

**Departamento de Medicina Física y Farmacología**  
(Facultad de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina)

**Departamento de Ingeniería Industrial**  
(Escuela Superior de Ingeniería y Tecnología)

**Nuevos instrumentos para la investigación en el  
laboratorio de Farmacología y Fisiología.  
Diseño e implementación**

Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de La Laguna presentada por  
**David Díaz Martín**

Directores de Tesis  
**Dr. Ricardo Borges Jurado**  
**Dr. Manuel Jesús Rodríguez Valido**

San Cristóbal de La Laguna, Junio de 2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Ricardo Borges Jurado, Catedrático de Farmacología del Departamento de Medicina Física y Farmacología, y Manuel Jesús Rodríguez Valido, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Industrial de la Universidad de La Laguna,

CERTIFICAN:

Que Don David Díaz Martín, Licenciado en Ingeniería Electrónica ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis titulada: **"Nuevos instrumentos para la investigación en el laboratorio de Farmacología y Fisiología. Diseño e implementación"**. Una vez examinada esta memoria, la hemos encontrado apta para su defensa ante la Comisión correspondiente a fin de acceder al grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en San Cristóbal de La Laguna a 28 de Junio de 2017.



Firma,  
Ricardo Borges Jurado  
Catedrático de Universidad



Firma,  
Manuel Jesús Rodríguez Valido  
Profesor Titular de Universidad

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Este trabajo ha sido financiado a través de los siguientes proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO): Consolider CSD2008-00005, BFU2010-15822 y BFU2013-45253-P. En los tres proyectos, el IP ha sido el Dr. Borges.

Durante la ejecución de esta Tesis, el doctorando ha disfrutado de un Contrato Predoctoral para la Formación de Doctores, según resolución de 9 de diciembre de 2015 y financiado con cargo al convenio suscrito entre la Universidad de La Laguna y la entidad financiera CaixaBank. La duración del contrato se extiende desde el 30 de septiembre de 2016 hasta la fecha de defensa de la Tesis.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

**Publicaciones:**

1. Borges, R., **Díaz-Martín, D.**, Hernández-Jiménez, J.G., Rodríguez-Valido y M., Beltrán, B. (2016). Analyzing isolated blood vessel contraction in multi-well plates. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 389(5).
2. **Díaz-Martín, D.**, Hernández-Jiménez, J.G; Rodríguez-Valido, Manuel y Borges, R., (2015). Measuring the Contractile Response of Isolated Tissue Using an Image Sensor. *Sensors. Especial edition Novel Biomaterials and Sensor for Tissue Engineering.* 15(4). 9179-9188.
3. Universidad de La Laguna. Patente. *Procedimiento y dispositivo para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas mediante métodos ópticos.* Borges, R., Rodríguez-Valido, M., Machado, J.D., Beltrán, B., Suarez-Montesinos, M., Díaz-Martín, D. y González-Morales, Y. ES. Int. Cl: G01N 33/483, no. 2006.31. 31 enero de 2014.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

*A mis padres, a mi hermano y a Yanira.*

*Gracias por creer siempre en mí y no dejar que cayera cuando las fuerzas flaqueaban. Vuestro calor me ha permitido llegar hasta el final.*

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## Agradecimientos.

*Quisiera aprovechar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que me regalaron su tiempo sin pedir nada a cambio y a aquellas otras que me apoyaron cuando más lo necesité.*

a los tutores Ricardo y Zacarías:

*Muchísimas gracias por haberme dado la oportunidad de realizar un trabajo con el que, a pesar de las muchas horas de dedicación y algún que otro mal rato, he disfrutado de principio a fin. Gracias también por el compromiso y la confianza que depositasteis en mí desde el primer día y les agradezco que, durante estos años, siempre hayáis estado dispuestos a ayudarme sin condición. Me he sentido muy querido. Por todo, gracias.*

a Francis, Ramón y Fran:

*He dicho muchas veces que los años que pasé en el Servicio de Electrónica de la Universidad difícilmente podré olvidarlos. Desde el primer día, siempre estuvisteis dispuestos a enseñarme sin esperar nada a cambio y aún hoy lo seguís haciendo. Créanme cuando les digo que todos vuestros consejos los llevo siempre conmigo. Estaré siempre agradecido por vuestro apoyo, por enseñarme tanto y por todo lo que me habéis ayudado con el proyecto CANStim8. De corazón, gracias.*

a José Gerardo Hernández, "Josito":

*Muchas gracias por las largas jornadas que pasaste en el Laboratorio de Farmacología del IUBO realizando experimentos y por darle valor al instrumento MuWOB. Gracias también por tus ideas y sugerencias para mejorar el sistema.*

a Beatriz Beltrán:

*Gracias por iniciarme en el proyecto MuWOB hace ya unos años y por haberme ayudado tanto al comienzo de esta aventura.*

y a David Hernández:

*Muchas gracias por estar siempre cerca.*

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

*"No creo que haya alguna emoción más intensa para un inventor que ver alguna de sus creaciones funcionando. Esa emoción hace que uno se olvide de comer, de dormir, de todo".*

Nikola Tesla.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



# Índice

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

<b>Prólogo</b>	2
<b>Objetivos</b>	3
<b>Marco académico</b>	4
<b>Marco teórico</b>	5
<b>MuWOB</b>	
1.1. Estudios de la contracción muscular en Farmacología.	6
1.2. El baño de órganos y los transductores electrónicos.	10
1.2.1. El baño de órganos convencional.	11
1.2.2. Los transductores electrónicos.	12
1.2.3. Preparación de los experimentos.	15
1.2.4. Desventajas.	18
1.2.5. Baño de órganos del Laboratorio de Farmacología del IUBO-AG de la ULL.	19
1.3. El instrumento Multi-Well Organ Bath (MuWOB).	21
1.3.1. El baño de órganos multipocillos.	21
1.3.2. Visión por computador y fotogrametría.	24
1.3.2.1. Cámara digital.	26
1.3.2.2. Objetivo bi-telecéntrico.	26
1.3.2.3. Plataforma de observación	32
1.3.2.4. Algoritmo de análisis de imagen.	33
1.3.2.5. Programa <i>MuWOB Software</i> .	43
1.4. Experimentos en el Laboratorio de Farmacología.	43
1.5. Discusión de los resultados.	48
<b>CANStim-8</b>	
2.1. Los electroestimuladores en Farmacología.	51
2.2. El electroestimulador CANStim-8.	52
2.2.1. Especificaciones de diseño.	52
2.2.2. Arquitectura funcional básica.	56
2.2.3. La Unidad de Control Principal.	56
2.2.3.1. Diseño e implementación <i>hardware</i> .	57
2.2.3.2. Diseño e implementación <i>software</i> .	61
2.2.4. Canales de Estimulación.	63
2.2.4.1. Diseño e implementación <i>hardware</i> .	63
2.2.4.1.1. La Unidad de Potencia.	63
2.2.4.1.2. La Unidad de Protección.	68
2.2.4.1.3. La Unidad de Control Secundario.	78
2.2.4.2. Diseño e implementación <i>software</i>	84
2.2.5. Fuentes de alimentación.	86
2.2.5.1. Fuente de alta potencia.	86
2.2.5.2. Fuente de baja potencia.	87
2.2.6. Herramientas CAD utilizadas	87
2.2.6.1. NI Multisim.	88
2.2.6.2. NI Ultiboard.	89
2.2.6.3. MikroC for PIC32.	89
2.2.6.4. Mikromedia Visual TFT.	91
2.2.6.5. Mplab-IDE	92

II

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

2.2.7.	Construcción del prototipo.	93
2.2.7.1.	Bastidor.	93
2.2.7.2.	Panel central de conexiones.	94
2.2.7.3.	Instalación de las fuentes de alimentación.	95
2.2.7.4.	Conectores de entrada y salida.	96
2.2.7.5.	Fabricación y montaje de los Canales de Estimulación.	98
2.2.7.6.	Montaje de la Unidad de Control Principal.	99
2.3.	Experimentos en el Laboratorio de Farmacología.	101
2.4.	Discusión de los resultados.	107
<b>Perspectivas de futuro</b>		110
<b>Conclusiones</b>		113
<b>Reflexión personal</b>		114
<b>Bibliografía</b>		115
<b>Apéndices</b>		
I.	Guía de Usuario <i>MuWOB Software</i>	
II.	Guía de Usuario CANStim8.	
III.	Presupuesto material del proyecto MuWOB.	
IV.	Presupuesto material del proyecto CANStim8.	
V.	Esquemas eléctricos CANStim-8.	
VI.	Planos de circuitos impresos CANStim-8.	
VII.	Artículo científico: <i>Measuring the contractile response of isolated tissue using an image sensor.</i>	
VIII.	Artículo científico: <i>Analyzing isolated blood vessel contraction in multi-well plates.</i>	
IX.	Certificado-Título de patente de invención: <i>Dispositivo y procedimiento para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas mediante métodos ópticos.</i>	
<b>Contenido del CD</b>		
<i>MuWOB Software (resources)</i>	Aplicación MuWOB Software. Código Fuente	
<i>MuWOB Software (executable)</i>	Aplicación MuWOB Software. Ejecutable	
<i>UCP CANStim8 (resources)</i>	Firmware Unidad de Control Principal CANStim8. Código Fuente	
<i>UCS CANStim8 (resources)</i>	Firmware Unidad de Control Secundario CANStim8. Código Fuente	

III

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Prólogo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Los fármacos han logrado introducirse en la rutina diaria de las sociedades contemporáneas y, prácticamente, se encuentran en casi todos los productos de consumo, aunque no siempre los consideremos como tales. La realidad respecto a estas sustancias químicas es que su uso ha trascendido el ámbito terapéutico y se consumen por todo el mundo, a veces, indiscriminadamente.

Inevitablemente, consumir fármacos, con o sin control, conlleva padecer sus efectos tóxicos, los cuales pueden provocar daños muy serios en la salud física y mental de las personas. Por esta razón, es sumamente importante llevar a cabo una sincera y constante valoración de la relación beneficio-riesgo que estas sustancias entrañan para el ser humano.

La Farmacología es la ciencia que estudia, sintetiza y evalúa el beneficio y el riesgo de los fármacos. Desafortunadamente, es una ciencia que requiere experimentar con seres humanos en alguna de sus fases más avanzadas, pues solo así se consigue una valoración exacta sobre los posibles efectos curativos de un fármaco en prueba. Es evidente que las personas que se someten a ensayos clínicos con fármacos experimentales asumen un riesgo considerable.

Con el fin de minimizar este riesgo, los investigadores están obligados a evaluar los posibles efectos que pudieran resultar de una sustancia, en tejidos y órganos aislados de animales, en una etapa prematura, y en animales vivos *a posteriori*. Solo si los resultados fueran favorables, se iniciarían los ensayos con seres humanos para determinar si, finalmente, la sustancia en cuestión se convierte en un fármaco nuevo.

