIC16C773SP controlado por el puerto serial de la PC. La transmisión serial se realiza a través del USART del microcontrolador, es decir, un protocolo serial RX/TX, el cual tiene conexión directa con el puerto serial de la PC. La PC envía los datos de frecuencias al microcontrolador,

éste programa los dispositivos correspondientes serialmente, y adquiere las señales de tejido y de referencia. La adquisición analógica se lleva a cabo en dos canales del convertidor análogo digital (AN0 y AN1). El convertidor análogo digital es de 12 bits de resolución. El voltaje de la señal a adquirir debe ir de 0 a +5 Volts, y se programa la frecuencia de muestreo a 3.2KHz, con lo cual se obtienen 32 datos en un ciclo de señal de 100 Hz por cada una.

La base de datos en la primera versión guardaba las señales por separado. Cada dos señales (tejido y referencia) a una sola frecuencia, se almacenan en un archivo; mientras los datos del procedimiento y las referencias deben llevarse separado en otros archivos. En la segunda generación, se utilizó una base de datos más completa donde se guarda toda la información de interés, espectros, sujetos, datos de control y comentarios.

El espectrómetro en la primera generación fue controlado por la PC programando en lenguaje C, y bajo ambiente de MS-DOS. Mientras que en la nueva generación se utiliza un software con interfase de usuario que opera en ambiente de Microsoft Windows y está escrito en lenguaje Visual Basic.

Basado en las pruebas del diseño del espectrómetro de impedancia en la presente generación, se puede concluir que:

- El sistema de software y hardware operan en la forma esperada.
- El sistema es muy fácil de usar y tiene una interfase gráfica entendible.
- El funcionamiento global del instrumento es bueno.

7.2. Resultados del Estudio Animal

Todos los experimentos se realizaron in vivo, presentando muchas variaciones y dificultades que afectan a las mediciones realizadas.

7.2.1 Protocolo animal

Durante los experimentos animales ocurrieron muchas dificultades, que se encuentran relacionadas con el protocolo utilizado:

Procedimiento quirúrgico largo: el procedimiento quirúrgico en el experimento es demasiado traumático y dura mucho tiempo. Además, los intestinos delgados llegan a estar casi isquémicos cuando el procedimiento quirúrgico está terminando y se inician las mediciones. Esto induce errores en las mediciones porque, tanto las mediciones de espectroscopia de impedancia como de pH_i en el tejido, están alteradas desde sus niveles de base cuando el tejido tiene de estar sano.

Procedimiento de disminución de la perfusión: En los experimentos, la disminución de la perfusión como resultado de la oclusión parcial causada por la sonda del flujómetro y/o la seda de oclusión rodeando la arteria mesentérica superior que suministra la sangre al tejido intestinal, no siempre causan un daño porque el tejido permanece sin isquemia un periodo largo. También en los casos de la reperusión después de una o dos horas de oclusión; Niveles altos de reducción en la perfusión sanguínea altera las mediciones y se confunde con la respuesta sistemática del cuerpo a la isquemia.

Cuando el suministro de sangre a los intestinos está reducido y no es suficiente para todo el tejido, se puede dar que algunas partes permanezcan sin isquemia mientras que otras partes se hacen isquémicas; y hay casos donde las

mediciones de pH_i indican tejido dañado y las mediciones de espectroscopia de impedancia indican tejido sano, o viceversa. También se presenta que los niveles de medición varían de acuerdo al lugar donde se coloca la sonda.

Las repeticiones en la isquemia en los grupos de reperfusión: típicamente en los experimentos con isquemia total, o isquemia con reperfusión se tratan de tener repeticiones en todos los grupos experimentales. Desafortunadamente, el mal manejo de la dieta de los animales, el contenido gástrico, las grandes variaciones en los pesos, el efecto en la administración de líquidos y agente anestésico a los animales, la interfase del animal con otros instrumentos y el control de la temperatura del animal (calentador de la mesa de cirugía con control manual), afectan en forma directa o indirecta los resultados incluidos y causaron la exclusión de muchos experimentos realizados. Este efecto fue más notable en los grupos de experimentación con reperfusión sanguínea después de un período de isquemia, donde se espera que el tejido se recupere después de la alteración causada por la isquemia. Sin embargo, los experimentos con isquemia de oclusión total se afectan por las variaciones anteriores, pero este afecto es parcialmente bajo comparado con la gravedad del daño por la oclusión total aplicado al tejido bajo estudio.

Artefactos de mediciones en niveles de la oxigenación sanguínea: mediciones de base o control largas muestran que la impedancia y pH_i medidos en tejido están influenciados por los niveles de la oxigenación sanguínea de los animales. Las variaciones en niveles de oxígeno en la sangre influyen en el metabolismo celular. El pH_i y la impedancia están indirectamente relacionados con el metabolismo celular, y los datos medidos están influidos por las variaciones en el nivel de oxígeno. Estas variaciones se originan desde los cambios en el ritmo respiratorio de los animales, aunque se utiliza un ventilador artificial para controlar el nivel de oxígeno en la sangre; hasta la máquina de anestesia para aplicar el agente anestésico. La administración del agente anestésico (Halotano) y el flujo de oxígeno y de aire en el ventilador artificial presentaron muchas variaciones entre un animal y otro.

A pesar de todos estos problemas observados, el estudio animal contiene una gran cantidad de datos de mediciones relativamente correctas y útiles, y conforme progresa el estudio animal se mejoran significativamente los resultados obtenidos.

7.2.2 Resultados de mediciones hemodinámicas

Durante el curso de los experimentos animales, se realizaron mediciones de muchas variables hemodinámicas y de gases sanguíneos, con el propósito de caracterizar el estado del animal bajo las condiciones aplicadas en la práctica actual para la caracterización de la isquemia y del daño isquémico. Cabe recordar que en el presente protocolo la isquemia fue inducida en los intestinos en forma local, a través de la oclusión temporal de la arteria mesentérica superior; mientras que algunas mediciones fueron realizadas en los intestinos directamente, como el pH_i y el flujo sanguíneo en la arteria mencionada. Muchas de las otras mediciones fueron realizadas a nivel general, como mediciones del sistema respiratorio, de la sangre, y del sistema cardiovascular. Las últimas mediciones muestran la respuesta sistémica del cuerpo a la isquemia generada en los intestinos para la compensación del daño generado o inducido.

Mediciones del flujo de sangre en la arteria mesentérica superior: estas mediciones fueron realizadas directamente en la arteria mencionada a la misma altura donde se realiza la oclusión. Las mediciones reflejan los altos niveles de control para la inducción de la isquemia propuesta en el protocolo. En la figura 6.1 se muestran promedios y desviaciones estándar de las mediciones relativas (promediados por grupo y por intervalos de 30 minutos) de todos los datos en los experimentos incluidos en estos resultados. Se puede notar la exactitud en el control del flujo y la diferencia en las mediciones entre grupos. Siempre la oclusión se realiza en el tiempo cero, y la reperfusión después de 1 hora de oclusión, dos horas o hasta el final del experimento, según el grupo experimental. El flujo sanguíneo en los casos de reperfusión no llega a recuperarse totalmente, sino que se observa una pequeña diferencia entre el grupo control y el segundo grupo (se recupera bien); mientras que la diferencia es muy grande y clara en el tercer grupo (no recupera en todos) y eso se debe a que el animal está en choque descompensado y libera citoxinas, óxido nítrico y se liberan factores de depresión del miocardio. En el grupo de oclusión total se observa el cierre total del flujo en la arteria mencionada. En todos los grupos disminuye el flujo después de casi tres horas de iniciado el experimento, lo cual se debe a las dificultades de mantener el estado estable de los animales después una cirugía tan larga y traumática, y por el estrés del animal por la liberación de catecolamina (adrenalina) aunque se encuentre anestesiado. También la administración del agente anestésico (halotano) en cantidades altas, presenta baja en la presión arterial lo cual afecta directamente el flujo medido.

La frecuencia cardíaca: en la gráfica 6.2 se muestran los cambios relativos de los promedios y desviaciones estándar de las mediciones de frecuencia cardíaca realizadas para todos los grupos. La comparación no muestra diferencias significativas entre grupos, el primer grupo que es el control, está estable todo el tiempo; en el segundo grupo que es el de reperfusión después de 1 hora de oclusión, se observa como una etapa de choque compensado donde se aumenta la frecuencia cardíaca (respuesta simpática); y en el tercer grupo se ve una respuesta de incremento después 1 hora de oclusión.

La resistencia vascular sistémica RVS: En la gráfica 6.3 se presentan los cambios relativos de los promedios y desviaciones estándar de las mediciones de resistencias vasculares sistémicas realizadas para todos los grupos. No se nota diferencia significativa en los cambios durante los tiempos de mediciones.

La presión de oxígeno arterial PaO₂: en la gráfica 6.4. no se presenta mucha variación en los cambios de las mediciones para los diferentes grupos en los experimentos.

La presión de bicarbonato arterial PaCO₂: en la gráfica 6.5. tampoco se observa mucha variación en los cambios de las mediciones para los diferentes grupos en los experimentos.

Resumiendo lo anterior, se puede notar claramente que aun los intestinos están en estados muy variados de daño e isquemia los cuales están presentados en las gráficas de flujo sanguíneo en la arteria mesentérica superior; mientras que las otras variables hemodinámicas globales presentes no presentan cambios significativos. Esto quiere decir que las mediciones de los parámetros hemodinámicas tardan en representar una alteración severa en uno de los órganos del cuerpo "los intestinos".

7.2.3. Resultados de mediciones de Espectroscopia de Impedancia

Varias conclusiones pueden ser derivadas a partir de las mediciones de impedancia realizadas en el tejido intestinal.

En las gráficas de los parámetros de impedancia mostrados en las figuras 6.9-6.12, se puede apreciar la consistente respuesta de las mediciones de impedancia al flujo sanguíneo en el tejido intestinal (en un ancho de banda de 1MHz). Las mediciones presentan una respuesta plana en el grupo control y antes de inducir la isquemia (figura 6.9), al inicio de la oclusión del flujo sanguíneo, los parámetros de impedancia presentan un aumento de las amplitudes y resistencias, así como un incremento en las fases y reactancias, estos cambios son relativos y corresponden a los tiempos en los que las condiciones son iguales. La respuesta a la reperfusión (gráficas de 6.10 y 6.11), se observa que los valores de impedancia regresan a valores parecidos a los iniciales o antes de la oclusión, después de un periodo de tiempo se nota el inicio de una alteración de las mediciones que puede representar la respuesta del tejido a la reperfusión.

La comparación de las gráficas 6.13 y 6.8, con la gráfica de los valores promedios 6.18, se puede inferir un nivel de reproducibilidad en las mediciones de impedancias entre diferentes sujetos del mismo grupo experimental, entre diferentes sondas de la misma generación así como en el mismo experimento o sujeto.

El comportamiento de la impedancia del tejido durante la isquemia: un alto incremento en la resistencia del tejido a bajas frecuencias está muy influenciado por el mecanismo de edema durante la isquemia. La consecuencia de la isquemia es que el fluido extracelular entra a las células del tejido, estas células aumentan de tamaño mientras que el espacio extracelular disminuye en volumen. La corriente de excitación a bajas frecuencias no puede entrar a las células, solamente pasa a través el espacio extracelular. Así, la ruta de la corriente se hace más larga y angosta, y la resistencia a bajas frecuencias se incrementa.

La resistencia a altas frecuencias no se altera con los cambios en la estructura celular de los tejidos durante la isquemia. Solamente depende de los cambios en la resistividad tisular. La resistividad tisular a altas frecuencias es la suma de la resistividad extracelular e intracelular. También, se puede suponer que esta suma permanece constante con la isquemia. Las mediciones presentes en esta tesis muestran que no son constantes, se incrementan con la isquemia; sin embargo, sus cambios son relativamente pequeños. Una de las razones del incremento en la resistividad intracelular es el pequeño decremento relativo en las concentraciones de electrolitos en la célula por el fluido extracelular.

Cambios observados en la reactancia del tejido durante la isquemia son difíciles de analizar. Estos cambios son relativamente pequeños e influenciados por muchos factores (como la resistencia a bajas y altas frecuencias, capacitancias de la membrana celular, etc.). Los resultados de mediciones obtenidos y el conocimiento actual de los mecanismos fisiológicos de la isquemia no son suficientes para la identificación de la fuente de los cambios.

Un patrón bien identificado en las mediciones de impedancia con isquemia tanto para los cambios de resistencia como de amplitudes a frecuencias bajas e intermedias, está dividido en cuatro fases: 1) incremento inicial después de la inducción de la isquemia; 2) por un tiempo el incremento se hace más rápido, 3) la

impedancia llega a saturación y decremento por unos minutos y 4) la impedancia continua en el incremento lentamente.

El modelo de la impedancia tisular: la existencia de la curva de impedancia del tejido en el plano complejo durante la isquemia y el hecho de que la impedancia del tejido regresa a su línea de base después de la reperfusión hace pensar que el tejido retiene su estructura celular durante la isquemia y la membrana celular permanece funcionando. Esta característica justifica el uso del modelo de la impedancia tisular en las regiones de dispersión α y β para la aproximación de la impedancia tisular medida durante las primeras horas de isquemia.

También, este modelo aproxima la impedancia medida en el tejido con alta exactitud, donde hay cierta diferencia es entre la impedancia medida y la modelada a altas frecuencias (más de 600 KHz). En este punto, no hay suficientes datos para la explicación precisa de esta característica. Sin embargo, una posible explicación para esto es que la impedancia medida en el tejido integra propiedades de más de un solo tejido. Y esa es la razón para utilizar un modelo de diferentes constantes de tiempo para simular y estimar esta propiedad, por que cada uno de estos tejidos tiene su característica específica representada por una curva semicircular en el plano de la impedancia compleja. Para ajustar esta diferencia, el modelo de la impedancia realizado consta de más que una curva.

Además, el prototipo del espectrómetro de impedancia en la versión actual presentó alteraciones en las mediciones a altas frecuencias en algunos casos o espectros por causas no conocidas, y su repetición fue aleatoria. Este problema puede ser explicado por una falla en la tierra del prototipo (porque en este prototipo se utiliza una sola tierra para todos los circuitos analógicos y digitales); o por la sonda de medición y el tratamiento de cloruro de plata en la superficie de los electrodos. También se puede pensar en una falla en el aislamiento del animal (porque se presenta cuando el animal llega a tener contacto con la mesa de cirugía y en ambiente húmedo).