La experimentación con cultivos *in vitro*, tejidos animales, y animales enteros constituyen un campo de investigación con entidad propia denominado Farmacología Experimental. Los investigadores que trabajan en dicha área han de estar continuamente innovando técnicas que permitan seguir generando conocimiento y dejar atrás vías atávicas de experimentación. Sin embargo, frecuentemente sus investigaciones se ven ralentizadas por la obsolescencia de los laboratorios o porque la tecnología que necesitarían para continuar, sencillamente, no se ha desarrollado. Por estos motivos, es fundamental fomentar el diálogo y el trabajo multidisciplinar entre los científicos, que precisan de nuevas tecnologías y los que tienen la capacidad de desarrollarla. Es aquí donde entramos los ingenieros.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Objetivos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

El principal interés de esta Tesis Doctoral es académico, pretendiendo optar al grado de Doctor a través del programa de doctorado Física e Ingeniería que se imparte en la Escuela de Doctorado y Estudios de Postgrado de La Universidad de La Laguna. Cabe mencionar que este programa está reconocido con la distinción de Mención de Calidad por parte del Ministerio de Educación y Ciencia (referencia MCD2004-00437).

De igual relevancia es el motivo formativo, no solo considerando importante los conocimientos puramente científicos y técnicos, sino también, por el hecho de aprender a gestionar proyectos de ingeniería e investigaciones científicas. Es fundamental para un investigador plantear soluciones, organizar el trabajo, calcular tiempos de ejecución, priorizar tareas y tomar decisiones con criterio. Esta tesis supone una oportunidad para aprender y ganar experiencia en todos esos aspectos.

*Grosso modo*, el proyecto científico-técnico de esta tesis consiste en diseñar e implementar dos instrumentos electrónicos para su uso en los laboratorios de Farmacología y Fisiología, inexistentes en el mercado. Se responde así, a las necesidades reales de los científicos del Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis de la Universidad de La Laguna. Con estos equipos, los investigadores pretenden abrir nuevas vías de experimentación y mejorar procedimientos de estudio ya existentes. Además, según su criterio, son aparatos perfectamente exportables a muchas áreas de la Farmacología y Fisiología. Dichos instrumentos son:

- a) *Multi-Well Organ Bath* (MuWOB): consiste en un innovador instrumento para medir la respuesta contráctil que provocan las sustancias químicas en porciones pequeñas de tejido vivo. Su técnica de medida es totalmente diferente a la empleada por los equipos que se utilizan hoy en día y aporta ventajas que no ofrecen los instrumentos convencionales. El MuWOB se distingue por su capacidad para analizar múltiples sustancias con hasta noventa y seis porciones de tejido en paralelo. Con ello se consigue, entre otras cosas, un ahorro importante de sustancias y un mejor aprovechamiento de los animales en cada experimento. Además, el MuWOB ocupa muy poco espacio de poyata y, económicamente, está al alcance de pequeños y medianos laboratorios.
- b) *CANStim-8*: es un equipo de electroestimulación multicanal y reprogramable que permite excitar hasta ocho porciones de tejido al mismo tiempo y de forma independiente. Está especialmente ideado para estimular preparaciones biológicas de muy baja impedancia mediante impulsos eléctricos de alta potencia. Su diseño incorpora mejoras y añade prestaciones adicionales con respecto a sus predecesores en el mercado, convirtiéndolo en un instrumento único para el desarrollo de nuevas técnicas de experimentación en Farmacología y Fisiología.

De acuerdo con la escala *Technology Readiness Level* (European Commission, 2014), encargada de medir los niveles de madurez tecnológicos, se ha fijado alcanzar un nivel TRL-6 como cénit de desarrollo para ambos instrumentos. Esto implica un modelo de sistema y subsistema o demostrar el funcionamiento de un prototipo en un entorno relevante.

Por último, se busca potenciar y consolidar un equipo de investigación multidisciplinar en el cual confluyan científicos y tecnólogos de diferentes departamentos de la propia Universidad de La Laguna. El desarrollo y finalidad de estas tesis implica conocimientos muy diversos y, por consiguiente, es fundamental el asesoramiento de científicos y profesionales especializados en áreas como la biomedicina, farmacología, fisiología, mecánica, matemáticas aplicadas, electrónica, informática y física.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Marco académico

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Para el desarrollo de esta tesis se creó un marco de colaboración interdepartamental dependiente de la Universidad de La Laguna: el Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis del Departamento de Medicina Física y Farmacología, el Grupo de Investigación Sensores Inteligentes del Departamento de Ingeniería Industrial y el Servicio de Electrónica, que se encuentra integrado dentro de los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación (SEGAI).

El Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis, dirigido por el doctor y catedrático de Farmacología don Ricardo Borges Jurado, consolidado desde 1990 y perteneciente al Departamento de Medicina Física y Farmacología de La Universidad de La Laguna, ha mantenido una productividad de excelencia con financiación competitiva nacional ininterrumpida a lo largo de sus más de 25 años de historia. Durante estos años, la labor de los físicos, ingenieros y matemáticos que participan en este grupo ha sido vital para su desarrollo investigador. Gracias a ellos, el personal científico cuenta con multitud de sistemas electrónicos exclusivos y programas de ordenador personalizados para su investigación. Además, esta cooperación ha dado como resultado tesis doctorales, publicaciones en revistas de prestigio, modelos de utilidad y patentes.

Por otra parte, el Grupo de Investigación Sensores Inteligentes, coordinado por el doctor y profesor titular de la Universidad de la Laguna don Manuel Rodríguez Valido, comenzó su andadura hace 17 años con su primera tesis doctoral sobre instrumentación distribuida y bajo el seno del proyecto de investigación IDEA, durante el cual mantuvo, y sigue manteniendo, una estrecha relación colaborativa con el Departamento de Diseño Electrónico de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Sus principales líneas de investigación son el diseño e implementación de sensores inteligentes, procesado de imágenes en FPGA, visión por computador y sensores de imagen 3D. Actualmente, este grupo participa en las misiones SolarOrbiter y Sunrise, trabajando en el desarrollo de *firmware* para cámaras de precisión, calibración de cámaras y compresión de imágenes. Al mismo tiempo, el grupo también desarrolla trabajos en las líneas *Compressed sensing*, sensores para la agricultura, concretamente para la detección de hongos, y sensores para la conducción autónoma de vehículos.

Finalmente, mencionar que la relación de los grupos de investigación antes citados con el Servicio de Electrónica de la Universidad de La Laguna no es nueva y desde hace varios años ha sido una colaboración muy productiva que ha dado lugar al desarrollo de multitud de equipos electrónicos y programas informáticos para la investigación. Por ejemplo: programa informático para el análisis de registros amperométricos (SPIKE, 2001), potenciostato de cuatro canales (CANSTAT, 2002), equipos de acondicionamiento de señal multicanal para transductores de fuerza (CANSBRIDGE-4 Y CANSBRIDGE-16, 2007), sistema de cromatografía con detección biológica (CANSCHROME/CASCADE, 2010) y programa informático para realizar los test de conducta *open field*, *elevated plus maze*, *Morris' test* y *Porsolt's test* (CANSBEHAV, 2010). Esta cooperación se mantiene en la actualidad en los proyectos: CANSWATER (equipo compacto de purificación de agua), CANStim-8 y MuWOB. Los dos últimos corresponden con el proyecto científico-técnico de esta tesis doctoral.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Marco teórico

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Para estudiar los efectos farmacológicos de una sustancia química en tejidos y órganos aislados de animales, los investigadores utilizan sistemas de incubación donde mantienen vivas las muestras durante el periodo de las pruebas. Simultáneamente, emplean instrumentos de medición para observar cómo reaccionan y equipos de estimulación para excitarlas y reproducir su comportamiento fuera del organismo.

Todos estos aparatos apenas han cambiado desde aparecieron los primeros modelos hace ya algunas décadas, pero siguen utilizándose porque devuelven resultados muy rigurosos y fiables. Sin embargo, su desarrollo ha quedado obsoleto e inconexo con las investigaciones modernas por ser demasiado lentos, tediosos y poco rentables para producir sustancias terapéuticas a gran escala. Con estos aparatos resulta imposible atender el crecimiento exponencial que ha experimentado la demanda de fármacos en los últimos diez años, así que actualmente, los estudios con órganos y tejidos vivos solo se llevan a cabo en las últimas etapas del cribado farmacológico.

En respuesta a esta circunstancia, los grandes laboratorios farmacéuticos han optado por la utilización de sistemas robóticos diseñados, específicamente, para el análisis de sustancias de forma masiva. Estos sistemas han posibilitado la automatización de multitud de procesos que, anteriormente, el investigador realizaba manualmente; como preparar las muestras, inyectar líquidos, registrar los datos y lavar el material, en otras labores. Como resultado, las grandes compañías farmacéuticas evalúan librerías de cientos de miles de sustancias diariamente. Sin embargo, los resultados obtenidos por estos *mega-robots* han sido decepcionantes. Hace unos años se tenía un paradigma: "*de cada diez mil sustancias que salen del laboratorio de química farmacéutica, solo una alcanza la clínica*". Hoy, un robot de una gran compañía analiza unas cien mil sustancias diarias y ni de lejos la clínica recibe diez sustancias nuevas cada mañana. Es más, el número de fármacos notablemente nuevos ha disminuido de forma considerable en las dos últimas décadas.

¿Dónde está el problema? La respuesta a dicha cuestión la encontramos en *la diferencia*, ya que estos sistemas autómatas no trabajan con tejidos vivos y órganos aislados, la *auténtica diana* de los fármacos. En su lugar, las sustancias se ensayan en células cultivadas, enzimas, receptores, transportadores o ADN sobre una placa multipocillos. Como consecuencia, proporcionan una inmensa cantidad de información que no siempre es de utilidad.

Se cuenta, como ejemplo, con el caso de los Laboratorios Schering, donde una serie de citostáticos proporcionó unos resultados muy prometedores tras el análisis masivo de su actividad anticancerosa, sin embargo, en realidad se demostraría posteriormente que era fruto de una contaminación cruzada con hipoclorito sódico. En otras palabras, a nivel celular, la lejía es un eficiente antitumoral pero aplicada en tejidos, solo es lejía.

La conclusión obtenida es que los aparatos para la experimentación con órganos enteros y tejidos vivos de animales proporcionan resultados más rigurosos, no obstante, tienen en su contra la lentitud, el tedio y la poca rentabilidad. En contraposición, las plataformas robóticas de producción masiva cuentan con la rapidez y el automatismo, aunque con resultados menos provechosos. Por tanto, parece evidente que la solución al problema pasa por el diseño de nuevos instrumentos de laboratorio que permitan experimentar con muestras de tejido vivo y que, al mismo tiempo, estén adaptados a los *macro-robots* que ya existen para trabajar de forma rápida y automática.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# MuWOB

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Este capítulo trata sobre la labor científica y técnica llevada a cabo para diseñar, implementar y verificar el instrumento de medida MuWOB. Para facilitar su lectura y comprensión, el capítulo está organizado en diferentes secciones donde se detallarán todos los aspectos relevantes del proyecto. Ante todo, se pretende argumentar, de manera clara y concisa, las decisiones tomadas en el diseño del nuevo aparato para conseguir poner de manifiesto la necesidad y la trascendencia que podría alcanzar en las investigaciones y estudios farmacológicos en el futuro.

En un primer bloque se resume el surgir del interés científico por el estudio de la contracción muscular y la evolución de las técnicas e instrumentos de experimentación con animales enteros, órganos aislados y tejidos desde finales del siglo XIX hasta hoy.

En un segundo bloque se describe el sistema de medida convencional que usan los científicos para el estudio de la contracción muscular con muestras de tejido vivo. Se trata de un instrumento que combina un sistema de incubación que mantiene funcionales las preparaciones (conocido comúnmente como baño de órganos) y sensores de fuerza electromecánicos para la medición de las contracciones (transductores). En líneas generales, es un sistema que ofrece resultados satisfactorios pero con notables problemas que han llevado a una reducción de su popularidad. Además, según la experiencia de los investigadores del Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis, es un sistema muy caro, incómodo para llevar a cabo el trabajo y tremendamente laborioso a la hora de montar y preparar los experimentos.

El tercer bloque pormenoriza los diferentes aspectos que definen el diseño y la implementación del nuevo sistema de medida MuWOB. Este innovador instrumento se presenta como una alternativa al sistema de medida convencional aportando dos grandes avances: una alta capacidad para el análisis simultáneo de múltiples sustancias con hasta 96 preparaciones y una gran adaptabilidad a las plataformas robóticas como las que tienen las grandes empresas farmacéuticas. En general, MuWOB es mucho más eficiente, más barato y obtiene resultados igualmente rigurosos y precisos.

Finalmente, el cuarto bloque está dedicado a los estudios farmacológicos que se realizaron para validar el sistema MuWOB. Los experimentos se llevaron a cabo con la colaboración del doctor José Gerardo Hernández y se demostró que el nuevo aparato supone una alternativa factible y muy eficiente para el estudio de la contracción muscular con pequeñas muestras de tejido vivo (Díaz-Martín, D. et al., 2015; Hernández-Jiménez et al., 2015; Borges, R. et al, 2016).

## 1.1. Estudios de la contracción muscular en Farmacología.

### *Resumen histórico.*

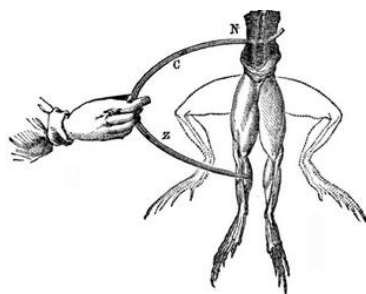
A finales del siglo XVIII, comenzaron los estudios sobre contracción muscular con la observación sistemática de los efectos que producía la electricidad en los músculos y nervios en las patas de las ranas. Por aquel entonces, se desconocía prácticamente los efectos de la electricidad en el cuerpo humano, pero ya se había observado que los músculos producían movimientos más enérgicos cuando eran sometidos a descargas eléctricas que cuando se contraían voluntariamente. Estas primeras observaciones eran meras experiencias anecdóticas sin ningún rigor científico, pero despertaron la curiosidad de dos grandes estudiosos de la época: los italianos Luigi Galvani (Bologna, 1737) y Alessandro Giuseppe Antonio Anastasio Volta (Como, 1745).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 1 | Ilustración del experimento de Luigi Galvani.** El dibujo representa el movimiento de las patas de la rana cuando la varilla de cobre toca el nervio lumbar y la de hierro el músculo de una pata. Con la mano, el investigador mantiene unidos los dos metales.

Galvani publicó el primer estudio estrictamente científico sobre la contracción muscular, titulado *Motu Viribus Electricitatis en Musculari Commentarius* (1791), sobre el efecto que la electricidad producía en los movimientos musculares y donde se plantea, por primera vez, el origen de la contracción de los músculos.

En sus experimentos conecta el nervio de una pata de rana con una varilla de cobre y el músculo de la misma pata con una varilla de hierro (Fig. 1). Observó que al tocarse las varillas entre sí, el músculo se contraía del mismo modo que cuando se hacía pasar una descarga eléctrica. Esto le hace pensar que el tejido animal debía contener una fuerza vital innata que activaba los músculos y nervios, pues nunca utilizó una fuente de electricidad externa para la estimulación de los tejidos. Creía que había descubierto una nueva forma de electricidad natural, como la de los rayos o las anguilas, llamándola *electricidad animal*.

Los colegas científicos de Galvani, en general, aceptaron su punto de vista, pero Alessandro Volta, profesor de física de la Escuela Real de Como, no estaba convencido y buscó una explicación más lógica a dicha teoría. Volta repitió los experimentos de Galvani y supuso que la fuente de electricidad no provenía de los músculos o nervios del animal, sino del punto exacto donde se unían ambas varillas. De algún modo, pensaba, el contacto entre los dos metales actuaba como un generador eléctrico cuando sus dos extremos tocaban un medio conductor, como es el tejido del animal.

Para demostrar su teoría, decidió experimentar con su propia anatomía, utilizando la lengua, pues en dicha época no se habían desarrollado equipos para la medición de corrientes eléctricas tan bajas. Comienza su investigación con la combinación de todo tipo de metales, tales como: cobre, plata, aluminio, hierro, entre otros; colocando su lengua entre medio de dos varillas, observaba que al encontrarse ambas varillas metálicas sentía un sabor ácido que sólo desaparecía al separarlos.

Estos sencillos experimentos convencen a Volta de que los metales sí actuaban como fuente de electricidad y no, solamente, como simples conductores; y, tanto el músculo como el nervio, solo respondían a un *shock eléctrico*. Su convencimiento es tal que, decide dar un paso más en su estudio, plantea la posibilidad de generar electricidad sin la utilización de ningún tejido animal.

Su teoría es llevada a la práctica y, en un corto periodo de tiempo, presenta ante el mundo la primera batería eléctrica de la historia, construida a partir de discos de zinc, cobre y cuero empapado

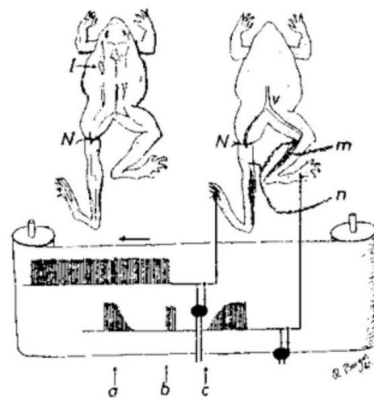
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

en agua salada. Con ello consigue desmentir en la mayor la existencia de la *electricidad animal* que defendía Galvani. Sin embargo, nunca supo dar un razonamiento correcto sobre el funcionamiento de su invento (en realidad, la generación de electricidad no la origina el contacto de dos metales, sino la reacción química entre una solución electrolítica como el agua salada o los flujos de animales y un electrodo de metal).

La experiencia de ambos autores despertó la curiosidad de la comunidad científica de principios del siglo XIX. En dicho momento, los estudios sobre la contracción muscular ganaron mucha popularidad y trajeron consigo la invención de todo tipo de instrumentos para tomar medidas y su experimentación. La inexistencia de tecnología específica obligaba a registrar los experimentos a ojo, dibujando y anotando toda la información que era posible observar a simple vista. Naturalmente, en dichas condiciones los registros dependían de lo certero que fuera el científico en sus valoraciones, por lo que el procedimiento se encontraba contaminado por la subjetividad. El final de esta práctica llega con la introducción del quimógrafo (Fig.2) inventado por el fisiólogo alemán *Carl Friedrich Wilhelm Ludwig* en 1840.

Con la introducción del quimógrafo se permitió medir, por primera vez, las contracciones musculares sin la implicación del ojo clínico de los científicos. Su funcionamiento era realmente sencillo: consistía en una varilla metálica muy fina que arañaba una cinta de papel ahumado mientras se iba enrollando en un cilindro que giraba lentamente. A la vez, el otro extremo de la varilla se ataba a la pata de una rana, por ejemplo; así, a cualquier movimiento de la pata, la varilla dibujaba un trazo en el papel que reflejaba la amplitud de la contracción. Era un aparato bastante rudimentario, pero los registros que se obtenían eran de una belleza inusual. Sin embargo, tenía el inconveniente de que el papel ahumado tenía una duración limitada y se estropeaban con mucha facilidad. Posteriormente, los primeros modelos se sustituyeron por sistemas basados en tinta.

Con la llegada de este invento, los científicos comenzaron a refinar los experimentos de Galvani y Volta y, poco a poco, surgirían nuevos estudios que desvelaban muchos de los aspectos que regulaban la contracción muscular y que ayudaron a asentar las bases de la fisiología y la farmacología moderna. Un ejemplo de ello, es el estudio sobre los efectos del curare de Claude Bernard (Saint-Julien Ródano, 1813) publicado en 1849.



**Figura 2 | Ilustración de un quimógrafo. Experimento de Claude Bernard.** Bernard registró las contracciones en las patas de rana en respuesta a la estimulación eléctrica para demostrar los efectos del curare. En el dibujo se observa un registro con indicaciones sobre la dirección en la que se mueve el papel.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Claude Bernard revolucionó con sus experimentos la medicina, la biología y la veterinaria de su época. Hasta tal punto, que en la actualidad, se le considera el fundador de la medicina experimental. Sus estudios animaron el interés por conocer los mecanismos de la contracción muscular y aumentaban las publicaciones con estudios cada vez más exhaustivos y con experimentos realmente ingeniosos. Sin embargo los ensayos en el laboratorio se complicaban y comenzaban a requerir mucho tiempo para su realización. Por aquel entonces, los investigadores sabían que los músculos solo se contraen si están vivos y que, tras sacrificar al animal, disponían de poco tiempo para estudiarlos. La solución a este problema vino con la aparición del baño de órganos, un sistema de incubación artificial que mantiene vivas las muestras de tejido y órganos enteros durante varias horas.

En líneas generales, un baño de órganos es un recipiente templado lleno de una solución fisiológica. El tejido se sumerge en dicha solución, la cual reproduce las condiciones de pH, oxigenación y nutrientes necesarios para mantenerlo vivo.

Los científicos determinaron que estas condiciones variaban en función del tipo de tejido y, con el tiempo, fueron creando fórmulas que imitaban distintos entornos intersticiales. Alguno de esos ejemplos son las soluciones de Frank S. Locke, Maurice V. Tyrode, Hans A. Krebs y Kurt Henseleit y Perfecto G. de Jalón.

Los baños de órganos y los quimógrafos se utilizaron, durante mucho tiempo, conjuntamente para la observación de la contracción muscular de tejidos y órganos aislados (Fig. 3). La combinación de ambas proporcionó resultados muy rigurosos y permitió completar estudios de gran importancia para la farmacología y la fisiología moderna. Concretamente, John R. Vane utilizó dicho sistema para estudiar la contracción de los vasos sanguíneos y descubrir la protasciclina y la relación del endotelio vascular con la coagulación sanguínea, para posteriormente explicar otros fenómenos como la acción antiagregante del ácido acetilsalicílico.