Las fuentes de artefactos en las mediciones de la impedancia tisular: las mediciones de impedancia en el tejido intestinal son muy sensibles a varios factores, como el lugar de los electrodos, el movimiento de las sondas, el contenido y los movimientos intestinales, los cuales pueden cambiar la impedancia medida drásticamente. Una vez los electrodos están puestos, se establece una interfase tejido - electrodos. Cuando los electrodos se mueven o se incrementa o cambia el contenido intestinal a su alrededor esta interfase se destruye y las mediciones de impedancia se alteran. Cuando los electrodos se mueven, o el contenido gástrico se acumula a su alrededor en poca cantidad, la mayoría de los parámetros de la espectroscopía de impedancia se cambian ligeramente. Lo anterior se debe a una pequeña diferencia en las propiedades de la interfase de tejido - electrodos, y también a la diferencia en la estructura del tejido entre los electrodos. Cuando el movimiento y la cantidad del contenido intestinal son altos, o se mantienen por largo tiempo, los cambios en la impedancia medida son más grandes y en muchos casos se llega a anular el experimento por esta razón.

Las variaciones observadas en los valores de las impedancias medidas entre experimentos son significativas. Esto hace que los resultados medidos sean difíciles de comparar y analizar, y en algunos casos son la razón para excluir el experimento en su totalidad.

Las dificultades de las mediciones de la impedancia tisular: mediciones de impedancia del tejido intestinal *in vivo* son difíciles de realizar. Es difícil llegar a los intestinos y actuar sobre sus tejidos los cuales son delicados y no hay garantía de que los electrodos están en contacto directo con el tejido, lo cual complica el proceso de medición.

El comportamiento de la impedancia tisular durante la reperfusión: Las mediciones de impedancia en tejido con reperfusión muestran un patrón completamente diferente comparado con el tejido con isquemia por oclusión total. Durante la reperfusión, la impedancia medida cae rápidamente por debajo del nivel isquémico hasta el nivel normal o luego empieza a incrementar, según el grado de isquemia que llegue a sufrir el tejido. Este patrón puede ser reconocido en la mayoría de los experimentos realizados. Esto muestra que el metabolismo del tejido con reperfusión con tiempo de una y/o dos horas de isquemia, puede recuperarse aproximadamente en 10-15 minutos. Sin embargo, después del tiempo inicial pueden quedar algunas secuencias de la isquemia que se reflejan en el incremento de la impedancia siguiente.

Falta aún mencionar que en este protocolo valdría la pena incluir casos de reperfusión después de un tiempo largo de oclusión o isquemia (por ejemplo, reperfusión después tres horas de oclusión), donde se puede mejorar la caracterización del daño por reperfusión.

El comportamiento de la impedancia en tejido no isquémico: mediciones de impedancia de base en el tejido de grupo control durante un tiempo hasta de 4 horas, muestran que los parámetros de impedancia fluctúan dentro de un rango angosto de valores. Esto es importante porque muestra una diferencia significativa dentro las variaciones de los parámetros de la impedancia entre mediciones de control y de isquemia. Los cambios en el tejido isquémico son más rápidos y permanecen continuamente aumentando o disminuyendo durante la isquemia.

Las mediciones del pHi en el tejido no isquémico presentan cambios muy pequeños y permanecen en un rango angosto. Sin embargo, en algunos experimentos realizados como mediciones de control se produjeron cambios en las mediciones tanto de parámetros de impedancia como hemodinámicos y de pHi. Esto se debe a errores en el control de los experimentos, y la dificultad de mantener el animal sano hasta 4 horas luego de una cirugía traumática, pero los cambios corresponden a lo mencionado en discusiones anteriores.

7.2.4. Resultados del algoritmo de cálculo del Nivel de Daño Isquémico NDI

Este algoritmo propuesto para medir el nivel de daño isquémico tisular, está definido como resumen lógico de los estudios anteriores que trataban de estudiar la isquemia y el daño isquémico en un tejido. El daño isquémico se identifica como el resultado de la duración prolongada del tejido bajo isquemia. La idea de calcular este índice de daño isquémico en el tejido intestinal desde las mediciones del pHi, es porque este último es el mejor indicador del nivel de isquemia utilizado en la práctica actual en las salas de la terapia intensiva. La ecuación matemática presentada en la sección 5.1. está basada en una integración en el tiempo del pHi medido en el tejido intestinal. Los resultados de este algoritmo son explicables y comparables con otros

estudios que habían sido reportados en la literatura estudiando este tema, como Haglund et al ^[14], y Hoshino [49].

En este algoritmo y para el cálculo del índice de daño isquémico se toma el valor de $pHi = 7.2$ como límite de un tejido sano, porque se puede apreciar que los animales presentan estabilidad tanto hemodinámica como sistémica siempre y cuando las mediciones de pHi estén por encima de este valor. Sin embargo, valores más bajos reflejan los niveles máximos de isquemia en cada experimento, referenciados a la mínima medición registrada en el curso temporal desde el inicio del experimento hasta la medición en el tiempo que calcula el índice correspondiente; y no se toma un valor constante (como por ejemplo $pHi = 6.87$, el valor de medición mínima en todos los experimentos). Esto ayuda a normalizar los valores calculados por experimento y eliminar el efecto de las altas variaciones en los niveles mínimos de las mediciones del pHi ; además regula la recuperación en los valores del índice calculado en forma lógica y más práctica.

Los resultados de este algoritmo se presentan en la gráfica 6.18. como promedios y desviaciones estándar de los datos calculados desde las mediciones de pHi en el tejido intestinal en diferentes grupos experimentales. En esta gráfica se observa lo siguiente: 1) el grupo control se mantiene con índice de daño isquémico cero durante casi todo el tiempo con una subida ligera en la última media hora, donde el animal está sufriendo fallas sistémicas como resultado de las dificultades de la cirugía y de su control durante el tiempo de mediciones; 2) en el segundo grupo se nota un aumento significativo en el índice de daño calculado durante el tiempo de la oclusión, seguido por normalización a nivel del tejido sano con la reperfusión, y luego de un periodo de tiempo se ve que regresa a aumentarse en forma notable y a un nivel mayor que el correspondiente en el primer grupo, esto debido a la mayor alteración en el tejido; 3) en el tercer grupo el cambio es semejante a lo correspondiente en el segundo grupo con valores más grandes, y un tiempo más largo; se ve que se trata de recuperar después del inicio de la reperfusión (después de 2 horas de oclusión); y 4) en este grupo se ve que el índice de daño calculado se mantiene en aumento durante todo el tiempo, lo cual es lo esperado para este grupo.

7.2.5. Resultados del Modelo de impedancia propuesto para el tejido.

De las gráficas presentadas en la sección 6.5. se puede notar la similitud entre los datos calculados en el modelo comparados con los datos medidos en el tejido vivo. También en todas las gráficas se nota el desempeño del modelo para eliminar el ruido presente en los espectros medidos in vivo. Además, la eliminación de los errores sistémicos en las mediciones es muy notable en la comparación de gráficas de fase, porque las fases son más influenciadas en este tipo de errores, como por ejemplo, los valores de fase positiva y la inconsistencia que presentan la mayoría de las mediciones de fase en los espectros medidos en tejido vivo. Lo anterior explica el resultado de bajo nivel en la correlación entre parámetros de fase medidos in vivo y los calculados en el modelo. En la gráfica 6.22. se comparan los valores de las resistencias estimadas para los modelos con los datos espectrales correspondientes; donde cada componente de resistencia representa un rango de información correspondiente a uno de las constantes de tiempo en el modelo y en muchas de las alteraciones en los datos medidos se puede ver que se reflejan en una de las resistencias presentes. Por ejemplo, los picos presentes en los espectros de amplitudes en la gráfica (6.22.a) se relacionan con la resistencia Ramp4 (gráfica 6.22.b) que es la resistencia en la cuarta componente de tiempo en el modelo y que tendrá que simular el comportamiento del tejido a frecuencias intermedias y altas. Esto quiere decir que estos picos son resultado de cambios a niveles celulares y no es un ruido del sistema de medición. Además, se puede notar que muchas de las alteraciones o inconsistencias presentadas en las gráficas con datos normalizados de amplitudes o las resistencias calculadas desde aquellos datos medidos en el tejido, se comparan con los cambios en los valores de la resistencia del primer componente de tiempo en el modelo que corresponda a frecuencias bajas (comparar con la figura 6.8). Estas alteraciones presentadas después de un tiempo de reperfusión pueden ser cambios a niveles celulares que corresponden a los mecanismos de la compensación en el tejido y que no sean artefactos de errores en la normalización de las mediciones. Otra observación es que la segunda y tercera resistencia en el modelo están con valores referenciados a nivel cero cuando no hay isquemia y están en incremento correspondiente a los incrementos en las amplitudes medidas en caso de la respuesta a la isquemia.

También, la cuarta resistencia en el modelo tiene valor de desplazamiento del nivel 0 de tal forma que representa un offset en las mediciones de espectros de amplitudes. La quinta y sexta resistencia del último componente de tiempo en el modelo propuesto representan el comportamiento de sistema a frecuencias muy altas, lejos del rango de frecuencias objetivo de esta tesis. Estas últimas resistencias fueron propuestas con valores iguales para facilitar el procedimiento del cálculo matemático y por la baja importancia estimada de sus valores, donde a estas frecuencias altas no se busca mucho en los cambios de propiedades celulares que son de muy alto nivel de complejidad. Sus valores tienen muchas variancias y presentan valores exagerados cuando corresponden a espectros de amplitud con errores a altas frecuencias (aumento en la impedancia que no es razonable en la práctica normal, sino que es un error en el sistema de medición que se debe al funcionamiento del sistema de aislamiento).

7.2.6. Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados para representar las propiedades estadísticas en los resultados de los experimentos animales, y la significancia que representan estos datos para el objetivo de esta tesis.

En la tabla 6.4 se presentan los números de espectros o de casos distribuidos entre las diferentes clases de clasificaciones propuestas en la tabla 6.1. El número de casos en la clase 1 es mayor porque todos los experimentos tienen espectros clasificados en esta clase además de todos los espectros del grupo 1, la cual representa las mediciones de control: la clase 2 incluye casos de todos los experimentos que pertenecen a los grupos con oclusión; la clase 3 tiene datos de los últimos dos grupos, y todas las otras clases son casos únicos en todos los experimentos.

En la tabla 6.5 se presentan los valores límites para los intervalos de datos de índices de daño isquémico calculados en el algoritmo correspondiente, para los cuatro niveles de daño isquémico propuestos. Cabe mencionar que estos límites fueron seleccionados con un criterio simple propuesto de que en los 1653 espectros, de los que están presentes en la tabla anterior 6.4, se pueden tener espectros que presentan un tejido sano, otros que presentan un tejido con daño moderado reversible, un tercer grupo que pertenece a un tejido con daño profundo y un último caso donde el daño es agudo y el tejido no tiene mucha oportunidad de sobrevivir. Estos criterios nada más se justifican para realizar pruebas de caracterización de este nuevo parámetro incluido en el desarrollo de esta tesis como índice de daño isquémico. Los límites teóricos deben ser investigados y desarrollados en trabajos posteriores a esta investigación.

En la tabla 6.6 se presentan los valores límites para los intervalos de 4 niveles de pHi medidos en el tejido, para los cuatro niveles de daño isquémico propuestos simulando el número de casos de niveles de daño isquémico que están presentes en la tabla anterior 6.5. esto con el propósito de realizar una comparación entre la relación de mediciones de impedancia - niveles de isquemia (Niveles de pHi) y mediciones de impedancia - niveles de daño isquémico.

En la tabla 6.7. se pueden observar algunas de las propiedades estadísticas de los diferentes parámetros de espectroscopia de impedancia mostrando sus promedios, desviaciones estándar, máximos, mínimos y varianzas. Casi todos estos parámetros tienen alto nivel de varianza. Los parámetros de Ramp5 y Ramp6 que representan los componentes de la última constante de tiempo en el modelo propuesto para los tejidos vivos, y que son iguales, tiene valores y varianzas exageradas, lo cual corresponde a la respuesta de estimación del modelo en los espectros con errores a altas frecuencias como se había mencionado anteriormente en esta sección.

Uno de los objetivos de esta tesis es la evaluación cualitativa y cuantitativa del daño isquémico inducido en el tejido usando las mediciones de espectroscopia de impedancia. En este análisis se trata de mostrar la significancia estadística que presentan las mediciones de impedancia para caracterizar el estado del tejido bajo isquemia, así como la clasificación del estado inducido al tejido en el protocolo experimental (clase), la significancia de diferenciar los diferentes niveles de isquemia en los tejidos como niveles de pHi , y por último la representación de diferencias significativas en los niveles de daño isquémico calculados en el algoritmo correspondiente y propuesto en esta tesis. Usando el análisis multivariado MANOVA presentado en la tabla 6.8, se puede ver que todos los parámetros de espectroscopia de impedancia presentan cambios estadísticamente significativos con $p < 0.05$ para representar las clases, nada más tres parámetros no se cambian en la tabla porque son parámetros de referencia para la normalización de amplitudes o fases de los

resultados, como son la amplitud a la frecuencia de 464159Hz y la fase normalizada a la frecuencia de 464Hz; y las resistencias y reactancias calculadas a partir de los parámetros correspondientes. De este análisis se observa que los parámetros de impedancia son los que más representan los cambios en la clase, posteriormente el índice de daño isquémico y al final el pHi.

Otra forma para representar la significancia en los cambios espectrales para representar los cambios tanto de pHi como de IDI, es a través del análisis de correlación, el cual se presenta en la tabla 6.9, donde el 85% de los parámetros de espectroscopia de impedancia (190 de 223 variables) se encuentran más correlacionados con índice de daño isquémico (IDI) que con mediciones de pHi; y los 15% restantes están al contrario y se nota que el coeficiente máximo de correlación con daño isquémico es más grande que su correspondiente de pHi. Lo anterior quiere decir que la espectroscopia de impedancia en tejido representa mejor nivel de daño isquémico que nivel de isquemia.

Los parámetros de impedancia, tanto amplitudes como fases, presentan cambios estadísticamente significativos $P < 0.001$ para diferenciar el estado de los tejidos bajo isquemia de oclusión (ver las tablas 6.10 y 6.11). En la mayoría de los casos no hay diferencia estadística significativa en los espectros de amplitudes entre los datos cuando los tejidos están sanos (clase 1) y los tejidos después la reperfusión sanguínea (clases 6-10). Un tejido a dos horas de oclusión (clase 3) presenta diferencias estadísticamente significativas con todas las otras clases. Las clases con tres y cuatro horas de oclusión no son significativamente diferentes entre sí, pero son diferentes del resto de clases mencionadas en las tablas.