**Figura 3 | Fotografía de un baño de órganos y un quimógrafo.** En el tambor se observa el trazo que representa la contracción del tejido inmerso en la copa de vidrio.

Esta misma técnica también le sirvió a Robert F. Furchgott para descubrir el óxido nítrico (NO) y su liberación por parte del endotelio vascular, constatando que la acetilcolina no relajaba las arterias pre-contraídas con noradrenalina si estas carecían de endotelio. En ambos casos, los dos científicos recibieron el Premio Nobel por sus trabajos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



En la actualidad, los científicos continúan utilizando el baño de órganos para estudiar la acción contráctil de los fármacos en tejidos vivos y órganos aislados. Sin embargo, los antiguos quimógrafos han sido reemplazados por transductores electrónicos (Fig.4) conectados a un ordenador, de manera que los resultados obtenidos se calculan mediante programas informáticos.

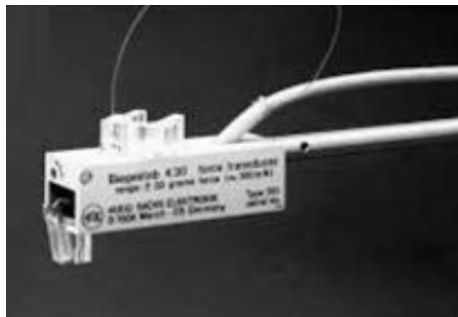


Figura 4 | Fotografía de un transductor electrónico. Modelo comercial de un transductor isométrico.

No obstante, los sensores electrónicos solo han mejorado la calidad y la precisión en el registro de las contracciones, mas no han solucionado demasiado las limitaciones del baño de órganos. El sistema en sí, continúa siendo muy rudimentario, y preparar un experimento con un número de muestras limitado requiere una inversión de tiempo y dinero elevado. A todo esto, hay que añadir que carece de capacidad de análisis suficiente para afrontar un cribado farmacológico a gran escala. A pesar de ello, a día de hoy, continúa siendo la única alternativa que permite llevar a cabo estudios sobre contracción muscular con muestras de tejido vivo.

## 1.2. El baño de órganos y los transductores electrónicos.

### *Sistema convencional de medida de contracción muscular en Farmacología.*

Generalmente, el baño de órganos y los transductores electrónicos se consideran como un único instrumento de medida para observar las contracciones musculares de pequeñas preparaciones de tejido ante diferentes estímulos, ya sean químicos o eléctricos. Combinando ambos elementos, se consigue un sistema completo que ofrece puede ofrecer abundante información sobre las propiedades farmacológicas de una determinada sustancia, así como un perfil de su posible toxicidad. De hecho, muchos experimentos y mediciones llevados a cabo con este sistema han sido cruciales para definir la interacción fármaco-receptor y han facilitado datos importantes en la formulación de la teoría fármaco-receptor y sus rutas de señalización intracelular. Actualmente, continúa siendo el método clásico utilizado para el estudio de nuevas moléculas y de nuevas funciones de moléculas ya conocidas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

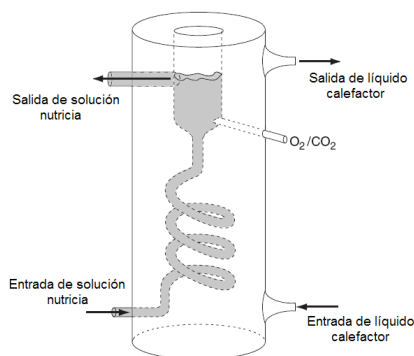
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

En esta sección se detallan las bases mínimas de funcionamiento de este sistema de medida, cómo se prepara, cómo se utiliza y cuáles son sus ventajas y desventajas como herramienta de estudio. Con ello se pretende mostrar la necesidad de plantear un nuevo instrumento más eficiente.

### 1.2.1. El baño de órganos convencional.

El baño de órganos consiste en una copa de vidrio templado llena de una solución fisiológica isotónica que remeda el fluido intersticial (Fig. 5). Las muestras se sumergen en este líquido, el cual le aporta nutrientes y le procura un entorno artificial con unas condiciones fisiológicas y químicas aproximadas a las que se dan en el interior del animal. Con ello, se consigue mantener vivas muestras de tejido durante unas horas. En este sistema, es sumamente importante controlar la temperatura de la solución, su pH y la saturación de O<sub>2</sub>.

Las copas se diseñan con las dimensiones suficientes para albergar todo tipo de mecanismos como soportes de anclaje para sujetar las muestras, electrodos de estimulación para estudios con músculo cardíaco y otros numerosos accesorios. Además, también incluyen conductos para renovar la solución nutritiva y para inyectar gases en el interior que burbujeen la solución con aire, oxígeno o carbógeno. Por otra parte, las copas se fabrican con una doble pared por donde circula agua templada. Con ello se consigue crear una cobertura térmica que envuelve el interior del recipiente y mantiene caliente la solución nutritiva (normalmente a unos 37°C). Esta agua se bombea desde un tanque exterior que dispone de un termostato ajustable para regular su temperatura.



**Figura 5 | Ilustración de copa para un baño de órganos.** Este diseño incluye un serpentín por donde fluye la solución nutritiva antes de llegar al interior de la copa. En el esquema se pueden ver las tuberías de entrada y salida para conectar el circuito de agua templada, la entrada y salida de solución nutritiva y la entrada de gas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## 1.2.2. Los transductores electrónicos.

### *Principios sobre la técnica de medida.*

En términos generales, un transductor es un dispositivo que traduce los cambios de una magnitud física, tales como fuerza, distancia y temperatura en variaciones de otra magnitud que resulte más fácil de monitorización más sencilla. En el caso concreto de los transductores electrónicos, los cambios en la magnitud a medir se traducen en variaciones de corriente eléctrica, que son fácilmente observables, almacenables y analizables con un ordenador si se cuenta con el equipo de acondicionamiento apropiado. En la actualidad, se utilizan tres tipos de transductores electrónicos para medir las contracciones de un tejido inmerso en un baño de órganos: isotónicos, auxotónicos e isométricos.

Los transductores isotónicos registran las contracciones midiendo el desplazamiento de un peso constante, que sube o baja de acuerdo con la fuerza que ejerce el tejido al contraerse (Figura 6A). Estos transductores adolecen de dos problemas: en primer lugar, ofrecen muy poca sensibilidad ante contracciones débiles que no superan la fuerza de fricción necesaria para desplazar el peso y, en segundo lugar, cometen un error significativo cuando los desplazamientos del peso son considerables, debido a que el sensor intenta linealizar lo que en realidad es un movimiento circular. Todo ello, unido al hecho de que ocupan mucho espacio de poyata, ha motivado que su uso sea muy reducido. Sin embargo, podrían considerarse una buena elección en aquellas preparaciones de músculo liso que conllevan bastante movimiento, como es el caso de los segmentos de intestino.

Por otra parte, los transductores auxotónicos tienen un funcionamiento muy parecido a los isotónicos, con la diferencia de que, en este caso, el peso se sustituye por un mecanismo tipo resorte (Fig. 6B). Este mecanismo ejerce una fuerza que se opone a la contracción del tejido y que varía gradualmente en proporción a la magnitud del desplazamiento. De esta manera, pueden medir tanto la fuerza de la contracción como la distancia de elongación. Teóricamente, este sistema de fuerzas opuestas se ajusta bastante al comportamiento natural de los tejidos. Sin embargo, no resulta muy fiable para medir contracciones con poco desplazamiento, como ocurre con pequeños anillos de aorta o de tráquea.

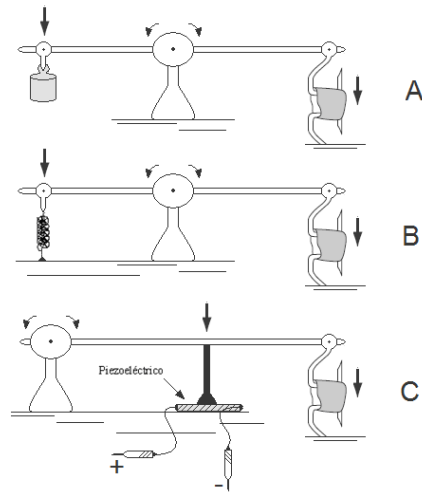
Actualmente, los transductores isométricos son los que mejores resultados ofrecen para una amplia variedad de tejidos. Únicamente miden fuerza y para ello utilizan materiales piezoeléctricos (Fig. 6C). El fenómeno piezoeléctrico consiste en la variación de las propiedades eléctricas que sufren ciertos materiales cuando se les aplica una fuerza mecánica que los deforma, ya sea aplastándolos o estirándolos. En principio, estos sensores trabajan sin desplazamiento, no obstante siempre existe una flexión muy pequeña cuando se deforma el material. Naturalmente, esta flexión conlleva un error en el valor de la fuerza a medir.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

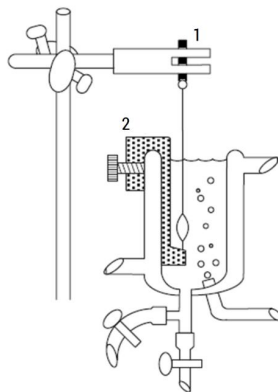
Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 6 | Ilustración que representa el funcionamiento de los tres tipos de transductores para medir contracciones en un baño de órganos. A) Transductor isotónico: Operan contra una fuerza constante. B) Transductor auxotónico: Operan contra una fuerza gradualmente mayor (tipo resorte). C) Transductor isométrico: Utilizan dispositivos piezoeléctricos.**

Por lo general, la mayoría de los transductores isométricos comerciales son de tipo piezo-resistivo. Esto quiere decir que su resistencia eléctrica varía en función de la fuerza mecánica que los deforma, como es el caso de las galgas extensiométricas. Estos sensores llegan a ser muy sensibles, y con los equipos de acondicionamiento de señal apropiados, pueden medirse contracciones de unos pocos mN.

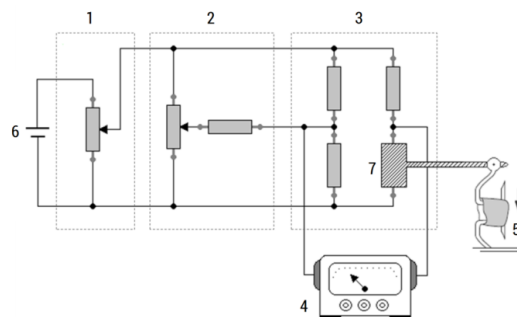


**Figura 7 | Ilustración que representa el montaje de un transductor piezoresistivo para medir la contracciones de un tejido sumergido en un baño de órganos. Un extremo de la muestra se ata al sensor (1) mediante un hilo de algodón. Su otro extremo se ancla al holder (2). Cuando el tejido se contrae, tira del sensor y este cambia su resistencia eléctrica.**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

La técnica empleada para medir contracciones con este tipo de transductores es muy sencilla. En primer lugar se ata el extremo de un hilo al cabezal sensible del dispositivo. Seguidamente, el otro extremo del hilo se ata al tejido con pequeños ganchos de metal o plástico. Por lo general, suele utilizarse hilo de algodón. Finalmente, la muestra se ancla en un accesorio (comúnmente conocido como *holder*) que la mantiene sujeta en el interior de la copa. De este modo, cuando el tejido se contrae, tira del transductor a través del hilo y este sufre un alargamiento que hace variar su resistencia eléctrica (Fig. 7).