Se puede notar que todas las mediciones de pHi en tejidos con isquemia por más de dos horas (clases 2, 3, 4 y 5) presentan cambios significativos en tejido sano (clase 1) y en tejido con reperfusión después de una hora de oclusión (clases 6 y 7). Los cambios no son significativos en tejido con reperfusión después dos horas de oclusión (ver la tabla 6.12). En esta tabla se observa que las mediciones de pHi que representan la isquemia en el tejido se recuperan con reperfusión después de una hora de oclusión, y no se recuperan con reperfusión después dos horas de oclusión; mientras que las mediciones de espectroscopia de impedancia se recuperan en los dos casos de reperfusión después de 1 hora y de 2 horas de oclusión como se presentó anteriormente. Las clases con isquemia profunda con más de dos horas de oclusión (clases 2, 3, 4 y 5) no presentan cambios estadísticamente significativos en las mediciones de pHi, o en otras palabras, los cambios en el pHi no son sensibles a isquemia profunda porque las mediciones de pHi cuando el tejido está isquémico son constantes. La medición de la pHi sólo se cambia durante el tiempo en el que el tejido está cambiando de sano a isquémico o al contrario.

En los resultados presentes en la sección 6.7 también se puede notar lo mismo que se mencionó anteriormente; los cambios en los parámetros de espectroscopia de impedancia corresponden a los cambios de pHi durante el tiempo de cambio en el tejido de sano a isquémico, y luego que el tejido llega a ser isquémico, casi no hay cambio en el pHi mientras que los parámetros de impedancia varían mucho. Además en estas gráficas se observa la relación entre mediciones de pHi y de espectroscopia de impedancia con un polinomio de quinto orden, relación de muy poca correlación.

Una comparación de mediciones de espectroscopia de impedancia con el índice de daño isquémico calculado desde los datos del pHi medidos en el tejido y presentados anteriormente, presenta muy buena correlación lineal y de primer orden. Ejemplos de estos resultados se presentan en la sección 6.8. Esto quiere decir que las mediciones de espectroscopia de impedancia son mejores para representar daño isquémico.

7.2.7. Resultados de los Análisis de repetibilidad y estimaciones de generalización (Redes neuronales): estimando NpHi, IDI y Clase de cada espectro.

El desarrollo de las redes neuronales artificiales para la estimación del Nivel de Daño Isquémico "IDI", el Nivel de pHi "NpHi" y la clase de clasificación propuesta en el modelo animal durante la isquemia (ver tabla 6.1) requieren mediciones confiables de impedancia tisular y sus correspondientes parámetros medidos en tejido, adquiridos de manera semejante; los cuales no tienen mediciones erróneas ni comportamientos inexplicables con la isquemia. A partir de todos los datos obtenidos, se eligieron 13 experimentos que contienen mediciones con isquemia para el entrenamiento y la prueba de las redes neuronales artificiales. Los datos obtenidos durante las etapas de reperfusión no siempre fueron usados para este propósito porque varían los tiempos de recuperación en los parámetros de impedancia y los parámetros estimados correspondientes; donde los patrones de la impedancia y pHi son muy diferentes durante la reperfusión.

Las redes neuronales fueron desarrolladas con el objetivo de calcular los niveles de generalización en la estimación de los parámetros de Clase, NpHi, y NDI; usando 12 parámetros seleccionados de cada espectro de impedancia en las entradas. Estos parámetros de entradas se escogieron de los parámetros de impedancia con varianzas significativamente grandes y altos coeficientes de correlación con los tres parámetros estimados. Sin embargo, en la selección de estos parámetros se trata de evitar de escoger parámetros que tenían datos redundantes, aunque se cumplen los dos criterios anteriores.

En la tabla 6.13, los datos de entrada son los que pertenecen a todos los resultados de los experimentos incluidos sin los datos con reperfusión. Se nota que con los datos de entrenamiento todas las redes aprenden casi al mismo nivel, pero aplicando los datos de prueba se ve que en los casos de la estimación de Clase y nivel de daño isquémico, NDI, resulta un nivel aceptable de generalización, 90% y 88% y en el caso del pHi, la salida tiene un nivel muy bajo. Lo anterior se debe a que los datos en esta prueba contienen todos los espectros del grupo 1 y la mayoría de los del grupo 2 y 3, además de todos los datos del grupo 4, y como se describe en los resultados mostrados en esta tesis, en todos los experimentos los animales sufren isquemia o baja en el pHi, y las mediciones de espectros de impedancia corresponden a cambios en las mediciones de pHi nada más en el tiempo de cambio de isquémico a sano, o al revés, de sano a isquémico; y todo este cambio en pHi corresponde a rangos muy pequeños de los cambios totales en las mediciones de impedancia correspondientes (ver figuras 6.23-6.25). A diferencia de que las mediciones del nivel de daño isquémico tienen relaciones lineales y corresponden con todos los rangos de mediciones de impedancia.

En el análisis anterior fue utilizada la red tipo cuantificación de vector de aprendizaje, LVQ, porque las redes de retropropagación no llegan a tener alto nivel de aprendizaje (un mínimo global) por la varianza muy alta en los datos de entrenamiento, y la diferencia es muy grande en el número de casos en cada grupo para estimación. Lo anterior hace que la varianza en los datos que corresponden al grupo con más número de casos presentes (tejido clasificado como sano) contaminen mucho las pocas mediciones que corresponden a los otros casos.

Para evitar este problema, se tratan de estimar los mismos parámetros anteriores usando las mismas variables de espectros de impedancia en las entradas, incluyendo nada más los resultados del último grupo experimental de isquemia total (grupo 4), y

que incluye todos los casos anteriores. Los resultados del entrenamiento están presentados en la tabla 6.14, incluyendo comparaciones en el funcionamiento de los dos tipos de redes, de retropropagación y de cuantificación de vector de aprendizaje. Una observación importante es que la generalización en la estimación de pHi es más alta que en los otros dos casos de comparación, además de que los niveles de generalización son más de 90% en todos los casos y son aceptables. Las redes de LVQ tienen mejores niveles de estimación que las redes de retropropagación.

Se puede estimar el nivel de daño isquémico en 85% de confianza, incluyendo todos los espectros medidos en todos los experimentos realizados en esta tesis; resultados presentados en la tabla 6.15. La red utilizada es de cuantificación de vector de aprendizaje (LVQ).

Cabe mencionar que la selección de cuatro niveles de pHi en las discusiones anteriores no fue basada en criterios científicos sino sobre una lógica práctica para simular los casos en la división de los niveles de daños isquémico en cuatro grupos para realizar la comparación correspondiente mostrada anteriormente. En la práctica actual y en la literatura se reconocen dos niveles de pHi donde se clasifica el tejido sano o el isquémico, y en algunos casos existe un nivel intermedio de cambio de sano a isquémico. Aplicando lo anterior se dividieron las mediciones de pHi en dos niveles, $pHi > 7.15$ representa tejido sano y $pHi \leq 7.15$ tejido isquémico. Se entrenaron dos redes neuronales con los datos de entrenamiento incluyendo los mismos casos de la primera comparación excepto los que corresponden a la reperfusión, los resultados están mostrados en la tabla 6.16, en la primera renglón. Se ve una mejor clasificación en esta prueba: 1) con la red tipo retropropagación se tiene un resultado del 77% que es una generalización baja, pero mejor que en la tabla 6.13; 2) con una red tipo LVQ el resultado es aceptable y es de 86%. Las mismas redes se utilizaron para realizar las mismas pruebas pero con datos de los experimentos del grupo experimental 4 "isquemia total y sin reperfusión", los resultados mostrados son de muy buena clasificación, y se nota que la generalización en la red de retropropagación mejor que la de LVQ " tabla 6.16, la segunda renglón".

Esto significa que también, usando las mediciones de espectroscopia de impedancia en tejido intestinal se puede estimar la isquemia o nivel de pHi, al igual que estimar el nivel de daño isquémico del tejido. Además de estimar la clase que presenta el estado de los tejidos bajo isquemia inducida en el protocolo animal realizado en esta tesis.

Falta mencionar que durante el tiempo de realización de este estudio in vivo para la caracterización de la segunda generación de este prototipo, una última versión del instrumento (la tercera generación) fue realizada. En esta generación se resolvió el problema del aislamiento del sistema, además de la mejora en la respuesta de frecuencia del prototipo. Los controles de las corrientes y las amplitudes de las señales de salida en el prototipo están en control computarizado y totalmente por el ambiente de software. En esta versión del prototipo se trata de tener características de instrumentación bajo normas de control internacional, y se va a presentar como la versión para las aplicaciones humanas de este prototipo. La caracterización de este último instrumento in vivo se llevará a cabo en próximas investigaciones como continuación de la presente tesis.

Capítulo 8

8. Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, arroja las siguientes conclusiones:

- El espectrómetro de impedancia desarrollado permite calcular los componentes de impedancia compleja, calcula los componentes de amplitud y fase empleando un método de puente de demodulación síncrona [44].
- El método matemático desarrollado para calcular los componentes de impedancia compleja es original. Además, a partir de los resultados en el laboratorio se concluye que el método es capaz de calcular los cambios en la impedancia de un tejido y los niveles del daño isquémico relacionados con cambios en la impedancia.
- El método desarrollado podrá simplificar mucho la técnica de espectroscopía de impedancia y permitirá usar frecuencias muy altas con la ventaja de procesar los datos de interés a frecuencias bajas y con instrumentación de precisión y bajo costo.
- Durante el desarrollo de esta tesis, tres generaciones de espectros de impedancia fueron desarrolladas y construidas. Las dos primeras generaciones cumplieron los requerimientos de instrumentación establecidos en los capítulos 1 y 2 de esta tesis. Cada instrumento fue evaluado a través de pruebas y estudios animales [44, 48, estudio piloto de esta tesis]. Estas evaluaciones fueron usadas para establecer requerimientos cuantitativos para la optimización del instrumento.
- El manejo del espectrómetro de impedancia se realiza por medio de un sistema de software, así como para el despliegue y análisis de los datos monitoreados. La primer generación del instrumento opera bajo el ambiente MS-DOS, fue programado en lenguaje C y el análisis de los datos se realiza en el ambiente de Microsoft Windows y usando el lenguaje de programación MATLAB. La segunda generación emplea un programa de control en el ambiente Microsoft Windows, el lenguaje de programación es Visual Basic y el análisis se realiza en MATLAB. La tercera generación será totalmente controlada y operada en el ambiente Microsoft Windows y programado en Visual Basic.
- Se propuso un modelo matemático de la impedancia del tejido que elimina el ruido y los errores sistemáticos en los datos medidos de impedancia. También, los parámetros extraídos del modelo fueron utilizados para la caracterización del tejido. Este modelo aproxima correctamente la impedancia del tejido a casi todo el rango de frecuencias, cumpliendo uno de los objetivos específicos de esta tesis.
- Se ha definido un conjunto de parámetros para la impedancia que describen las propiedades eléctricas del tejido y son sensibles a isquemia y daño isquémico. Todos estos parámetros tienen características diferentes y están influidos por el daño isquémico en diferentes maneras, se han definido parámetros que producen buenos resultados, pero no se puede asegurarse que este conjunto de parámetros es el óptimo. Sin embargo, un conjunto de parámetros óptimo puede ser determinado solamente basando en un análisis teórico del modelo y las características detalladas del tejido isquémico.
- El algoritmo para el cálculo del índice de daño isquémico desarrollado en esta tesis es original y proporciona información muy útil para la caracterización del

daño en un tejido isquémico atendiendo a los cambios estructurales y fisiológicos de los tejidos bajo estudio.

- La relación lineal entre los cambios en el índice de daño isquémico calculado en este algoritmo y los espectros de impedancias facilitan la tarea de estimar uno de las dos variables desde el otro usando un sistema simple para realizar esta tarea, así se puede estimar fácilmente el nivel de daño desde los espectros de impedancia.
- Una serie de estudios en vivo en un modelo animal fue realizado para obtener espectros de impedancia y sus correspondientes datos de pHi en tejido bajo diferentes niveles de isquemia, estos datos fueron necesarios para establecer una relación cualitativa y cuantitativa dentro la impedancia del tejido y la isquemia. también, estos experimentos proveen suficientes espectros de impedancia y datos de pHi medidos en tejidos intestinales sanos (con perfusión sanguínea normal), con tejido intestinal isquémico y tejido intestinal con reperfusión sanguínea (después de isquemia), comparando los datos de tejidos sanos, isquémicos e isquémicos con reperfusión, se evalúa y prueba el comportamiento de espectros de impedancia.

En el primer capítulo (1.3. Hipótesis y aproximación a la investigación), cinco hipótesis fueron planteadas y describen las ideas fundamentales de esta investigación.

- la primera hipótesis central fue que las mediciones de espectroscopía de impedancia compleja del tejido pueden proveer datos que en su estructura reflejan información sobre la isquemia y el nivel de daño isquémico en el tejido y que pueden ser afectados por algunas variables que influyen en los valores de impedancia medida en el tejido.

En el desarrollo del protocolo experimental en esta tesis, fue inducida isquemia al tejido durante el tiempo y se pretende que éste modelo desarrolla cambios estructurales y fisiológicos en el tejido de acuerdo a lo reportado en la literatura. Estos cambios en el tiempo se clasificaron por periodos de tiempo de 1 hora usando el parámetro CLASE. Observando los resultados de espectros de impedancia medidos en este tejido se nota que sus cambios son claramente correspondientes a los cambios esperados de la inducción de isquemia. Un análisis de varianza mostró que los cambios en los parámetros de impedancia se ven afectados por la clase a la que corresponden con un nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

- La segunda hipótesis central sostiene que es posible desarrollar un algoritmo que emplee los datos complejos del espectro de impedancia del tejido para estimar cualitativa y cuantitativamente los niveles absolutos de daño isquémico en el tejido.

La evaluación mostrada en los resultados de esta tesis muestra que las mediciones de espectros de impedancia tisular están correlacionadas con los cambios en el nivel de isquemia medido en los mismos tejidos (pHi). Además el nivel de pHi permitió estimar un índice de daño isquémico a través de un algoritmo propuesto, este índice permite inferir un nivel de daño en el tejido debido a isquemia, las variaciones de este nivel de daño

isquémico presentan una mejor correlación con los datos de impedancia que los niveles de isquemia medidos directamente del pHi.

- La tercera hipótesis fue que se puede desarrollar un modelo matemático y eléctrico del tejido que aproxime apropiadamente las mediciones de impedancia en tejido vivo a diferentes niveles de isquemia y daño isquémico.

El modelo eléctrico de impedancia aproxima la impedancia del tejido en todo el rango de frecuencias, como resultado de un análisis de correlación, se encontró que los parámetros estimados en el modelo eléctrico y los parámetros medidos en vivo tienen una alta correlación lineal. También, el modelo propuesto resuelve el problema de modelar el tejido vivo a un rango limitado de frecuencias y es el primer modelo que expande la modelación de los tejidos a cualquier rango de frecuencias deseado.

- La cuarta hipótesis fue que se puede identificar un conjunto de parámetros espectrales que tiene una alta sensibilidad a variaciones de factores fisiológicos influidos por la isquemia.

Hay muchos parámetros de impedancia que pueden ser extraídos desde los espectros de impedancia medidos en el tejido. La mayoría de estos parámetros son de alguna manera sensibles a la isquemia y el daño isquémico, muchos de estos parámetros tienen información redundante, sin embargo, se ha seleccionado un conjunto de parámetros específicos de impedancia muy sensibles a daño isquémico tisular, estos parámetros fueron suficientes para determinar diferentes niveles de daño isquémico en función de la impedancia del tejido.

- La quinta hipótesis fue que las redes neuronales artificiales pueden ser usadas para establecer una correlación cuantitativa entre los niveles de isquemia (pHi) o los niveles de daño isquémico calculados desde las mediciones de pHi con los parámetros de impedancia.

Se desarrollaron diferentes redes neuronales basadas en algoritmos para la estimación de niveles de daño isquémico y niveles de isquemia usando los parámetros de impedancia como entradas a estos algoritmos. El rendimiento de estos algoritmos fue satisfactorio en las pruebas realizadas, los errores de estimaciones estuvieron en los rangos aceptables.

Las redes neuronales por cuantificación del vector de aprendizaje (LVQ), son mejores para esta aplicación que las redes de retropropagación.

Capítulo 9

9. Trabajos Futuros

La presente investigación ha permitido observar algunas líneas de investigación orientadas al desarrollo de un instrumento para la estimación del daño isquémico del tejido con aplicaciones terapéuticas. En este sentido se debe continuar en la siguientes direcciones:

- Investigaciones adicionales para mejorar el método de calculo y estimación de los niveles de daño isquémico.
- El desarrollo de un instrumento clínico para la estimación del daño isquémico, lo cual incluye estudios humanos.
- Desarrollar un protocolo que utiliza las mediciones de impedancia para guiar la terapia en un modelo de choque y falla de órganos múltiples.
- Desarrollar un sistema de monitoreo continuo de isquemia y daño isquémico en los tejidos más eficaz y no invasivo.

Todas estas investigaciones propuestas deben estar realizadas en paralelo, y pueden ser divididos en las siguientes etapas:

Mediciones de referencias para los niveles de isquemia y daño isquémico: una de las limitantes de esta investigación es la incapacidad para la determinación objetiva de los niveles de isquemia y daño isquémico durante los experimentos. En esta investigación se tomaron las mediciones de pH_i como valores de referencia para estimar los niveles de daño isquémico, sin embargo esta técnica puede ser complementada con algunas técnicas alternativas, por ejemplo mediciones en los cambios estructurales del tejido (ESTUDIOS HISTOLÓGICOS O DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)...etc.

Estudio en humanos: un de los objetivos de esta investigación es el desarrollo del instrumento para la aplicación clínica. Por esta razón, es necesario realizar un estudio para determinar los electrodos óptimos para las mediciones de impedancia en el estomago, que es donde se realizan mediciones no invasivas más fácilmente que en los intestinos.

Sistema de mediciones de impedancia sin contacto: una vez que el instrumento clínico esta desarrollado, la segunda etapa en esta investigación será el desarrollo de un sistema de mediciones de la impedancia tisular sin contacto con el tejido. Un sistema que produce imágenes en 3 dimensiones en función de la distribución de impedancia en el sistema gastrointestinal. Este tendrá el potencial de producir mejor información sobre el daño isquémico en los tejidos. Al mismo tiempo el sistema debe ser más fácil para el uso con los pacientes.

Falta mencionar que en la práctica se están desarrollando en paralelo con esta tesis dos estudios para la aplicación de las mediciones de espectros de impedancia para guiar la terapia en un modelo de choque séptico inducido. La otra investigación es el estudio de los cambios de impedancia en los pacientes en las salas de terapia intensiva después de una cirugía mayor, pretende estudiar todos los parámetros relacionados con esta aplicación para la estimación del mejor protocolo de resucitamiento del paciente en estado critico.

Referencias:

- [1] Ristic B., "Development of a System for Tissue Ischemia Monitoring and Measurement using Impedance Spectroscopy", Thesis of Degree of Doctor of Philosophy in Biomedical Engineering, Worcester Polytechnic Institute library, September, 1997.
- [2] Fiddian-Green R G.; "Role of the gut in shock and resuscitation", Bailliere's Clinical Anesthesiology, Vol.5, No.1, June 1991.
- [3] Marston A "Footnote: Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure", Marston, Bulkey, Fiddian-Green, Haglund editors, the C.V Mosby Co., St. Louis, 1989.
- [4] Marston, Bulkey, Fiddian-Green, Haglund editors, "Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure", the C.V. Mosby Co., st. Louis, 1989.
- [5] Fiddian-Green RG, "Tonometry: Theory and Applications", Intensive Care World, 1992.
- [6] Gutierrez G, and Steven D. Brown, "Gastric Tonometry: A New Monitoring Modality in The Intensive Care Unit", J Intensive care Med 1995, 10: 34-44.
- [7] S Kun and Peura, "Tissue ischemia detection using impedance spectroscopy", Proceedings, IEEE/EMBS 16th Annual International Conference, PP. 868-9, Baltimore, 1994.
- [8] Ackman and MA. Seitz, "Methods of complex impedance measurements in biologic tissue", Crit. Rev. Biomed Eng, vol. 11.pp 281-311, 1984.
- [9] R. Pallas-Areny and J.G. Webster. "Bioelectric impedance measurements using synchronous sampling." IEEE Trans. on Biomed. Eng. vol. 40, No 8, pp. 824-829, August 1993.
- [10] Sacristán E, "Development of a flexible PCO₂ sensor for the determination of intermucosal pH (pHi) in the Gastro-Intestinal Tract", Thesis of Master of science, Worcester Polytechnic Institute, 1990.
- [11] Grum CM, Fiddian-Green R.G., Pittenger GI et al (1984), "Adequacy of Tissue Oxigenation in intact dog intestine". Journal of Applied Physiology, 56: 1065-1069.
- [12] Fink MP, Fiddian-Green RG, "Caer of the gut in the critically ill", Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure, Marston, Bulkly, Fiddian-Green, Haglund editores, The C.v., Mosby Co., st. louis, 1989.
- [13] Antonson J.B., Boyle CC, Kruihoff K.L, Wang H, Sacristan E., Rothschild HR, Fink MP, "Validation of tonometric Measurement of gut of Intramucosal pH during Endotoxemia and Mesenteric Occlusion in pigs". Am J. Physilogy 259 (Gastroinest, Liver Physiol. 22): G 519- G523, 1990.
- [14] Haglund U, Bulkley GB, Granger DN, " On the Patathophysiology of Intestinal Ischemic Injury", actapchir. Scand. 153: 321- 324, 1987.
- [15] Fink MP, Antonsson JB, Wangtl, Rothschild HR (1991) "Etiology of Increased Intestinal Permeabilidad in endotoxin pigs: limited role for mesenteric hypoperfusion Archives of surgery" 126: 211- 218.
- [16] Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR & McCord JM(1982) "Ischemic Injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals." Gastroenterology 82: 31- 36.

- [17] Hugland U, Montgomery A & Borgstrom A(1990) "Intraluminal Pancreatic proteases and Intestinal Mucosal Injury During Ischemia and Reperfusion" . Circulatory Shock 31- 36.
- [18] Dunn R.M., " Plastic surgery Education Fundation: Essay", Plastic Surgery Education Fundation, chicago, IL, 1990.
- [19] Jones B.M., "Monitors for the cutaneous Microcirculation"Plastic & Reconstructive Surgery, Vol. 73, No .5, pp. 843-850, 1984.
- [20] Concannon M.J., Stewart D.H., Welsh C.F. and Puckett C.L., "Impedance Plethysmography: A New Method for Continuos Muscle Perfusion Monitoring", Plastic & Reconstructive Surgery, Vol. 88, No .2, PP. 292-298, 1991.
- [21] Harrison D.h. and Mott G., "Impedance Monitoring for Subcutaneous Free Flap Transfer", British Jornal of Plastic Surgery, Vol. 42, PP. 318-324, 1989.
- [22] Macdonald J.D, "Impedance spectroscopy" – Annals of Biomedical Engineering, Vol. 20, pp. 289-305, 1992.
- [23] Gielen F.L.H., Wallinga-de Jonge W. and Boon K.L., "Electrical Conductivity of Skeletal Muscle Tissue: Experimental Results from Different Muscles in vivo", Medical and Biological Engineering and Computing, Vol. 18, PP. 569-577, 1984.
- [24] Gerth W.A. and Watke C.M., "Electrical impedance spectroscopic Monitoring of Body o Compartmental Volumen Changes" Journal of Clinical Engineering, Vol. 18, PP. 253-260, 1993.
- [25] Cole K.S. and Cole R.H., " Dispersion and Absorption in Dielectrics', Journal of chemical Physics, Vol. 9, PP. 341- 351. 1941.
- [26] Kun S. R. Peura R.A., " Selection of measurement frequencies for optimal extraction of tissue impedance model parameters", Worcester Polytechnic Institute, , Biomedical Engineering Department, 100 Institute Road, Worcester, MaA 01606, USA.
- [27] Kun. S., " Tissue Perfusion\ Ischemia Monitoring using Impedance Spectroscopy", the Whitaker Foundation grant, 1994.
- [28] Kleber A.G., Ricgger C.B. and Janse M.J., "Electrical Uncoupling and Increase of Extracellular Resistance after Induction of Ischemia in Isolated, Arterially Muscle", Circulation Research, Vol. 63, PP. 923- 929, 1980.
- [29] Kun S, Peura RA, Ristic B. "Impedance spectroscopy system for ischemia monitoring and detection", US Patent No. 5807272, Sept. 1998.
- [30] Gersing E "Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs", Bioelectrochemistry and bioenergetics 45 (1998): 145-149
- [31] Schäfer M, Schlegel C, Kirlum HJ, Gersing E, Gebhard MM, "Monitoring of damage to scheletal muscle tisúes caused by ischemia", Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45 (1998): 151-155
- [32] Schwan HP., "Electrical properties of Tissue and Cell Suspension", Adv. Biol. Med. Phys., Vol. 5, pp. 147-209, 1957.
- [33] Hyde PJ, "Wide frequency range dielectric spectrometer", Proc.IEEE, 17(9): 1891-1901,1970.
- [34] Bottman JS, "Pulse-based impedance measurement Instrument", US Patent No. 5633801, Oct. 1995.

- [35] Dzwonczyk RR, Liu A, Hartzler AW, "Method for measuring the myocardial impedance spectrum", US patent 5,454,377, Oct.3, 1995.
- [36] Rigaud B, Hamzaoui L, Frikha MR, Chaveau N, Scotto di Rinaldi JP, Morruci JP, "Tissue characterization by impedance: A Multifrequency approach", *Physiol. Meas.* 15(2A), A-13-A20,1994.
- [37] Bao J., Davis C.C. and Schmuker R.E., "Impedance Spectroscopy of human Erythrocytes: System Calibration and Nnlinear Modeling". *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, Vol. 40, pp. 364-378, 1993.
- [38] John R. Bourne, "Critical Reivews™ in Biomedical Engineering". Begell House, Inc. Vol 24, Issues 4-6, 1996.
- [39] Stremler FG., "Introducción a los Sistemas de Comunicación", University of Wisconsin Madison, Addison-Wesly Publishing, E.U.A, PP. 219-371, 1993.
- [40] Taubo H, Donald L.Schilling. "principles of comunication systems". *Amplitud – Modulation systems*, McGraw-Hill, 1986.
- [41] Roberto F. Coughlin, Frederick F. Driscoll, "Amplificadores Operacionales y Circuitos Integrados Lineales". Prentice-Hall, 1993.
- [42] Aljama C.T., Cadena M.M., Charleston V.S., Yañez S.O., "Procesamiento Digital de Señales", Universidad Autónoma Metropolitana, 1992.
- [43] Oppenheim A V., " Digital signal processing", Prentice Hall, 1975.
- [44] Othman S, "Espectrómetro de impedancia para monitoreo de daño isquémico tisular", M.S. thesis in Biomedical Engineering, UAM- Iztapalapa, México D.F., México, 1999.
- [45] Marple SL, *Digital spectral analysis with applications*, Prentice-Hall Signal Processing Series, Englewood Cliffs, NJ: 303-349
- [46] Bragós R, Blanes P, Riu PJ, Rosell J, "Comparison of currrent measurement structures in voltaje-driven tomographic systems", *Proceedings IEE Colloquium on innovations in instrumentation for electrical tomography*, London, Digest No. 1995/099, IEE 1995:8/1-8/3.
- [47] Kanai, H., Haeno, M., and Sakamoto, K., *Electrical measurement of fluid distribution in legs and arms*, *Med. Prog. Technol.*, 12, 159-170,1984.
- [48] González C A, "Evaluación de un sistema de Espectroscopia de impedancia para monitoreo de daño isquémico en la mucosa intestinal", M.S. tesis en ingeniería Biomédica, UAM- Iztapalapa, México D.F., México, 2000.
- [49] Hoshino T, Maley W R, BulKley G B, Williams G M. *Ablation of free-radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heart-beating donors: a quantitative evaluation of the proportion of injury due to reperfusion following periods of warm, cold, and combined warm and cold ischemia*. *Transplantation* 1988:284-289.
- [50] Bishop C:M:, "Neural Networks and Their Applications", review *Sci. Instrum*, Vol. 65, pp. 1803-1832, 1994.
- [51] Jones, William P., Hoskins, Josiah, "Back-Propagation, A Generalization Delta Learning Rule". *BYTE Magazine*, Oct.1987.
- [52] Kohonen, T. "Statistical Pattern Recognition with Neural Networks: Benchmark Studies". *Proceedings of the Second annual IEEE International conference on Neural Networks*. Vol. 1, 1988.

- [53] Sacristan E, "impedance Spectroscopy System for Ischemic Mucosal Damage Monitoring in Hollow viscous Organs", July 19, 2000. US Utility Patent Application No. 09/907,781, Oficina Europea de Patentes EP01116731.9, Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual No.2001/007336.