A continuación, un circuito electrónico, conocido como puente de *Wheatstone* (Fig. 8), traduce estos cambios de resistencia en una señal diferencial de tensión eléctrica. Sin entrar en detalles, un puente de *Wheatstone* consiste en dos divisores de tensión conectados en paralelo (Fig. 8 ítem 3). Uno de los divisores está formado por resistencias de valor fijo, de manera que el voltaje de su salida resulta constante de acuerdo con la relación de las resistencias. El segundo divisor incluye otra resistencia de valor fijo conectada en serie con el transductor piezoresistivo. Así, el voltaje de su salida varía en función de los cambios en la relación de resistencias que provoca el tejido cuando se contrae. Como resultado, la señal de salida final se obtiene al tomar la diferencia de tensión existente entre ambos divisores.



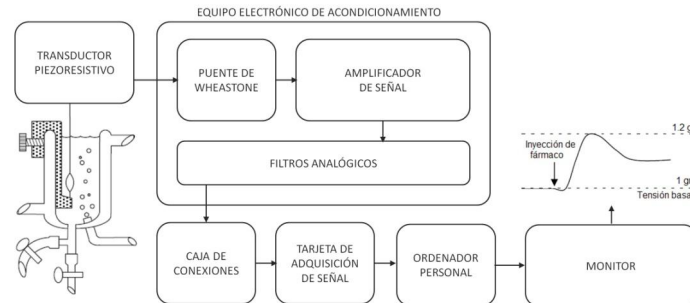
**Figura 8 | Esquema eléctrico de un puente de *Wheatstone* completo.** (1) Módulo de ganancia o sensibilidad. Ajusta la máxima amplitud que puede tomar la señal de salida del puente. (2) Módulo de balanceo. Ajusta el voltaje de referencia del puente. (3) Puente de *Wheatstone*. Traduce las variaciones de resistencia del transductor en una señal diferencial de tensión eléctrica. (4) Voltímetro. Mide la diferencia de voltaje que existe entre los terminales de salida del puente. (5) Muestra de tejido. (6) Fuente de alimentación. (7) Representación del elemento piezoresistivo del transductor.

En algunos casos, el puente de *Wheatstone* también incluye un potenciómetro de balanceo (Fig. 8 ítem 2) y otro de ganancia (Fig. 8 ítem 1). Con el balanceo se consigue manipular el voltaje de salida del divisor de referencia, lo que permite desplazar la línea base de la señal de salida. Por otro lado, ajustando el potenciómetro de ganancia se logra manipular la tensión de alimentación del puente, definiendo así el voltaje máximo que puede alcanzar la amplitud de la señal de salida.

Por lo general, las contracciones suelen ser muy débiles, así que las oscilaciones en la amplitud de la señal también son bastante pequeñas. En consecuencia, resulta casi imposible observar el comportamiento del tejido sin un equipo de amplificación adecuado que aumente la sensibilidad de todo el conjunto. Al mismo tiempo, la señal suele ir acompañada de interferencias y otros ruidos que podrían afectar gravemente a la hora de interpretar la respuesta contráctil. Por esta razón, además de

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

amplificar, los equipos también incluyen una etapa de filtros para eliminar todos esos componentes no deseados. En este sentido, existe una controversia entre si amplificar primero y luego filtrar o viceversa. Teóricamente, el resultado debería ser el mismo, pero desde el punto de vista de la implementación *hardware*, muchos autores discrepan sobre los resultados entre una configuración y otra.



**Figura 9 | Diagrama de bloques que representa el equipamiento mínimo para registrar las contracciones con transductores piezoresistivos.**

Una vez que la señal está acondicionada, una tarjeta de adquisición de datos la convierte a formato digital. En este punto, es importante que la tarjeta de adquisición tenga una buena resolución de conversión. Así, se consigue una representación muy aproximada de la señal analógica. El inconveniente consiste en que a mayor resolución, mayor es el precio de las tarjetas.

Así mismo, hay ocasiones en las que también es necesario utilizar una caja de conexiones para adaptar el conector de salida del equipo de acondicionamiento, normalmente son de tipo BNC (*British Navy Connector*), con el conector de entrada de la tarjeta de adquisición, donde suele usarse un cable-cinta. Por último, la tarjeta de adquisición se conecta con un ordenador, donde un programa informático recibe los datos, los procesa y los presenta en el monitor. En la Figura 9 se presenta un diagrama de bloques que resume el equipamiento mínimo necesario para monitorizar las contracciones con transductores piezoresistivos.

### 1.2.3. Preparación de los experimentos.

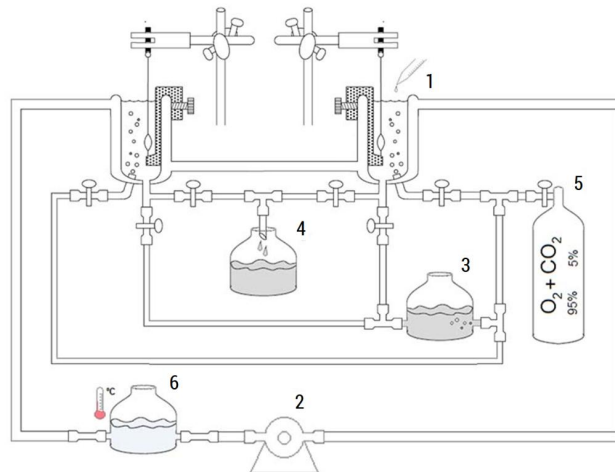
En este apartado se presenta una descripción sobre el procedimiento habitual en la preparación de experimentos utilizando el baño de órganos y transductores electrónicos. De esta manera, se podrá valorar más adelante, el ahorro de tiempo y de trabajo que supone el nuevo instrumento MuWOB.

Particularmente, se presta especial interés en explicar el montaje básico de un baño de órganos con sensores de fuerza, así como la forma de preparar las muestras de tejido correctamente. En adelante, solo se comentará la manera de proceder con secciones de tejido que tienen forma de anillo, como es el caso de cortes transversales de vasos sanguíneos, intestinos o tráquea. Los detalles acerca

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

de la preparación de otro tipo de muestras no tienen apenas relevancia para este proyecto de tesis por dos razones: en primer lugar, los anillos son el tipo de preparación más frecuente para realizar estudios farmacológicos sobre actividad contráctil y, en segundo lugar, el instrumento MuWOB está especialmente diseñado para medir contracciones en muestras que presentan esta forma en particular.

Lo primero para preparar un experimento con el baño de órganos es seleccionar las copas con el volumen deseado y colocarlas sobre un soporte firme y estable, procurando siempre que resulten bien sujetas y que estén niveladas. Luego, a pocos centímetros por encima, se colocan los transductores, uno por copa y bien sujetos. La cantidad de copas y sensores a preparar dependerá del número de experimentos en paralelo que vayan a realizarse.



**Figura 10 | Esquema simplificado de un baño de órganos.** (1) Copa de vidrio: recipiente donde se mantiene el tejido sumergido en solución nutritiva. (2) Bomba: impulsa el agua caliente para que fluya por todo el circuito de calefacción. (3) Reservorio: contiene solución nutritiva lista para ser vertida en el interior de la copa. (4) Recipiente de desecho: recibe la solución nutritiva que se desecha al hacer un lavado del medio o al vaciar la copa. (5) Botella de gas: contiene carbógeno, aire y oxígeno para oxigenar la solución nutritiva contenida en el reservorio y en la copa. (6) Tanque de agua templada: En su interior dispone de un termostato que permite ajustar la temperatura del agua.

A continuación se vierte agua suficiente en el tanque de calefacción (Fig. 10 ítem 6), se ajusta el termostato a la temperatura deseada y se pone en marcha la bomba (Fig. 10 ítem 2) que impulsa el agua por todo el circuito. Hecho esto, se conectan las mangueras que llevan el gas hasta las copas. Seguidamente, se llenan las copas de solución abriendo la válvula del repositorio (Fig. 10 ítem 3) y luego se ajusta el regulador de gases (Fig. 10 ítem 5) hasta conseguir el burbujeo deseado. Mientras el sistema se estabiliza, se preparan las muestras de tejido.

La manera de preparar los tejidos va a depender del tipo de experimento y del tipo de órgano a utilizar en el estudio. No obstante, se pueden definir tres fases generales para todos los experimentos: extracción del órgano y preparación de las muestras, montaje en el baño de órganos y estabilización.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

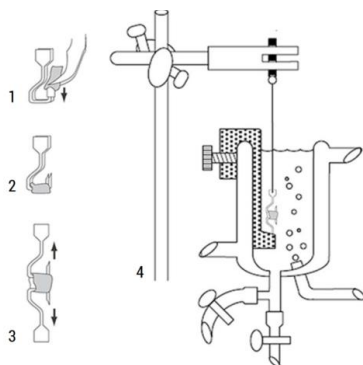
Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

La primera fase comienza con el sacrificio y disección del animal. Una vez identificado el órgano, se procede a extirparlo y se coloca en una *placa de Petri* con solución nutritiva oxigenada y a temperatura ambiente. Con mucho cuidado, se limpia la preparación y se elimina el tejido superfluo para facilitar el acceso al fármaco y, en su caso, reducir la impedancia eléctrica. Seguidamente, el órgano se corta en pequeñas muestras. El tipo de corte dependerá del montaje que se vaya a realizar. Como ya se ha dicho, en este caso, solo se hablará sobre el procedimiento a seguir para muestras con forma de anillo, como por ejemplo, el corte transversal de una arteria.

Para montar este tipo muestras en el interior de las copas, se utilizan dos pequeños ganchos con forma de ele. Realmente, el montaje es sencillo, pero requiere de paciencia, tiempo y delicadeza, ya que las secciones apenas tienen tres milímetros de grosor y son sumamente frágiles. En primer lugar, los ganchos se introducen por la luz del anillo de tejido (Fig. 11 ítem 1 y 2) y luego se abren en direcciones opuestas (Fig. 11 ítem 3). Luego, uno de los ganchos se ancla en un soporte de fijación o *holder*, y al otro se le ata un hilo de unos pocos centímetros por el extremo. A continuación, se sumerge el *holder*, con la muestra anclada, en el interior de la copa y se ata el hilo al cabezal sensible del sensor (Fig. 11 ítem 4). Finalmente, se aplica una tensión basal (entre 0,5 - 1g dependiendo del tejido) mediante un tornillo micrométrico.