11. Anexos

11.1. Anexo I, Los programas en el lenguaje MATLAB, para la estimación del modelo.

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% simulasuj2.m para estimar espectros para todos los sujetos %
%% de interés y guardar los datos de entrinamento %
%% en los mismos archivos simulas.' '. %
%% un solo archivos sujfitxx originales %
%% usando sujeteparasimul1.m %
%% Salah Othman reportado 13/12/01 %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
NoRs=5;
NoCs=4;
NoVariablesMudelo=NoRs+NoCs;
load simulas;
sujSimulado=simulas;
[M,N]=size(sujSimulado);
frec=sujSimulado(1,6:30);
load indisimula;
I=indisimula;
clear indisimula;
for i=I:M;
    i
    amplitud=(sujSimulado(i,6:30)); % Amplitudes
    fase=sujSimulado(i,32:56); % fases
    espectrovivo=[frec;amplitud;fase];
    n=sujSimulado(i,1); % numero del sujeto
    mainalg5;

ResultadosDelEntrenamiento=[nuevo,Nomudelo,eta,Errorminimo,NoIteracionMaxi
ma,...
    RsOptima',Cs',cicloOptimo,ErrorQuaOptima,comentario];
sujSimulado(i,57:N)=ResultadosDelEntrenamiento;
save -ascii indisimula i;
save -ascii simulas sujSimulado;
save -ascii simulaprocesado sujSimulado;
%espeFun=fun_esp9(RsOptima,Cs);
%[ciclo/epoca,cicloOptimo/epoca,ErrorQua,ErrorQuaOptima]
%plotsimul1(n,i,espeFun,espectrovivo);
end
```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Algoritmo prencipal5 (mainalg5;)          Salah Othman 18/11/01%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%close all;
%nuevo=0;
nuevo=sujSimulado(i,57); % este espectro si había sido procesado
NoDeVariables=5;
epoca=1000; % # numero de iteraciones en cada epoca
if nuevo==1 % No es nuevo
    Rs=sujSimulado(i,62:66)';
    Cs=sujSimulado(i,67:70)';
else
    [Rs,Cs]=iniciars1(amplitud,NoDeVariables);
end

Nomodelo=9;
espeFun=fun_esp9(Rs,Cs);% Espectro estimado al modelo 9
ErrorQua=errorqual(espeFun,espectrovivo)%evaluar la estimación( erro )
%figure,subplot(211),semilogx(frec,[espeFun(2,:);amplitud]);subplot(212),
semilogx(frec,[espeFun(3,:);fase]);
RsOptima=Rs;
ErrorQuaOptima=ErrorQua;
ciclo=sujSimulado(i,71);
cicloOptimo=ciclo;
eta=0.001; % Tasa de convengencia
Errorminimo=0.01;
NoIteracionMaxima=5e4;
comentario=0;
iteracionInicial=1;
while (ciclo<1000)&(nuevo~=1) % evitando error local
    gradienteRx=gradientel(Rs,Cs,espeFun,espectrovivo);
    Rs=Rs-eta.*real(gradienteRx).*Rs;
    espeFun=fun_esp9(Rs,Cs);
    ErrorQua=errorqual(espeFun,espectrovivo);
    ciclo=ciclo+1;
end

if ErrorQuaOptima>ErrorQua
    ErrorQuaOptima=ErrorQua;
    RsOptima=Rs;
    cicloOptimo=ciclo;
    nuevo=1;
end

while (ErrorQua>Errorminimo)&(ciclo<NoIteracionMaxima)
    gradienteRx=gradientel(Rs,Cs,espeFun,espectrovivo);
    Rs=Rs-eta.*real(gradienteRx).*Rs;
    espeFun=fun_esp9(Rs,Cs);
    ErrorQua=errorqual(espeFun,espectrovivo);
    if ErrorQuaOptima>ErrorQua
        ErrorQuaOptima=ErrorQua;
        RsOptima=Rs;
        cicloOptimo=ciclo+1000;
        nuevo=1;
    end
end

```

```

    %if (rem(ciclo,epoca)==0)
    %   espeFun=fun_esp9(Rs,Cs);
    %
parametros=[i,ciclo/epoca,cicloOptimo/epoca,ErrorQua,ErrorQuaOptima]
    %   save -ascii parametros parametros;
    %   plotsimula1(n,i,espeFun,espectrovivo);
    %
ResultadosDelEntrenamiento=[nuevo,Nomodelo,eta,Errorminimo,NoIteracionMaxi
ma,...
    %       Rsoptima',Cs',cicloOptimo,ErrorQuaOptima,comentario];
    %   sujSimulado(i,57:N)=ResultadosDelEntrenamiento;
    %   save -ascii indisimula i;
    %   save -ascii simulas sujSimulado;
    %end
    ciclo=ciclo+1;
end

if (ErrorQuaOptima<=Errorminimo)&(cicloOptimo<NoIteracionMaxima)
    comentario=1;
elseif (ciclo>=NoIteracionMaxima)
    comentario=2;
end
end

```

```

%[frecFun; ampFun; faseFun]=fun_esp9(Rs,Cs);
function espeFun=fun_esp9(Rs,Cs);

%R1=Rs(1);R2=Rs(2);R3=Rs(3);R4=Rs(4);R5=Rs(5);C1=3.3e-6;C2=1e-6;C3=0.1e-
6;C4=0.01e-6;
[Mr,Nr]=size(Rs);
[Mc,Nc]=size(Cs);
for i = 1:Mr
    eval(['R' num2str(i) ' = Rs(i,1);']);
end;
for i = 1:Mc
    eval(['C' num2str(i) ' = Cs(i,1);']);
end;

for i=1:25;f(i)= frecdoc(i);end; % Asegnar las frecuencias
z=zeros(size(f));
for i=1:1:length(f)

z(i)=R1/(1+j*f(i)*2*pi*R1*C1)+R2/(1+j*f(i)*2*pi*R2*C2)+R3/(1+j*f(i)*2*pi*
R3*C3)+( R4+2*pi*j*R4*R5*C4*f(i))/(1+j*2*pi*(R4+R5)*C4*f(i));
end;
ampFun=abs(z);faseFun=angle(z).*(180/pi);frecFun=f;
espeFun=[frecFun; ampFun; faseFun];
%figure,
%subplot(211),semilogx(f, ampFun);subplot(212),semilogx(f, faseFun);

```

```
function ErrorQua=errorqual(espeFun,espectrovivo);
% para calcular el error cuadratico medio de los espectros de amplitudes
ampFun=espeFun(2,:);
%faseFun=espeFun(3,:);
ampVivo=espectrovivo(2,:);
%faseVivo=espectrovivo(3,:);
N=length(ampVivo);
%ErrorQua=(1/N)*(sum((ampFun-ampVivo).^ 2)^0.5);
ErrorQua=(1/N)*(sum(ampFun-ampVivo).^ 2);
```

```

function gradienteRx=gradiente1(Rs,Cs,espeFun,espectrovivo);

% para calcular el gradiente.
ampFun=espeFun(2,:);
ampVivo=espectrovivo(2,:);
N=length(ampVivo);
[Mr,Nr]=size(Rs);
[Mc,Nc]=size(Cs);
for i = 1:Mr
    eval(['R' num2str(i) ' = Rs(i,1);']);
end;
for i = 1:Mc
    eval(['C' num2str(i) ' = Cs(i,1);']);
end;

f=espectrovivo(1,:);
% z=zeros(size(f));
% for i=1:1:length(f)
%
z(i)=R1/(1+j*f(i)*2*pi*R1*C1)+R2/(1+j*f(i)*2*pi*R2*C2)+R3/(1+j*f(i)*2*pi*
R3*C3)+( R4+2*pi*j*R4*R5*C4*f(i))/(1+j*2*pi*(R4+R5)*C4*f(i));
% end;
gradR1=(2/N).*(sum((1./(1+j*f*2*pi*R1*C1).^ 2).*(ampFun-ampVivo)));
gradR2=(2/N).*(sum((1./(1+j*f*2*pi*R2*C2).^ 2).*(ampFun-ampVivo)));
gradR3=(2/N).*(sum((1./(1+j*f*2*pi*R3*C3).^ 2).*(ampFun-ampVivo)));
gradR4=(2/N).*(sum(((1+(4*pi*j*R4*C4*f)+(2.*((2*pi*j*R4*C4*f).^
2)))/(1+j*f*4*pi*R4*C4).^ 2)).*(ampFun-ampVivo)));
gradR5=gradR4;
gradienteRx=[gradR1;gradR2;gradR3;gradR4;gradR5];

```

11.2. Anexo II

HOJA DE REGISTRO EXPERIMENTAL- ESTUDIO ESPECTRAL IN VIVO

Animal: _____ Fecha: _____

Grupo: _____ Peso: _____ No. de ref. de archivo: _____

Hora de Inicio: _____

Anestesia y ventilación: _____

Comentarios cirugía: _____

Hora de fin de cirugía: _____

Hora de oclusión arterial (t)= _____

Tabla de muestreo

| t (min) | -60 | -30 | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 |
|-----------|-----|-----|---|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pa Sist. | | | | | | | | | | | |
| Pa Diast. | | | | | | | | | | | |
| FC | | | | | | | | | | | |
| FR | | | | | | | | | | | |
| EtCO2 | | | | | | | | | | | |
| Temp | | | | | | | | | | | |
| G.C.1 | | | | | | | | | | | |
| G.C.2 | | | | | | | | | | | |
| G.C.3 | | | | | | | | | | | |
| pHa | | | | | | | | | | | |
| PaCO2 | | | | | | | | | | | |
| PaO2 | | | | | | | | | | | |
| PtCO2 | | | | | | | | | | | |
| pHi | | | | | | | | | | | |
| Flujo AMS | | | | | | | | | | | |
| HCO3 | | | | | | | | | | | |
| SPO2 | | | | | | | | | | | |
| N2O | | | | | | | | | | | |
| O2 | | | | | | | | | | | |
| Halotano | | | | | | | | | | | |
| Volumen V | | | | | | | | | | | |

Hora de eutanasia: _____

Comentarios adicionales: _____

11.3. Anexo III

PROGRAMA DE CIRUGÍAS PARA REALIZAR EN EL PROTOCOLO ANIMAL

Grupos:

1. Control
2. 1 Hr. De Isquemia y Reperusión
3. 2 Hrs. De Isquemia y Reperusión
4. Isquemia total sin Reperusión

Sondas: (Falta mejor explicación de las dos sondas)

- A- Electrodo Pequeños
- B- Electrodo Grandes

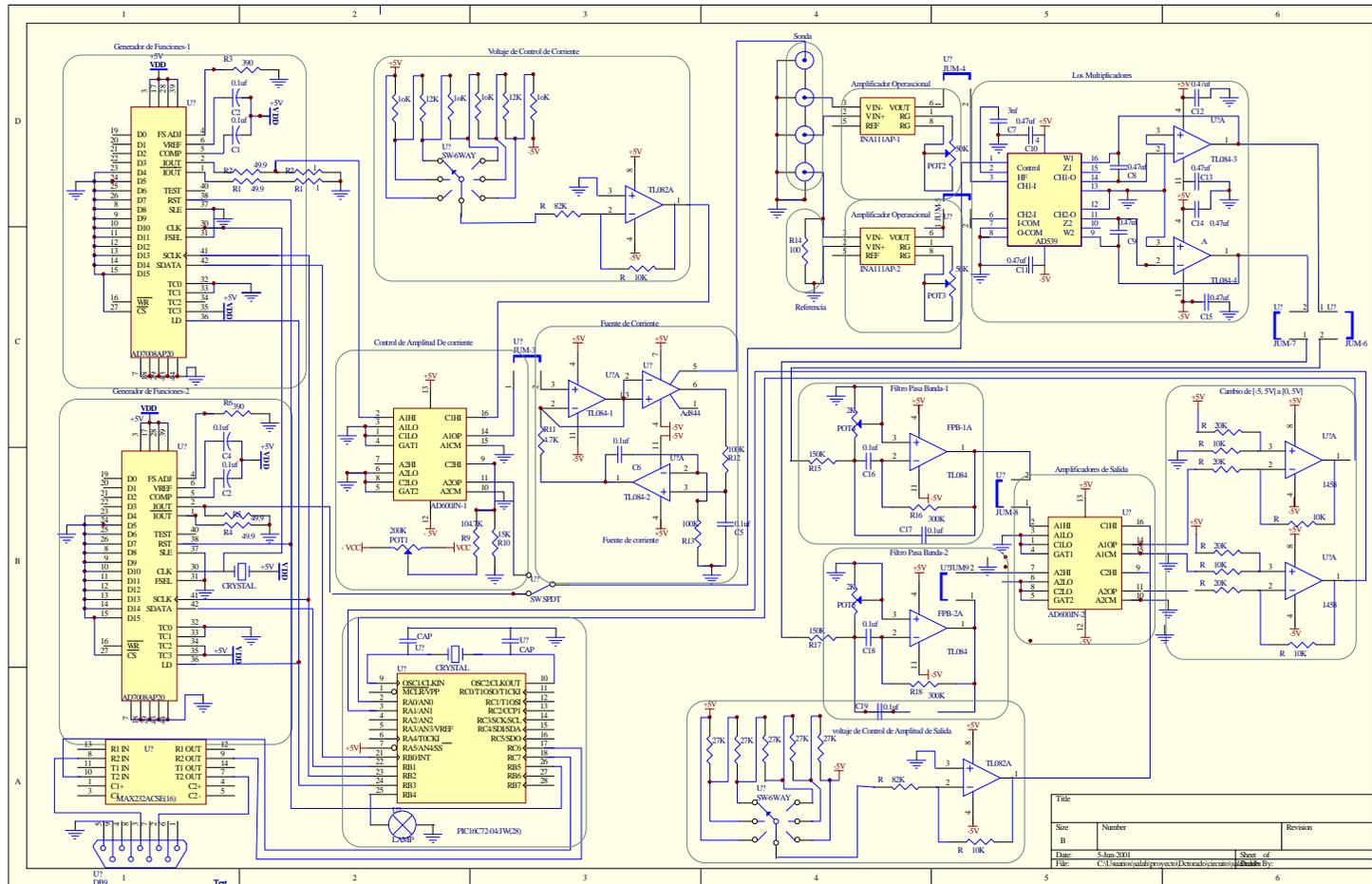
| Semana | Día | Grupo | Sonda Principal | Cerdo |
|--------|---------|-------|-----------------|-------|
| 1 | 7/26/01 | 3 | A | J |
| 1 | 7/27/01 | 2 | B | K |
| 1 | 8/1/01 | 1 | A | L |
| 2 | 8/2/01 | 4 | B | M |
| 2 | 8/3/01 | 1 | B | N |
| 2 | 8/8/01 | 2 | A | Ñ |
| 3 | 8/9/01 | 3 | B | O |
| 3 | 8/10/01 | 4 | A | P |
| 3 | 8/15/01 | 1 | A | Q |
| 4 | 8/16/01 | 4 | B | R |
| 4 | 8/17/01 | 3 | B | S |
| 4 | 8/22/01 | 2 | A | T |
| 5 | 8/23/01 | 1 | B | U |
| 5 | 8/24/01 | 2 | B | V |
| 5 | 8/29/01 | 3 | A | W |
| 6 | 8/30/01 | 4 | A | X |