**Figura 11 | Ilustración sobre el montaje de un anillo de tejido.** (1) Se introduce el anillo en los ganchos. (2) Se coloca el anillo en la posición correcta. (3) Se abren los ganchos en direcciones opuestas. (4) Se atan los extremos al *holder* y al sensor con un hilo. Luego se sumerge todo el conjunto en el interior de la copa.

Una vez montados todas las muestras en sus respectivas copas, es necesario esperar algunos minutos para que los tejidos se estabilicen. Si fuera necesario, durante este periodo, se aplican lavados abriendo la válvula del repositorio y dejando fluir solución nutritiva limpia hacia las copas. Llegado a este punto, se ponen en marcha los equipos de acondicionamiento de señal y el ordenador con el programa informático de registro. En cuanto las preparaciones se hayan estabilizado, se reajusta la tensión basal al nivel deseado. A partir de este momento, queda todo listo para comenzar con el experimento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



#### 1.2.4. Desventajas.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con el baño de órganos y los transductores electrónicos, el trabajo de experimentación con este sistema está supeditado a una serie de limitaciones que condicionan la labor del investigador (Díaz-Martín, D. et al., 2015; Borges, R. et al., 2016). En general, dichas restricciones frenan el ritmo de las investigaciones y repercuten en un consumo elevado de recursos y tiempo. Según los científicos del Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis de la Universidad de La Laguna, los principales inconvenientes son:

- a) El uso de transductores electro-mecánicos requiere de ganchos de sujeción que producen alteraciones reológicas en los tejidos y, con frecuencia, los dañan; como suele ocurrir con el endotelio de los vasos sanguíneos (capa de células que recubre el interior de los vasos) o el epitelio ciliado de las vías aéreas, que tienen una implicación importante en la relajación del músculo liso. La preservación de los epitelios de revestimiento puede no ser de vital importancia en determinados experimentos, sin embargo, para otros, es fundamental que permanezca intacto.
- b) La preparación de experimentos es un trabajo tedioso y muy delicado. Por cada una de las copas ha de sujetarse el tejido al *holder* y engancharlo al transductor. Como ya se ha comentado, dicha labor requiere de mucha paciencia y concentración por parte del investigador, ya que el espesor de las muestras apenas supera unos pocos milímetros.
- c) La compra de un baño de órganos con transductores electrónicos supone una inversión económica elevada. Las copas de baño, los sensores, equipos de amplificación, termostatos y demás elementos no son equipos baratos y los laboratorios pequeños o medianos no pueden asumir el coste de varios sistemas en paralelo.
- d) La instalación y puesta en marcha de este sistema en el laboratorio es una labor compleja, y se complica a medida que se añaden más copas de baño. Asimismo, una instalación típica de unas pocas copas ocupa mucho espacio de poyata y requiere un área de trabajo con gran amplitud para operar cómodamente. De igual modo, la limpieza y mantenimiento del sistema conlleva mucho tiempo, especialmente si se dispone de varias copas.
- e) El número de análisis simultáneos posibles está limitado por la cantidad de copas que incluye la instalación. El total de copas no suele ser muy elevado por razones de coste, falta de espacio o incomodidad para trabajar. Dichas circunstancias ralentizan las investigaciones y suponen sacrificar animales para solo utilizar unas pocas muestras. Este desaprovechamiento de los animales incumple con la estrategia de las 3R para la experimentación animal (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) y supone una notable inversión económica.
- f) Por lo general, la cantidad total de producto requerido para conducir un análisis farmacológico en un baño de órganos, aún con copas de pequeño volumen (4-5mL), con frecuencia es mayor que la cantidad que un investigador dispone (a veces menos de 1mg).
- g) Durante el ensayo, los fármacos se añaden copa a copa de manera manual y con una pipeta simple. Es imposible la inyección de líquidos en paralelo con pipetas multicanal o la automatización del manejo de líquidos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

- h) La muestra de tejido ha de ser lo suficientemente gruesa como para poder llevar a cabo su manipulación. Igualmente, una vez montado en la copa, ha de permanecer sujeto y sin romperse. Todo esto supone cortar secciones con un grosor mayor que el mínimo necesario para completar un estudio farmacológico. Obviamente, esto aumenta el consumo de tejido, lo que implica el sacrificio de más animales y un peor aprovechamiento de los órganos con su correspondiente incremento económico.
- i) Finalmente, a la hora de evaluar la actividad contráctil del fármaco, la dispersión de datos es relativamente alta debido al número limitado de experiencias simultáneas que pueden llevarse a cabo con este sistema.

A pesar de todos estos inconvenientes, los laboratorios de Farmacología y Fisiología siguen utilizando el baño de órganos y los transductores electromecánicos para estudiar la actividad contráctil en tejidos, pues hasta la fecha no se disponía de una alternativa.

### 1.2.5. Baño de órganos del Laboratorio de Farmacología del IUBO-AG de la ULL.

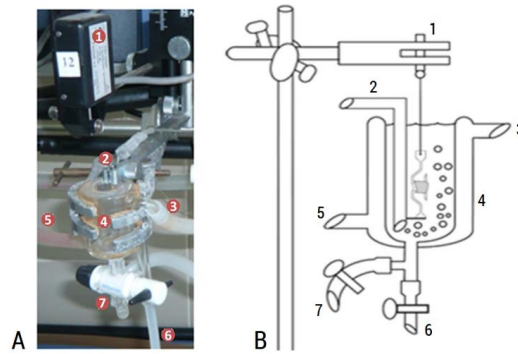
En el Laboratorio de Farmacología del Instituto Universitario de Bio-Órgánica Antonio González se encuentra el mayor sistema en paralelo de baño de órganos de Canarias (Fig. 12). Su instalación cuenta con 16 copas, por lo que permite realizar ese número de análisis en paralelo.

Las copas tienen un volumen de 4mL y su forma es bastante parecida a las ilustraciones de los apartados anteriores. La diferencia más significativa está en el conducto por donde se suministran los gases al interior. En este caso, los investigadores han ideado un pequeño accesorio en forma de tubo que conectan directamente a la válvula reguladora por medio de una manguera. Este accesorio, además de servir para administrar el gas, también lo usan de soporte para sujetar los tejidos (Fig. 13A y 13B ítem 2). Los ganchos que utilizan para ello son de acero inoxidable, tienen forma de L y una sección aproximada de 2 milímetros. Por otra parte, la calefacción de las copas se realiza a través de una red de tuberías por las que bombean agua templada.



Figura 12 | Fotografía del baño de órganos instalado en el laboratorio de Farmacología del Instituto Universitario de Bio-Órgánica Antonio González de la Universidad de La Laguna. (1) Monitor. (2) Tanque de calefacción de agua. (3) Copas de vidrio. Dispone de un total de 16. (4) Equipos de acondicionamiento de señal y ordenador. (5) Válvula reguladora de gases. (6) Botella de gas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 13 | Montaje de una muestra de tejido en el baño de órganos del Laboratorio de Farmacología de la Universidad de La Laguna. A) Fotografía del montaje de una muestra:** (1) Sensor de fuerza. (2) Conducto de entrada de gas carbónico. (3) Entrada de agua templada. (4) Copa de vidrio. (5) Salida de agua templada. (6) Entrada de solución nutriticia. (7) Salida de solución nutriticia. **B) Ilustración del montaje de una muestra con el soporte fabricado por los propios investigadores del laboratorio:** (1) Sensor de fuerza. (2) Conducto de entrada de gas carbónico. (3) Entrada de agua templada. (4) Copa de vidrio. (5) Salida de agua templada. (6) Entrada de solución nutriticia. (7) Salida de solución nutriticia.

Las contracciones se miden con 16 transductores isométricos modelo Tri202P (Panlab, Barcelona, España) y el equipo de acondicionamiento de señal CANSBRIDGE-16 (Fig. 14 ítem 3), que desarrolló el Servicio de Electrónica de la Universidad de La Laguna. Este equipo dispone de 16 canales, uno por sensor, que filtran y amplifican la señal de los transductores en un rango de  $\pm 10V$ . A continuación, las salidas del CANSBRIDGE-16 se digitalizan con una tarjeta de adquisición conectada al ordenador. Finalmente, las contracciones se registran con el programa LabChart Pro (Fig. 15, ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda).

Esta instalación es un claro ejemplo de lo complejo que resulta montar un baño de órganos. Como se puede ver, para tan solo 16 copas, todo el conjunto ocupa muchísimo espacio en el laboratorio y además, los materiales necesarios no son económicos. Por esta razón, los laboratorios medianos y pequeños suelen optar por una instalación más discreta con 4 o 6 copas a lo sumo.



**Figura 14 | Sistema de registro del laboratorio de Farmacología de la Universidad de La Laguna.** (1) Ordenador. (2) Tarjeta de adquisición de señal. (3) Equipo de acondicionamiento de señal de 16 canales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

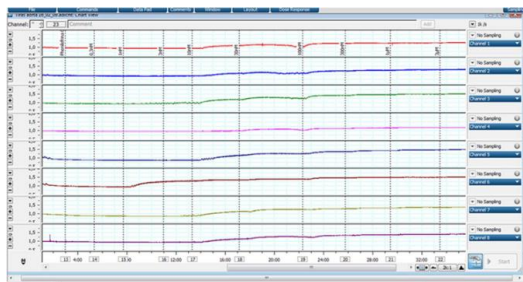


Figura 15 | Entorno gráfico del programa Labchart Pro.

### 1.3. El instrumento Multi-Well Organ Bath (MuWOB)

*Un nuevo sistema de medida de contracción muscular*

El Multi-well Organ Bath (MuWOB) es un innovador y validado sistema de medida en la experimentación con tejidos vivos (Díaz-Martín, D. et al., 2015; Hernández-Jiménez, J.G., 2015; Borges, R. et al., 2016; Universidad de La Laguna, 2014), cuya finalidad es dar soluciones a las limitaciones que presenta en la práctica el baño de órganos que actualmente se utiliza, aportando mayor versatilidad, sin menoscabo en la rigurosidad de los resultados.

El MuWOB permite realizar estudios farmacológicos sobre actividad contráctil en rebanadas de algunos tejidos empleando placas multipocillos como base de pruebas. En contraposición con el sistema de medida tradicional, presenta una capacidad de análisis muy superior.

Con la utilización de las placas multipocillos, se pretende crear las mismas condiciones de viabilidad que en el baño de órganos convencional, pero reemplazando la utilización engorrosa y compleja del sistema de copas por dichas placas, mucho más prácticas. Por otra parte, el uso de las mismas para el registro de actividad contráctil imposibilita el montaje de transductores isométricos, que se solventa con la introducción de un sistema de adquisición de imágenes y un algoritmo de análisis de imagen basado en técnicas de visión por computador y fotogrametría.

#### 1.3.1. El baño de órganos multipocillos.

*Un concepto innovador.*

En los últimos años, las placas multipocillos se han popularizado para multitud de procesos en el laboratorio. También se han convertido en una herramienta indispensable para el cribado masivo de sustancias de interés farmacológico. Básicamente, estas placas consisten en una matriz de recipientes tubulares, denominados comúnmente pocillos, que sirven de base de pruebas para realizar múltiples experimentos en paralelo.