Estudios realizados

Durante seis meses se realizaron 36 experimentos y quedaron clasificados de la siguiente forma.

| No serie | Fecha | No de experimentos | Tipo de experimento | Observaciones |
|----------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------|
| 1 | 26/04/01-13/07/01 | 9 | Piloto | Excluidos |
| 2 | 26/07/01-10/08/01 | 9 | Protocolo | Excluidos |
| | 20/08/01-13/09/01 | 18 | Protocolo | Incluidos |

11.6. Anexo VI, Diagrama del circuito electrónico de la segunda versión del espectrómetro de impedancia



11.4. Anexo IV, Análisis multivariado de Niveles de Daño Isquémico NDI

| Efecto principal: NDI | | | | |
|--|---|---|----------------|-----------|
| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-NDI | | | | |
| Variable Dependientes | Efecto cuadrático medio (Mean sqr Effect) | Errores cuadráticos medios (Mean sqr Error) | F(df1,2) 9,887 | p-level |
| A215 | 107197.7 | 2412.615 | 44.43217 | 9.36E-27 |
| A316 | 85555.91 | 1900.562 | 45.01611 | 4.4E-27 |
| A464 | 81585.84 | 1802.73 | 45.25683 | 3.22E-27 |
| A681 | 74969.13 | 1471.841 | 50.93563 | 2.23E-30 |
| A1000 | 65850.02 | 1307.281 | 50.37175 | 4.57E-30 |
| A1468 | 57178.22 | 1061.417 | 53.86973 | 0 |
| A2154 | 48850.47 | 861.1932 | 56.72417 | 0 |
| A3162 | 41275.06 | 653.0121 | 63.20718 | 0 |
| A4642 | 36807.48 | 556.5878 | 66.13059 | 0 |
| A6813 | 28985.54 | 424.334 | 68.30833 | 0 |
| A10000 | 24559.63 | 347.0067 | 70.77569 | 0 |
| A14678 | 19969.05 | 282.7091 | 70.63463 | 0 |
| A21544 | 15605.53 | 217.6625 | 71.69597 | 0 |
| A31623 | 11264.18 | 160.1518 | 70.33442 | 0 |
| A46416 | 8820.537 | 132.779 | 66.4302 | 0 |
| A68129 | 6513.544 | 100.3034 | 64.93839 | 0 |
| A100000 | 5034.132 | 82.27605 | 61.18589 | 0 |
| A146780 | 3841.607 | 67.81415 | 56.64904 | 0 |
| A215443 | 2938.125 | 60.6794 | 48.42048 | 5.52E-29 |
| A316228 | 2412.426 | 56.70299 | 42.54495 | 1.08E-25 |
| A464159 | 1806.766 | 57.5395 | 31.40044 | 2.7E-19 |
| A681292 | 1873.15 | 64.13313 | 29.20721 | 5.17E-18 |
| A1000000 | 874.2815 | 42.7431 | 20.45433 | 8.03E-13 |
| F215 | 37.45158 | 7.268605 | 5.152513 | 0.001553 |
| F316 | 20.82395 | 5.048337 | 4.124913 | 0.006435 |
| F464* | 7.474621 | 4.416778 | 1.692324 | 0.167074* |
| F681* | 8.555316 | 5.006222 | 1.708937 | 0.163572* |
| F1000* | 8.983993 | 5.22265 | 1.720198 | 0.161238* |
| F1468 | 21.59588 | 6.206733 | 3.479427 | 0.015575 |
| F2154 | 23.59017 | 7.909502 | 2.98251 | 0.030543 |
| F3162 | 36.11374 | 8.324998 | 4.337987 | 0.004798 |
| F4642 | 72.54272 | 9.428395 | 7.69407 | 4.45E-05 |
| F6813 | 81.18562 | 10.28689 | 7.892145 | 3.37E-05 |
| F10000 | 111.0909 | 11.24006 | 9.883472 | 2.05E-06 |
| F14678 | 154.2165 | 12.32745 | 12.51001 | 5.13E-08 |
| F21544 | 195.0783 | 13.80824 | 14.12767 | 5.31E-09 |
| F31623 | 209.6875 | 14.40091 | 14.56071 | 2.9E-09 |
| F46416 | 255.8569 | 15.62322 | 16.37671 | 2.3E-10 |
| F68129 | 255.9483 | 18.40491 | 13.90652 | 7.24E-09 |
| F100000 | 266.7733 | 22.95176 | 11.62322 | 1.78E-07 |

| | | | | |
|------------|----------|----------|----------|-----------|
| F146780 | 322.4037 | 30.15166 | 10.69273 | 6.58E-07 |
| F215443 | 341.0109 | 40.8873 | 8.340264 | 1.79E-05 |
| F316228 | 486.9498 | 61.90673 | 7.865861 | 3.49E-05 |
| F464159 | 640.8527 | 95.71217 | 6.695624 | 0.00018 |
| F681292 | 874.9433 | 154.8052 | 5.651901 | 0.000775 |
| F1000000 | 817.0947 | 130.3859 | 6.266739 | 0.000328 |
| A215_N | 21.61207 | 1.840614 | 11.74177 | 1.51E-07 |
| A316_N | 16.78025 | 1.297782 | 12.92994 | 2.84E-08 |
| A464_N | 15.68234 | 1.157447 | 13.54907 | 1.19E-08 |
| A681_N | 13.69766 | 0.913797 | 14.98983 | 1.59E-09 |
| A1000_N | 11.70357 | 0.780484 | 14.99527 | 1.58E-09 |
| A1468_N | 9.734384 | 0.593691 | 16.39638 | 2.24E-10 |
| A2154_N | 7.79713 | 0.489553 | 15.92704 | 4.3E-10 |
| A3162_N | 6.220592 | 0.369074 | 16.85457 | 1.18E-10 |
| A4642_N | 5.313552 | 0.297822 | 17.84139 | 2.99E-11 |
| A6813_N | 3.793711 | 0.226446 | 16.75331 | 1.36E-10 |
| A10000_N | 2.973657 | 0.17919 | 16.59498 | 1.7E-10 |
| A14678_N | 2.204482 | 0.142423 | 15.47843 | 8.04E-10 |
| A21544_N | 1.555546 | 0.10773 | 14.43933 | 3.44E-09 |
| A31623_N | 0.938812 | 0.073545 | 12.76505 | 3.58E-08 |
| A46416_N | 0.618026 | 0.055319 | 11.17196 | 3.35E-07 |
| A68129_N | 0.346156 | 0.036781 | 9.41119 | 3.98E-06 |
| A100000_N | 0.226966 | 0.024432 | 9.28987 | 4.72E-06 |
| A146780_N | 0.112885 | 0.01437 | 7.855726 | 3.54E-05 |
| A215443_N | 0.033863 | 0.007197 | 4.704906 | 0.00289 |
| A316228_N | 0.016212 | 0.002974 | 5.450994 | 0.001025 |
| A464159_N* | 2.53E-30 | 0 | | |
| A681292_N | 0.078313 | 0.008525 | 9.186524 | 5.46E-06 |
| A1000000_N | 0.118019 | 0.012303 | 9.592826 | 3.09E-06 |
| F215_N | 20.43398 | 7.02212 | 2.909945 | 0.033678 |
| F316_N* | 6.642503 | 5.83004 | 1.139358 | 0.332165* |
| F464_N* | 0 | 0 | | |
| F681_N* | 3.538741 | 4.418618 | 0.800871 | 0.493502* |
| F1000_N* | 7.385661 | 4.278022 | 1.726419 | 0.159962* |
| F1468_N | 28.20506 | 5.290048 | 5.331722 | 0.001211 |
| F2154_N | 36.23803 | 5.65384 | 6.409455 | 0.000269 |
| F3162_N | 62.9666 | 6.523415 | 9.652398 | 2.84E-06 |
| F4642_N | 111.9096 | 7.651944 | 14.62499 | 2.65E-09 |
| F6813_N | 121.0731 | 8.846315 | 13.68627 | 9.86E-09 |
| F10000_N | 160.106 | 8.979683 | 17.82981 | 3.04E-11 |
| F14678_N | 205.427 | 10.14915 | 20.24082 | 1.08E-12 |
| F21544_N | 249.7785 | 11.68952 | 21.36772 | 2.28E-13 |
| F31623_N | 269.1508 | 12.65024 | 21.27634 | 2.58E-13 |
| F46416_N | 315.8289 | 14.58376 | 21.6562 | 1.53E-13 |
| F68129_N | 313.6162 | 17.2165 | 18.21603 | 1.78E-11 |
| F100000_N | 317.8606 | 22.06527 | 14.40547 | 3.6E-09 |
| F146780_N | 373.2818 | 29.46122 | 12.67028 | 4.09E-08 |
| F215443_N | 380.3735 | 40.33205 | 9.431049 | 3.87E-06 |
| F316228_N | 525.7471 | 61.70293 | 8.520617 | 1.39E-05 |
| F464159_N | 679.294 | 95.64143 | 7.102508 | 0.000102 |

| | | | | |
|--------------|----------|----------|----------|-----------|
| F681292_N | 929.5427 | 153.8964 | 6.040054 | 0.000451 |
| F1000000_N | 912.6491 | 132.0557 | 6.91109 | 0.000133 |
| RESI215 | 21.26857 | 1.807298 | 11.76816 | 1.45E-07 |
| RESI316 | 16.60157 | 1.28258 | 12.94389 | 2.79E-08 |
| RESI464 | 15.68234 | 1.157447 | 13.54907 | 1.19E-08 |
| RESI681 | 13.62934 | 0.910757 | 14.96485 | 1.65E-09 |
| RESI1000 | 11.61068 | 0.775765 | 14.96675 | 1.64E-09 |
| RESI1468 | 9.555678 | 0.584519 | 16.34795 | 2.39E-10 |
| RESI2154 | 7.571623 | 0.476732 | 15.88235 | 4.58E-10 |
| RESI3162 | 5.977521 | 0.35675 | 16.75551 | 1.36E-10 |
| RESI4642 | 5.017233 | 0.285097 | 17.59835 | 4.2E-11 |
| RESI6813 | 3.474013 | 0.21445 | 16.19967 | 2.94E-10 |
| RESI10000 | 2.665409 | 0.167007 | 15.95988 | 4.11E-10 |
| RESI14678 | 1.908606 | 0.13002 | 14.67933 | 2.46E-09 |
| RESI21544 | 1.27145 | 0.094524 | 13.45107 | 1.37E-08 |
| RESI31623 | 0.73616 | 0.062946 | 11.69515 | 1.61E-07 |
| RESI46416 | 0.448683 | 0.045691 | 9.819862 | 2.24E-06 |
| RESI68129 | 0.219445 | 0.028435 | 7.717525 | 4.3E-05 |
| RESI100000 | 0.125506 | 0.017542 | 7.154728 | 9.47E-05 |
| RESI146780 | 0.038237 | 0.009729 | 3.930315 | 0.008407 |
| RESI215443* | 0.005719 | 0.005022 | 1.13884 | 0.332372* |
| RESI316228* | 0.011559 | 0.005799 | 1.99333 | 0.11341* |
| RESI464159 | 0.056695 | 0.008806 | 6.438565 | 0.000258 |
| RESI681292 | 0.21575 | 0.021312 | 10.12354 | 1.46E-06 |
| RESI1000000 | 0.239174 | 0.021508 | 11.12014 | 3.61E-07 |
| REACT215 | 0.234556 | 0.066715 | 3.515809 | 0.014821 |
| REACT316* | 0.099593 | 0.040279 | 2.472553 | 0.060427* |
| REACT464* | 0 | 0 | | |
| REACT681* | 0.043623 | 0.01679 | 2.598114 | 0.051134* |
| REACT1000 | 0.075825 | 0.015478 | 4.898898 | 0.002208 |
| REACT1468 | 0.194492 | 0.02238 | 8.690517 | 1.1E-05 |
| REACT2154 | 0.265123 | 0.0244 | 10.8655 | 5.16E-07 |
| REACT3162 | 0.353608 | 0.022713 | 15.56828 | 7.1E-10 |
| REACT4642 | 0.483397 | 0.022767 | 21.23226 | 2.74E-13 |
| REACT6813 | 0.48402 | 0.023534 | 20.56701 | 6.87E-13 |
| REACT10000 | 0.541613 | 0.022622 | 23.94149 | 6.64E-15 |
| REACT14678 | 0.557853 | 0.022775 | 24.49379 | 3.12E-15 |
| REACT21544 | 0.546922 | 0.024383 | 22.43022 | 5.28E-14 |
| REACT31622 | 0.473578 | 0.021765 | 21.75888 | 1.33E-13 |
| REACT46416 | 0.423741 | 0.021045 | 20.13502 | 1.25E-12 |
| REACT68129 | 0.356805 | 0.020555 | 17.35857 | 5.86E-11 |
| REACT100000 | 0.285771 | 0.020231 | 14.12575 | 5.33E-09 |
| REACT146780 | 0.257024 | 0.019737 | 13.02215 | 2.5E-08 |
| REACT215443 | 0.197948 | 0.019765 | 10.01505 | 1.7E-06 |
| REACT316228 | 0.184815 | 0.019129 | 9.661662 | 2.8E-06 |
| REACT464159 | 0.147354 | 0.018306 | 8.049314 | 2.7E-05 |
| REACT681292 | 0.103064 | 0.022937 | 4.493334 | 0.003872 |
| REACT1000000 | 0.104279 | 0.020069 | 5.195922 | 0.001462 |
| PROMAMPI | 15.57152 | 1.130971 | 13.76827 | 8.79E-09 |
| PROMAMPII | 5.724545 | 0.335785 | 17.04826 | 9.02E-11 |

| | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|-----------|
| PROMAMPIII | 0.841948 | 0.065122 | 12.92878 | 2.85E-08 |
| PROMAMPIV* | 0.001925 | 0.002263 | 0.850551 | 0.466425* |
| RESI_I | 15.44651 | 1.122388 | 13.76219 | 8.86E-09 |
| RESI_II | 5.449443 | 0.323434 | 16.8487 | 1.19E-10 |
| RESI_III | 0.635598 | 0.054129 | 11.74229 | 1.51E-07 |
| RESI_IV | 0.027076 | 0.00567 | 4.775416 | 0.002621 |
| REACT_I* | 0.007881 | 0.010097 | 0.780518 | 0.504942* |
| REACT_II | 0.368669 | 0.018617 | 19.80235 | 1.98E-12 |
| REACT_III | 0.431507 | 0.020371 | 21.18233 | 2.94E-13 |
| REACT_IV | 0.139735 | 0.01674 | 8.347345 | 1.78E-05 |
| PDAMPI_II | 2.472916 | 0.307785 | 8.03456 | 2.76E-05 |
| PDAMPI_III | 9.261124 | 0.764173 | 12.11914 | 8.87E-08 |
| PDAMPI_IV | 15.37341 | 1.061749 | 14.47933 | 3.25E-09 |
| PDAMPII_III | 2.249666 | 0.125094 | 17.98378 | 2.46E-11 |
| PDAMPII_IV | 5.605399 | 0.299114 | 18.73999 | 8.6E-12 |
| PDAMPIII_IV | 0.80154 | 0.049953 | 16.04589 | 3.64E-10 |
| PDRESII_II | 2.59938 | 0.312978 | 8.305314 | 1.88E-05 |
| PDRESII_III | 9.888945 | 0.789749 | 12.52163 | 5.04E-08 |
| PDRESII_IV | 12.88762 | 1.209204 | 10.65794 | 6.91E-07 |
| PDRESIII_III | 2.446022 | 0.133262 | 18.35502 | 1.47E-11 |
| PDRESIII_IV | 6.217492 | 0.339372 | 18.32061 | 1.54E-11 |
| PDRESIII_IV | 0.927891 | 0.064395 | 14.40931 | 3.58E-09 |
| PDREACTI-II | 0.472697 | 0.022762 | 20.76727 | 5.21E-13 |
| PDREACTI_III | 0.544469 | 0.026899 | 20.24109 | 1.08E-12 |
| PDREACTI_IV | 0.20826 | 0.024661 | 8.445065 | 1.55E-05 |
| PDREACTII_III* | 0.011943 | 0.006481 | 1.842682 | 0.137804* |
| PDREACTII_IV | 0.116307 | 0.0147 | 7.912141 | 3.27E-05 |
| PDREACTIII_IV | 0.125553 | 0.005569 | 22.54317 | 4.52E-14 |
| RAMP1* | 59435.68 | 32022.39 | 1.856067 | 0.135449* |
| RAMP2 | 6937.176 | 318.0315 | 21.81286 | 1.23E-13 |
| RAMP3 | 9456.995 | 242.5796 | 38.98513 | 1.14E-23 |
| RAMP4 | 9114.565 | 119.4589 | 76.29877 | 0 |
| RAMP5 | 7.15E+26 | 1.28E+26 | 5.575161 | 0.000863 |
| RAMP6 | 7.15E+26 | 1.28E+26 | 5.575161 | 0.000863 |
| RCOMPX1 | 2587.62 | 724.6451 | 3.570879 | 0.013749 |
| RCOMPX2 | 8642.716 | 524.9875 | 16.46271 | 2.04E-10 |
| RCOMPX3 | 9967.63 | 298.5641 | 33.38523 | 1.9E-20 |
| RCOMPX4 | 12708.77 | 267.8984 | 47.43877 | 1.94E-28 |
| RCOMPX5* | 4.05E+27 | 3.07E+27 | 1.319644 | 0.266656* |
| RCOMPX6* | 4.05E+27 | 3.07E+27 | 1.319644 | 0.266656* |
| A215_M | 103946.9 | 2440.63 | 42.5902 | 1.02E-25 |
| A316_M | 92851.45 | 2063.362 | 45.00008 | 4.49E-27 |
| A464_M | 82725.91 | 1756.883 | 47.08675 | 3.05E-28 |
| A681_M | 73248.77 | 1475.636 | 49.63879 | 1.16E-29 |
| A1000_M | 63883.3 | 1212.992 | 52.66587 | 0 |
| A1468_M | 55074.88 | 981.8394 | 56.09358 | 0 |
| A2154_M | 47700.6 | 799.4565 | 59.66629 | 0 |
| A3162_M | 41746.63 | 662.819 | 62.98345 | 0 |
| A4642_M | 36467.9 | 556.3459 | 65.54897 | 0 |
| A6813_M | 31228.33 | 463.0764 | 67.43668 | 0 |

| | | | | |
|------------|----------|----------|----------|----------|
| A10000_M | 25548.57 | 375.9042 | 67.96564 | 0 |
| A14678_M | 19838.71 | 296.2541 | 66.96519 | 0 |
| A21544_M | 14808.83 | 227.7216 | 65.03042 | 0 |
| A31623_M | 10803.12 | 169.1237 | 63.87702 | 0 |
| A46416_M | 7768.003 | 121.6923 | 63.83313 | 0 |
| A68129_M | 5634.652 | 87.21312 | 64.60784 | 0 |
| A100000_M | 4256.068 | 65.89137 | 64.59219 | 0 |
| A146780_M | 3460.083 | 55.58327 | 62.25045 | 0 |
| A215443_M | 3034.579 | 52.88968 | 57.37564 | 0 |
| A316228_M | 2816.141 | 54.36531 | 51.80032 | 0 |
| A464159_M | 2728.954 | 57.56586 | 47.40577 | 2.03E-28 |
| A681292_M | 2714.482 | 60.96511 | 44.52517 | 8.3E-27 |
| A1000000_M | 2737.663 | 63.80122 | 42.90926 | 6.75E-26 |
| F215_M | 140.9452 | 46.11567 | 3.056341 | 0.027648 |
| F316_M | 173.0668 | 48.68908 | 3.554531 | 0.014059 |
| F464_M | 206.7888 | 48.8716 | 4.231266 | 0.005558 |
| F681_M | 243.4425 | 45.59788 | 5.338901 | 0.001199 |
| F1000_M | 277.1488 | 38.90274 | 7.124147 | 9.89E-05 |
| F1468_M | 290.1332 | 30.56565 | 9.492132 | 3.55E-06 |
| F2154_M | 263.5252 | 22.79269 | 11.56183 | 1.94E-07 |
| F3162_M | 210.109 | 16.83025 | 12.48401 | 5.32E-08 |
| F4642_M | 165.5619 | 13.0377 | 12.6987 | 3.93E-08 |
| F6813_M | 160.9747 | 11.39367 | 14.12843 | 5.31E-09 |
| F10000_M | 199.8217 | 11.53538 | 17.32251 | 6.16E-11 |
| F14678_M | 264.4541 | 12.68509 | 20.84763 | 4.66E-13 |
| F21544_M | 324.3705 | 14.17146 | 22.889 | 2.81E-14 |
| F31623_M | 359.5249 | 15.76798 | 22.80094 | 3.17E-14 |
| F46416_M | 371.6403 | 17.46935 | 21.27384 | 2.59E-13 |
| F68129_M | 362.8962 | 19.0483 | 19.05137 | 5.59E-12 |
| F100000_M | 327.94 | 19.96481 | 16.42591 | 2.15E-10 |
| F146780_M | 266.2397 | 19.54003 | 13.62535 | 1.07E-08 |
| F215443_M | 188.8478 | 17.65659 | 10.6956 | 6.55E-07 |
| F316228_M | 123.4947 | 15.00355 | 8.231027 | 2.09E-05 |
| F464159_M | 82.15112 | 12.49209 | 6.576251 | 0.000213 |
| F681292_M | 57.41531 | 10.48929 | 5.473711 | 0.000993 |
| F1000000_M | 39.44294 | 8.893143 | 4.435209 | 0.004195 |

* Parámetro que no tenga significancia estadística $P < 0.05$

11.5. Anexo V, Análisis multivariado de Niveles de pH_i (NpHi)

| Efecto principal: NPHI | | | | |
|--|---|---|----------------|----------|
| Variables Independientes: 1-CLASE, 2-NPHI, 3-NDI | | | | |
| Variable Dependientes | Efecto cuadrático medio (Mean sqr Effect) | Errores cuadráticos medios (Mean sqr Error) | F(df1,2) 9,887 | p-level |
| A215 | 38005.84 | 2412.615 | 15.75296 | 5.48E-10 |
| A316 | 36460.41 | 1900.562 | 19.18401 | 4.65E-12 |
| A464 | 34225.74 | 1802.73 | 18.98551 | 6.12E-12 |
| A681 | 33002.75 | 1471.841 | 22.42277 | 5.33E-14 |
| A1000 | 30364.71 | 1307.281 | 23.22738 | 1.77E-14 |
| A1468 | 26410.74 | 1061.417 | 24.88254 | 1.83E-15 |
| A2154 | 23448.7 | 861.1932 | 27.22815 | 7.53E-17 |
| A3162 | 19979.64 | 653.0121 | 30.59613 | 7.95E-19 |
| A4642 | 17480.98 | 556.5878 | 31.40742 | 2.67E-19 |
| A6813 | 15167.77 | 424.334 | 35.74488 | 8.21E-22 |
| A10000 | 12020.45 | 347.0067 | 34.64042 | 3.56E-21 |
| A14678 | 9818.049 | 282.7091 | 34.72845 | 3.17E-21 |
| A21544 | 7350.41 | 217.6625 | 33.76975 | 1.14E-20 |
| A31623 | 5896.645 | 160.1518 | 36.8191 | 1.98E-22 |
| A46416 | 4395.187 | 132.779 | 33.10152 | 2.77E-20 |
| A68129 | 3019.172 | 100.3034 | 30.10038 | 1.55E-18 |
| A100000 | 2270.808 | 82.27605 | 27.59987 | 4.55E-17 |
| A146780 | 1654.758 | 67.81415 | 24.40137 | 3.54E-15 |
| A215443 | 1074.458 | 60.6794 | 17.70712 | 3.61E-11 |
| A316228 | 870.5172 | 56.70299 | 15.35223 | 9.59E-10 |
| A464159 | 787.127 | 57.5395 | 13.67977 | 9.95E-09 |
| A681292 | 596.0015 | 64.13313 | 9.293192 | 4.7E-06 |
| A1000000 | 229.7313 | 42.7431 | 5.374698 | 0.00114 |
| F215 | 19.21821 | 7.268605 | 2.644003 | 0.048098 |
| F316 | 15.23392 | 5.048337 | 3.017611 | 0.029132 |
| F464 | 27.73889 | 4.416778 | 6.280344 | 0.000322 |
| F681 | 19.32517 | 5.006222 | 3.860231 | 0.009255 |
| F1000 | 40.63906 | 5.22265 | 7.781312 | 3.93E-05 |
| F1468 | 60.37729 | 6.206733 | 9.727706 | 2.55E-06 |
| F2154 | 79.37516 | 7.909502 | 10.03542 | 1.66E-06 |
| F3162 | 71.20502 | 8.324998 | 8.553158 | 1.33E-05 |
| F4642 | 73.07365 | 9.428395 | 7.75038 | 4.11E-05 |
| F6813 | 96.05029 | 10.28689 | 9.337156 | 4.42E-06 |
| F10000 | 109.5818 | 11.24006 | 9.749219 | 2.48E-06 |
| F14678 | 110.4172 | 12.32745 | 8.95702 | 7.54E-06 |
| F21544 | 139.9891 | 13.80824 | 10.13808 | 1.43E-06 |
| F31623 | 166.5829 | 14.40091 | 11.56753 | 1.92E-07 |
| F46416 | 184.02 | 15.62322 | 11.77862 | 1.43E-07 |
| F68129 | 231.8535 | 18.40491 | 12.59737 | 4.53E-08 |
| F100000 | 280.5496 | 22.95176 | 12.22345 | 7.66E-08 |

| | | | | |
|-------------|----------|----------|----------|-----------|
| F146780 | 365.0797 | 30.15166 | 12.10811 | 9.01E-08 |
| F215443 | 486.3483 | 40.8873 | 11.89485 | 1.22E-07 |
| F316228 | 544.9286 | 61.90673 | 8.802413 | 9.37E-06 |
| F464159 | 673.7623 | 95.71217 | 7.039464 | 0.000111 |
| F681292 | 848.1633 | 154.8052 | 5.478909 | 0.000986 |
| F1000000* | 213.2014 | 130.3859 | 1.635156 | 0.179671* |
| A215_N | 12.2052 | 1.840614 | 6.631046 | 0.000197 |
| A316_N | 10.99862 | 1.297782 | 8.474937 | 1.48E-05 |
| A464_N | 11.26926 | 1.157447 | 9.736308 | 2.52E-06 |
| A681_N | 9.364903 | 0.913797 | 10.24834 | 1.23E-06 |
| A1000_N | 8.066104 | 0.780484 | 10.33475 | 1.09E-06 |
| A1468_N | 6.602673 | 0.593691 | 11.1214 | 3.6E-07 |
| A2154_N | 5.36605 | 0.489553 | 10.96112 | 4.51E-07 |
| A3162_N | 4.351702 | 0.369074 | 11.79085 | 1.41E-07 |
| A4642_N | 3.440478 | 0.297822 | 11.55214 | 1.97E-07 |
| A6813_N | 2.745307 | 0.226446 | 12.12347 | 8.82E-08 |
| A10000_N | 2.153815 | 0.17919 | 12.01972 | 1.02E-07 |
| A14678_N | 1.85812 | 0.142423 | 13.04651 | 2.42E-08 |
| A21544_N | 1.42508 | 0.10773 | 13.22828 | 1.87E-08 |
| A31623_N | 0.920173 | 0.073545 | 12.51161 | 5.11E-08 |
| A46416_N | 0.781662 | 0.055319 | 14.12998 | 5.3E-09 |
| A68129_N | 0.521591 | 0.036781 | 14.18087 | 4.93E-09 |
| A100000_N | 0.37362 | 0.024432 | 15.29251 | 1.04E-09 |
| A146780_N | 0.202043 | 0.01437 | 14.06029 | 5.84E-09 |
| A215443_N | 0.070411 | 0.007197 | 9.782922 | 2.36E-06 |
| A316228_N | 0.043962 | 0.002974 | 14.78145 | 2.13E-09 |
| A464159_N* | 1.85E-31 | 0 | | |
| A681292_N | 0.093315 | 0.008525 | 10.94634 | 4.6E-07 |
| A1000000_N* | 0.022776 | 0.012303 | 1.851255 | 0.136291* |
| F215_N* | 7.073195 | 7.02212 | 1.007273 | 0.388799* |
| F316_N* | 3.033872 | 5.83004 | 0.520386 | 0.668341* |
| F464_N* | 0 | 0 | | |
| F681_N* | 2.159667 | 4.418618 | 0.488765 | 0.69016* |
| F1000_N* | 1.474582 | 4.278022 | 0.344688 | 0.793015* |
| F1468_N* | 6.452083 | 5.290048 | 1.219664 | 0.30139* |
| F2154_N | 17.62625 | 5.65384 | 3.117572 | 0.025453 |
| F3162_N | 17.36539 | 6.523415 | 2.662009 | 0.046956 |
| F4642_N* | 17.59399 | 7.651944 | 2.299283 | 0.075989* |
| F6813_N | 29.26514 | 8.846315 | 3.308173 | 0.019659 |
| F10000_N | 34.2056 | 8.979683 | 3.809222 | 0.009925 |
| F14678_N | 35.7495 | 10.14915 | 3.522415 | 0.014688 |
| F21544_N | 54.37668 | 11.68952 | 4.651745 | 0.00311 |
| F31623_N | 72.11665 | 12.65024 | 5.700812 | 0.000724 |
| F46416_N | 72.6417 | 14.58376 | 4.980999 | 0.001971 |
| F68129_N | 107.4387 | 17.2165 | 6.240453 | 0.000341 |
| F100000_N | 136.3176 | 22.06527 | 6.177926 | 0.000372 |
| F146780_N | 201.6503 | 29.46122 | 6.8446 | 0.000146 |
| F215443_N | 312.9435 | 40.33205 | 7.759177 | 4.06E-05 |
| F316228_N | 359.2285 | 61.70293 | 5.821902 | 0.000611 |
| F464159_N | 497.2332 | 95.64143 | 5.198931 | 0.001456 |

| | | | | |
|---------------|----------|----------|----------|-----------|
| F681292_N | 599.2667 | 153.8964 | 3.893962 | 0.008837 |
| F1000000_N* | 126.4937 | 132.0557 | 0.957881 | 0.412007* |
| RESI215 | 12.10512 | 1.807298 | 6.697914 | 0.00018 |
| RESI316 | 10.95077 | 1.28258 | 8.538083 | 1.36E-05 |
| RESI464 | 11.26926 | 1.157447 | 9.736308 | 2.52E-06 |
| RESI681 | 9.343041 | 0.910757 | 10.25855 | 1.21E-06 |
| RESI1000 | 8.051642 | 0.775765 | 10.37897 | 1.02E-06 |
| RESI1468 | 6.523123 | 0.584519 | 11.15982 | 3.41E-07 |
| RESI2154 | 5.257149 | 0.476732 | 11.02747 | 4.11E-07 |
| RESI3162 | 4.24187 | 0.35675 | 11.89033 | 1.22E-07 |
| RESI4642 | 3.366063 | 0.285097 | 11.80674 | 1.38E-07 |
| RESI6813 | 2.598306 | 0.21445 | 12.11616 | 8.91E-08 |
| RESI10000 | 2.012333 | 0.167007 | 12.04941 | 9.78E-08 |
| RESI14678 | 1.695055 | 0.13002 | 13.03688 | 2.45E-08 |
| RESI21544 | 1.274757 | 0.094524 | 13.48605 | 1.3E-08 |
| RESI31623 | 0.787738 | 0.062946 | 12.51454 | 5.09E-08 |
| RESI46416 | 0.648399 | 0.045691 | 14.19083 | 4.86E-09 |
| RESI68129 | 0.39517 | 0.028435 | 13.89748 | 7.33E-09 |
| RESI100000 | 0.25353 | 0.017542 | 14.45306 | 3.37E-09 |
| RESI146780 | 0.105436 | 0.009729 | 10.83764 | 5.36E-07 |
| RESI215443* | 0.011375 | 0.005022 | 2.265017 | 0.079497* |
| RESI316228* | 0.014601 | 0.005799 | 2.51799 | 0.056889* |
| RESI464159 | 0.059754 | 0.008806 | 6.78598 | 0.000159 |
| RESI681292 | 0.186341 | 0.021312 | 8.743568 | 1.02E-05 |
| RESI1000000* | 0.016351 | 0.021508 | 0.760241 | 0.516541* |
| REACT215* | 0.130648 | 0.066715 | 1.958316 | 0.118682* |
| REACT316* | 0.042177 | 0.040279 | 1.047113 | 0.370899* |
| REACT464* | 0 | 0 | | |
| REACT681* | 0.01773 | 0.01679 | 1.05599 | 0.367009* |
| REACT1000* | 0.030005 | 0.015478 | 1.938576 | 0.121756* |
| REACT1468 | 0.103825 | 0.02238 | 4.639246 | 0.003164 |
| REACT2154 | 0.128841 | 0.0244 | 5.280276 | 0.0013 |
| REACT3162 | 0.105523 | 0.022713 | 4.64585 | 0.003136 |
| REACT4642 | 0.101676 | 0.022767 | 4.465927 | 0.004021 |
| REACT6813 | 0.143469 | 0.023534 | 6.096279 | 0.000417 |
| REACT10000 | 0.169848 | 0.022622 | 7.507985 | 5.77E-05 |
| REACT14678 | 0.169823 | 0.022775 | 7.456464 | 6.2E-05 |
| REACT21544 | 0.171233 | 0.024383 | 7.022542 | 0.000114 |
| REACT31622 | 0.167908 | 0.021765 | 7.714646 | 4.32E-05 |
| REACT46416 | 0.160603 | 0.021045 | 7.631421 | 4.85E-05 |
| REACT68129 | 0.164276 | 0.020555 | 7.992055 | 2.93E-05 |
| REACT100000 | 0.172226 | 0.020231 | 8.513158 | 1.41E-05 |
| REACT146780 | 0.173126 | 0.019737 | 8.771443 | 9.79E-06 |
| REACT215443 | 0.167038 | 0.019765 | 8.451178 | 1.54E-05 |
| REACT316228 | 0.139628 | 0.019129 | 7.299388 | 7.73E-05 |
| REACT464159 | 0.075314 | 0.018306 | 4.114071 | 0.006531 |
| REACT681292 | 0.07674 | 0.022937 | 3.345667 | 0.018683 |
| REACT1000000* | 0.03934 | 0.020069 | 1.960179 | 0.118396* |
| PROMAMPI | 10.2042 | 1.130971 | 9.022511 | 6.88E-06 |
| PROMAMPII | 3.94252 | 0.335785 | 11.74122 | 1.51E-07 |

| | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|-----------|
| PROMAMPIII | 0.904423 | 0.065122 | 13.88813 | 7.43E-09 |
| PROMAMPIV | 0.020397 | 0.002263 | 9.013313 | 6.97E-06 |
| RESI_I | 10.17697 | 1.122388 | 9.067248 | 6.46E-06 |
| RESI_II | 3.837187 | 0.323434 | 11.86389 | 1.27E-07 |
| RESI_III | 0.758807 | 0.054129 | 14.0185 | 6.19E-09 |
| RESI_IV* | 0.001689 | 0.00567 | 0.297806 | 0.827003* |
| REACT_I* | 0.00911 | 0.010097 | 0.902262 | 0.439516* |
| REACT_II | 0.115659 | 0.018617 | 6.212422 | 0.000354 |
| REACT_III | 0.163843 | 0.020371 | 8.042906 | 2.72E-05 |
| REACT_IV | 0.065068 | 0.01674 | 3.886924 | 0.008923 |
| PDAMPI_II | 1.969578 | 0.307785 | 6.399203 | 0.000273 |
| PDAMPI_III | 5.524292 | 0.764173 | 7.229106 | 8.54E-05 |
| PDAMPI_IV | 9.44138 | 1.061749 | 8.892289 | 8.26E-06 |
| PDAMPII_III | 1.116648 | 0.125094 | 8.92646 | 7.87E-06 |
| PDAMPII_IV | 3.50476 | 0.299114 | 11.71713 | 1.56E-07 |
| PDAMPIII_IV | 0.693881 | 0.049953 | 13.89068 | 7.4E-09 |
| PDRESII_II | 2.029873 | 0.312978 | 6.485675 | 0.000242 |
| PDRESII_III | 5.791187 | 0.789749 | 7.332948 | 7.38E-05 |
| PDRESII_IV | 11.46162 | 1.209204 | 9.478649 | 3.62E-06 |
| PDRESIII_III | 1.210924 | 0.133262 | 9.086806 | 6.28E-06 |
| PDRESIII_IV | 3.987118 | 0.339372 | 11.74854 | 1.49E-07 |
| PDRESIII_IV | 0.840165 | 0.064395 | 13.047 | 2.41E-08 |
| PDREACTI-II | 0.136399 | 0.022762 | 5.992486 | 0.000482 |
| PDREACTI_III | 0.176099 | 0.026899 | 6.546641 | 0.000222 |
| PDREACTI_IV | 0.076363 | 0.024661 | 3.096577 | 0.026185 |
| PDREACTII_III* | 0.014892 | 0.006481 | 2.297761 | 0.076142* |
| PDREACTII_IV* | 0.009903 | 0.0147 | 0.673665 | 0.568301* |
| PDREACTIII_IV | 0.034637 | 0.005569 | 6.219082 | 0.000351 |
| RAMP1* | 27818.87 | 32022.39 | 0.868732 | 0.456817* |
| RAMP2 | 3038.991 | 318.0315 | 9.555629 | 3.25E-06 |
| RAMP3 | 3109.614 | 242.5796 | 12.81894 | 3.32E-08 |
| RAMP4 | 5923.382 | 119.4589 | 49.58512 | 1.25E-29 |
| RAMP5* | 2.53E+26 | 1.28E+26 | 1.969909 | 0.116911* |
| RAMP6* | 2.53E+26 | 1.28E+26 | 1.969909 | 0.116911* |
| RCOMPX1* | 1059.508 | 724.6451 | 1.462106 | 0.223436* |
| RCOMPX2 | 3673.002 | 524.9875 | 6.996361 | 0.000118 |
| RCOMPX3 | 2823.861 | 298.5641 | 9.45814 | 3.73E-06 |
| RCOMPX4 | 9148.146 | 267.8984 | 34.14781 | 6.86E-21 |
| RCOMPX5* | 2.39E+27 | 3.07E+27 | 0.778965 | 0.505823* |
| RCOMPX6* | 2.39E+27 | 3.07E+27 | 0.778965 | 0.505823* |
| A215_M | 37539.72 | 2440.63 | 15.38116 | 9.21E-10 |
| A316_M | 35934.3 | 2063.362 | 17.41541 | 5.41E-11 |
| A464_M | 34208.25 | 1756.883 | 19.47099 | 3.13E-12 |
| A681_M | 32216.63 | 1475.636 | 21.83238 | 1.2E-13 |
| A1000_M | 29841.38 | 1212.992 | 24.60145 | 2.69E-15 |
| A1468_M | 26872.59 | 981.8394 | 27.36964 | 6.21E-17 |
| A2154_M | 23385.36 | 799.4565 | 29.25158 | 4.87E-18 |
| A3162_M | 19977.45 | 662.819 | 30.14012 | 1.47E-18 |
| A4642_M | 17326.28 | 556.3459 | 31.143 | 3.81E-19 |
| A6813_M | 15382.05 | 463.0764 | 33.21708 | 2.37E-20 |

| | | | | |
|------------|----------|----------|----------|-----------|
| A10000_M | 13480.94 | 375.9042 | 35.8627 | 7.02E-22 |
| A14678_M | 11103.04 | 296.2541 | 37.47811 | 8.29E-23 |
| A21544_M | 8272.048 | 227.7216 | 36.32526 | 3.81E-22 |
| A31623_M | 5590.446 | 169.1237 | 33.05536 | 2.94E-20 |
| A46416_M | 3504.944 | 121.6923 | 28.80168 | 8.94E-18 |
| A68129_M | 2227.223 | 87.21312 | 25.53771 | 7.5E-16 |
| A100000_M | 1572.434 | 65.89137 | 23.86404 | 7.38E-15 |
| A146780_M | 1325.87 | 55.58327 | 23.85377 | 7.49E-15 |
| A215443_M | 1266.86 | 52.88968 | 23.95288 | 6.54E-15 |
| A316228_M | 1266.986 | 54.36531 | 23.30504 | 1.59E-14 |
| A464159_M | 1281.057 | 57.56586 | 22.25377 | 6.73E-14 |
| A681292_M | 1295.347 | 60.96511 | 21.24735 | 2.69E-13 |
| A1000000_M | 1304.97 | 63.80122 | 20.45369 | 8.03E-13 |
| F215_M* | 59.13321 | 46.11567 | 1.28228 | 0.279189 |
| F316_M* | 76.65536 | 48.68908 | 1.574385 | 0.194037* |
| F464_M* | 93.01443 | 48.8716 | 1.903241 | 0.12745* |
| F681_M* | 101.8823 | 45.59788 | 2.234365 | 0.082767* |
| F1000_M* | 100.0297 | 38.90274 | 2.571276 | 0.052995* |
| F1468_M | 96.08985 | 30.56565 | 3.14372 | 0.024568 |
| F2154_M | 100.4584 | 22.79269 | 4.407485 | 0.004359 |
| F3162_M | 106.822 | 16.83025 | 6.347025 | 0.000294 |
| F4642_M | 103.7956 | 13.0377 | 7.961187 | 3.06E-05 |
| F6813_M | 102.9991 | 11.39367 | 9.040025 | 6.71E-06 |
| F10000_M | 121.7502 | 11.53538 | 10.5545 | 7.99E-07 |
| F14678_M | 165.8755 | 12.68509 | 13.07642 | 2.32E-08 |
| F21544_M | 222.2661 | 14.17146 | 15.68406 | 6.04E-10 |
| F31623_M | 265.0546 | 15.76798 | 16.80967 | 1.26E-10 |
| F46416_M | 270.2597 | 17.46935 | 15.4705 | 8.13E-10 |
| F68129_M | 236.3508 | 19.0483 | 12.40797 | 5.91E-08 |
| F100000_M | 192.7484 | 19.96481 | 9.654407 | 2.83E-06 |
| F146780_M | 158.1419 | 19.54003 | 8.09323 | 2.54E-05 |
| F215443_M | 126.2051 | 17.65659 | 7.147761 | 9.57E-05 |
| F316228_M | 92.22546 | 15.00355 | 6.146907 | 0.000388 |
| F464159_M | 60.44324 | 12.49209 | 4.838521 | 0.002401 |
| F681292_M | 37.30684 | 10.48929 | 3.556662 | 0.014018 |
| F1000000_M | 23.43479 | 8.893143 | 2.635153 | 0.04867 |

* Parámetro que no tenga significancia estadística $P < 0.05$

11.6. Anexo VI, Diagrama del circuito electrónico de la segunda versión del espectrómetro de impedancia