Las placas multipocillos se fabrican todas con las mismas dimensiones estándar, 127 x 85 milímetros, y actualmente el mercado ofrece una amplia variedad donde elegir: placas con pocillos de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

fondo plano y en forma de *uve*, de color negro, blanco y transparente, fabricadas en plástico, vidrio, polímeros e incluso con materiales de filtración, y muchas opciones más. Naturalmente, usar un tipo u otro, dependerá de las características que requiera el experimento en cuestión.

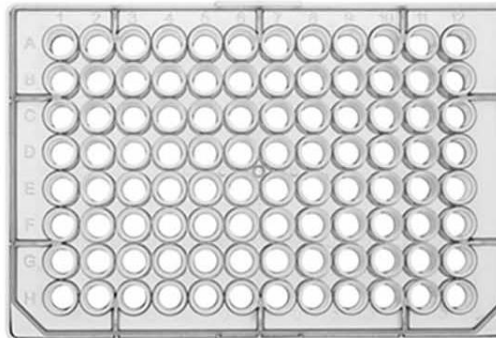


Figura 16 | Fotografía de una placa multipocillos de 96 pocillos.

En este proyecto se ha utilizado una placa de 96 pocillos de fondo plano y con un volumen de 350  $\mu$ L, transparente y fabricada en poliestireno (Fig. 16). La única modificación que se hizo a la placa fue pintarla por el revés con pintura negra mate para conseguir un mayor contraste de color entre el fondo de los pocillos y los tejidos.

La idea es que cada pocillo de la placa sea el equivalente a una copa del baño de órganos convencional y puedan utilizarse, por tanto, como pequeños soportes biológicos donde mantener vivos los tejidos en condiciones de nutrientes, pH, oxigenación y temperatura óptimas.

Normalmente, en el baño de órganos convencional se suele emplear la solución Krebs-bicarbonato, que utiliza como tampón el bicarbonato + CO<sub>2</sub> suministrado por el burbujeo constante de gas carbónico para mantener el pH. Sin embargo, el reducido tamaño de los pocillos imposibilita la introducción de un conducto para oxigenar el interior. El problema se soluciona cambiando la solución nutritiva por una composición Krebs-HEPES, que tiene HEPES como tampón para mantener el nivel de pH sin necesidad de burbujear la solución. Además, la relación superficie/volumen de las placas multipocillos facilita el intercambio gaseoso lo suficiente para mantener funcionales tejidos como la aorta y la tráquea con pocas demandas de oxígeno (Hernández-Jimenez, J.G., 2015; Borges, R. et al., 2016).

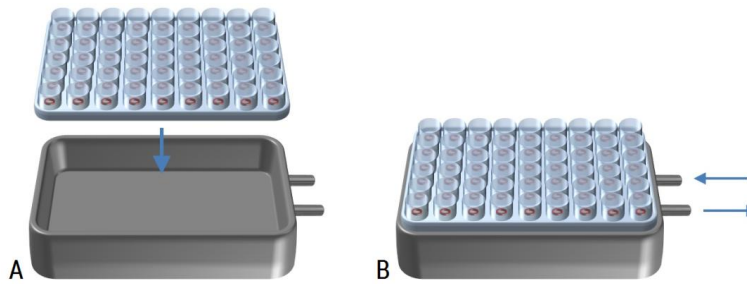
Por otra parte, para mantener atemperados los tejidos, la placa multipocillos se coloca sobre un recipiente rectangular, sellando la unión entre ambos con silicona y dejando solo dos conductos de acceso a la cavidad interior resultante (Fig. 17). Luego, esta cavidad se llena con agua propulsada continuamente desde un tanque exterior con termostato ajustable.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

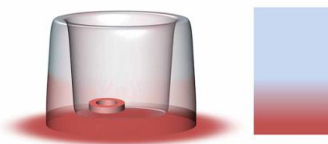
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 17 | Ilustración 3D del sistema de calefacción para la placa multipocillos. A)** Montaje: La placa multipocillos se apoya en el borde del recipiente rectangular. Luego se sellan las uniones con silicona. **B)** Sistema de calefacción montado: A través de los conductos de entrada y salida circula agua caliente por el interior de la cavidad.

Para evaluar la efectividad de este sistema de calefacción se llevó a cabo un estudio donde se ajustó la temperatura del agua circulante a 38°C y luego se midió la temperatura de la solución nutritiva contenida en cada pocillo. Primero con una sonda y luego una cámara de infrarrojos. Con la sonda, se comprobó que la temperatura media en el interior de los pocillos es de  $29,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , registrando máximos de  $30,9^\circ\text{C}$  y mínimos de  $27,6^\circ\text{C}$ . Por otro lado, con la cámara de infrarrojos la temperatura media es de  $33,8 \pm 0,4^\circ\text{C}$ , con máximos de  $34,8^\circ\text{C}$  y mínimos de  $31,6^\circ\text{C}$ . De acuerdo con los resultados, la calefacción de la placa multipocillos no es uniforme, y además, se observó que los pocillos de la zona central mantienen una temperatura más estable que los situados en los bordes de la placa. Por otro lado, los datos revelan que el interior de los pocillos no alcanza la temperatura que se pretende.

Estos problemas se deben a la forma de la placa multipocillos que se utiliza. Las placas con pocillos de fondo plano se fabrican de tal manera que el agua caliente circulante no puede envolverlos, y la solución no se calienta de igual modo que en las copas de vidrio con doble pared. En este caso, el calor se transfiere del agua a la solución nutritiva únicamente a través del fondo de los pocillos (Fig. 18), y esto no es suficiente. La solución más inmediata está en utilizar otro modelo de placa, pero todas las que tienen pocillos de fondo plano se fabrican de igual manera.



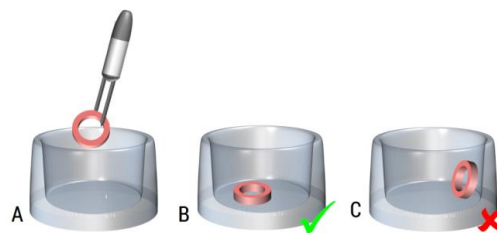
**Figura 18 | Ilustración 3D de la distribución del gradiente de temperaturas en el interior de los pocillos.** Los colores representan una escala de temperatura arbitraria de más caliente (rojo) a más frío (azul), puramente a efectos demostrativos.

Por consiguiente, se determinó empíricamente la temperatura que debe tener el agua circulante para que el interior de los pocillos alcance una temperatura suficiente para que los tejidos reaccionen sin que lleguen a cocerse. Después de analizar varios experimentos con anillos de aorta de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

rata, se concluye que el agua circulante debe mantenerse en torno a los 39°C. Además, se logró mejorar la eficiencia térmica del sistema rellenando con agua el espacio existente entre pocillos.

En cuanto a la preparación de los experimentos, el tratamiento que reciben los tejidos antes de montarlos en el baño de órganos es un proceso que no depende del sistema a utilizar, ya sea que se emplee el baño de órganos tradicional o MuWOB. En ambos casos, hay que extirpar el órgano, limpiarlo y contarlo en secciones (Blattner, R. et al., 1978). Es en el montaje donde reside una de las principales diferencias entre los dos sistemas. En las placas multipocillos, las muestras de tejido se colocan individualmente en sus respectivos pocillos con ayuda de unas pinzas (Fig. 19A), manteniéndose sumergidos por sí solos y sin necesidad de tener que anclarlos ni engancharlos a ningún *holder* o sensor de medida (Fig. 19B). Naturalmente, este montaje tan sencillo reduce enormemente el tiempo de preparación y además, evita manipulaciones indebidas sobre las muestras. No obstante, hay que obrar con precaución a la hora de administrar los fármacos, pues al no estar sujetos, los tejidos pueden girarse y resultar en una posición desde la que resulte imposible registrar las contracciones (Fig. 19C).



**Figura 19 | Ilustración 3D sobre la colocación de los anillos de tejido en el interior de los pocillos. A)** Introducción del tejido con unas pinzas. **B)** Anillo colocado en la posición correcta. **C)** Anillo en posición incorrecta.

### 1.3.2. Visión por computador y fotogrametría.

#### *La nueva técnica de medida.*

La idea de implementar un método de medida basado en el análisis de imágenes para registrar las contracciones de los tejidos surge como solución a dos problemas principalmente: evitar medios invasivos como los transductores isométricos y analizar simultáneamente muchas preparaciones de manera rápida, cómoda y económica.

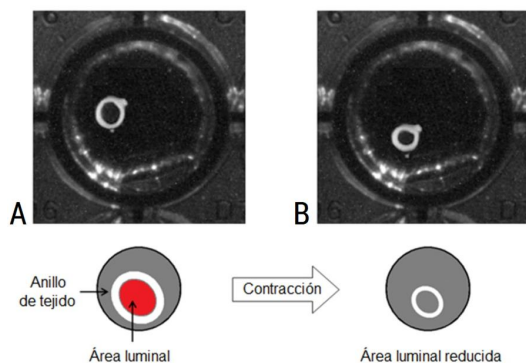
Cuando un anillo de tejido se contrae por el efecto de un fármaco, su área luminal experimenta una reducción gradual de tamaño. Estos cambios son observables incluso a simple vista (Fig. 20A y 20B). El nuevo sistema va tomando fotografías de los anillos cada cierto tiempo y durante todo el experimento. Con cada nueva fotografía, un *software* mide el tamaño del área interior de cada uno de los anillos, aplicando técnicas de reconocimiento de objetos y fotogrametría a las imágenes. Así, el análisis de la secuencia completa de fotografías revela la respuesta de las muestras y permite valorar el efecto del fármaco (Díaz-Martín, D. et al., 2015).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

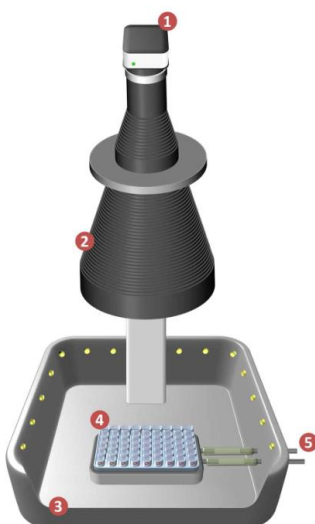
Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 20 | Representación de la contracción de un anillo de tejido.** A) Fotografía de un anillo de aorta de rata sin contraer. B) Fotografía del mismo anillo contraído tras inyectar una dosis de fármaco vasoconstrictor. Imagen tomada del artículo Díaz-Martín, D. et al., 2015.

Al margen de la complejidad del *software* que procesa las imágenes, el sistema MuWOB solo necesita una cámara digital (Fig. 21 ítem 1), preferiblemente de alta resolución, una lente bi-telescéntrica (Fig. 21 ítem 2), y una pequeña plataforma de observación bien iluminada donde colocar el baño de órganos mutilpocillos y montar todo (Fig. 21 ítem 3).



**Figura 21 | Ilustración 3D del sistema de registro de MuWOB.** (1) Cámara digital. (2) Lente telescéntrica. (3) Plataforma de observación. (4) Baño de órganos multipocillos. (5) Conductos para la entrada y salida de agua caliente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



### 1.3.2.1 Cámara digital

Para este proyecto se ha seleccionado una cámara digital de la serie USB uEye LE (IDS Imaging Development System GmbH, Obersulm, Alemania). Concretamente, el modelo UI-1490LE-HQ (Fig. 22). Esta cámara a color se controla vía USB 2.0 e incorpora un sensor de tecnología CMOS de  $\frac{1}{2}$ " y algo más de 10 Megapíxeles de resolución (10.598.400 píxeles en total) distribuidos en una matriz de 3840 x 2760. Según su fabricante, esta serie de cámaras están especialmente recomendadas para microscopía y tecnología biomédica de imagen. Puede emplearse cualquier otra cámara, siempre y cuando exista la posibilidad de controlarla por USB 2.0 desde un ordenador y tenga la resolución suficiente para detectar cambios sutiles en la forma y tamaño de los anillos de tejido.



**Figura 22 | Fotografías de la cámara USB uEYE LE modelo UI-1490LE-HQ.** Puede consultar más características técnicas de este dispositivo en [ids-imaging.com](http://ids-imaging.com).

### 1.3.2.2. Objetivo bi-telecéntrico.

La fotogrametría consiste en medir la geometría de objetos y su posición en el espacio a partir de imágenes. Por tanto es fundamental evitar fotografías con distorsión o aberraciones que afecten al proceso y falsifiquen las medidas. Los brillos intensos, sombras y reflejos que muchas veces se interponen en las fotografías pueden reducirse con un buen sistema de iluminación. Sin embargo, las distorsiones de la imagen asociadas a la perspectiva y a la óptica de la cámara necesitan una solución diferente.

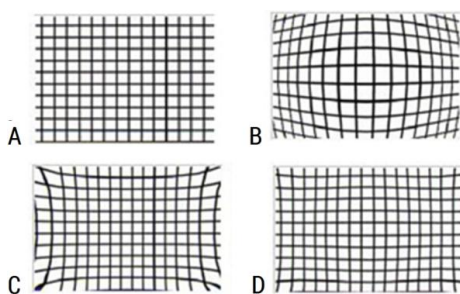
En una imagen, se entiende por distorsión la alteración de la forma o las proporciones reales. En este sentido, la mayoría de los objetivos convencionales curvan las líneas rectas de una fotografía hacia fuera (Fig. 23B, efecto barril) o hacia dentro (Fig. 23C, efecto cojín) dependiendo de si su distancia focal es más corta o más larga respectivamente. Existe también la llamada distorsión compleja, llamada así porque empieza en los extremos como si fuera de cojín y hacia el centro es de barril (Fig. 23D). En óptica, esos efectos se conocen como distorsión esférica.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

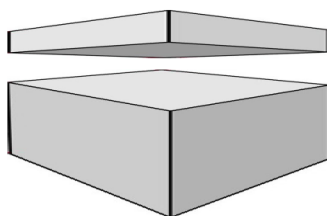
Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 23 | Representación de la distorsión esférica en imágenes. A) Sin distorsión. B) Distorsión de barril. C) Distorsión de cojín. D) Distorsión compleja.** Imagen adaptada del artículo Domínguez-Lavín, A., 2011.

Por otro lado, está la distorsión debida a la perspectiva, que es un efecto natural y nada tiene que ver con el objetivo o la cámara. En este otro caso, la alteración de las formas y proporciones de la imagen la produce la distancia y el ángulo desde donde se toma la fotografía (Fig. 24).

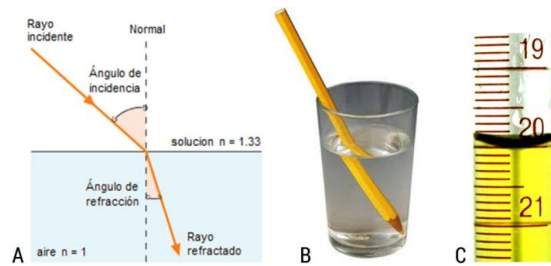


**Figura 24 | Representación de la distorsión de perspectiva en imágenes.** Al observar un objeto desde diferentes ángulos, su forma y proporciones son diferentes a la realidad. Imagen adaptada del artículo Galois-Cacua, G., 2015.

Otro de los problemas son los efectos de la refracción. En términos generales, la refracción es un fenómeno óptico que consiste en un cambio en la dirección de propagación de la luz al pasar de un medio a otro con diferentes densidades (Fig. 25A). En el caso del MuWOB, la luz viaja desde la solución salina (índice de refracción  $\approx 1,33$ ) hasta la cámara, que está en el aire (índice de refracción =1). Desde el punto de vista de la cámara, este cambio de ángulo en la dirección de la luz altera las proporciones de la imagen de los anillos. Este fenómeno se observa fácilmente al introducir un lápiz en un vaso transparente lleno de agua (Fig. 25B). Si el lápiz se mira desde fuera del vaso, comprobará que las proporciones no corresponden a las medidas reales.

Por otro lado, en cada pocillo la superficie de la solución nutritiva experimenta una curvatura cóncava conocida como menisco (Fig. 25C). Esto ocurre debido a que las fuerzas de adhesión entre las moléculas de la solución salina y las paredes de pocillo son mayores que las fuerzas de cohesión del líquido. Desde el punto de vista óptico, este menisco se comporta como una lente e introduce cierta ganancia en el sistema óptico, por lo que también contribuye en la alteración de las proporciones de la imagen.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 25 | Efectos ópticos perjudiciales para la medida de los anillos. A)** Diagrama de rayos de la refracción. **B)** Ejemplo de alteración de las proporciones de un objeto por efecto de la refracción. **C)** Ejemplo de un menisco formado por una solución salina contenida en una probeta.

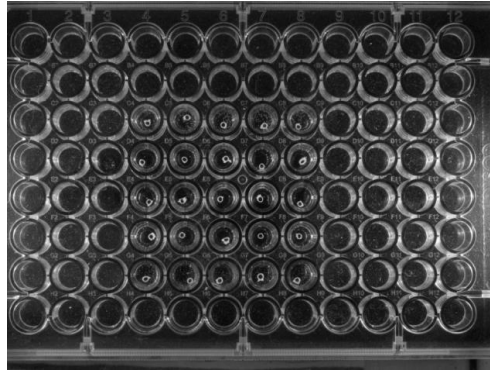
Para cuantificar el alcance de estas perturbaciones en la medida del área interior de los tejidos se utilizó una placa de 96 pocillos y anillos de metal idénticos con un lumen de  $7,1\text{mm}^2$ . Con el programa *MuWOB Software* se tomó una fotografía de los anillos en seco (sin solución), luego con  $100\mu\text{L}$  de solución y una última con  $200\mu\text{L}$ .

El programa devolvió valores de área diferentes al medir el mismo anillo sin solución, con  $100\mu\text{L}$  y  $200\mu\text{L}$ . Estos resultados muestran que los diferentes volúmenes de solución añaden una ganancia óptica distinta en cada caso, por lo que la cantidad de líquido a utilizar influye directamente en la medida del área interior de los anillos. La tabla 1 muestra la relación  $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$  obtenida en las diferentes experiencias.

Volumen ( $\mu\text{L}$ )	0	100	200
$\mu\text{m}^2/\text{pixel}$	$1010,5 \pm 8,6$	$1167,1 \pm 11,7$	$1062,1 \pm 19,8$

Tabla 1 | Relación  $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$  (media  $\pm$  sem) con objetivo convencional.

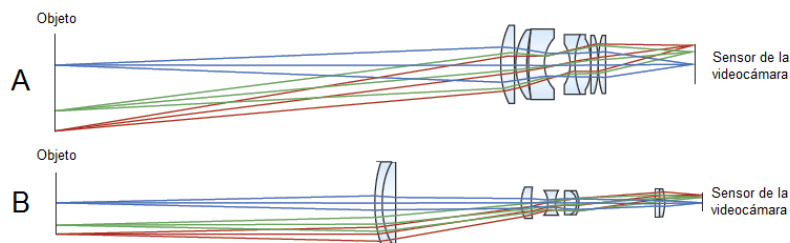
Además, se observó que, para un mismo volumen de solución, existían diferencias significativas en el área de los anillos ubicados en los pocillos centrales con respecto a los situados más al borde de la placa, tanto en seco como a  $100\mu\text{L}$  y  $200\mu\text{L}$ . Estas variaciones se deben a la distorsión de perspectiva. De hecho, sus efectos resultaron evidentes con la primera fotografía (Fig. 26). Esta distorsión afecta tanto a las imágenes que solo 25 pocillos resultan útiles para realizar experimentos; los situados en el centro de la placa. Desde el ángulo de la cámara, resulta que el fondo de los pocillos que están más próximos al borde la placa queda parcialmente oculto. Si por cualquier razón el anillo de tejido se coloca en esa zona, el programa difícilmente puede detectarlo. Además, por efecto de la perspectiva, aparecen muchos brillos y reflejos en las paredes de los pocillos que entorpecen la identificación de los anillos.



**Figura 26 | Efecto de la distorsión de perspectiva en la fotografía de una placa multipocillos de 96 pocillos.** En la imagen se comprueba que el efecto se acentúa en los pocillos más alejados del centro de la placa.

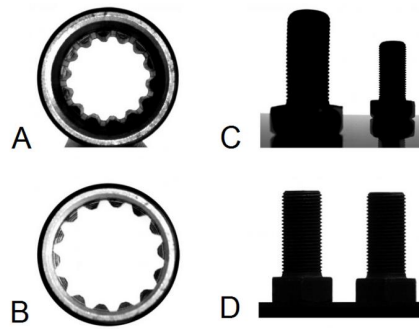
Para solucionar estos problemas existen dos opciones. Implementar procesos informáticos para la corrección de imágenes o utilizar tecnología óptica. En este proyecto se ha optado por recurrir a la solución más directa que consiste en acoplar un objetivo bi-telecéntrico a la cámara.

En la industria, los sistemas de inspección y medición de objetos basados en tecnología de visión por computador se han popularizado en los últimos años y estas lentes son la pieza clave para obtener una precisión igual o superior a la conseguida con métodos “de contacto” o basados en tecnología láser. Los objetivos bi-telecéntricos consiguen que la luz incida completamente perpendicular al sensor de la cámara (Fig. 27) y con ello eliminan los efectos de la distorsión esférica y de la perspectiva (Opto-Engineering, 2015). Además, consiguen que las dimensiones de la imagen permanezcan invariables aunque los objetos se desplacen (Fig. 28). El inconveniente es que, para conseguir estos efectos, la lente frontal de un objetivo telecéntrico debe ser al menos tan grande como la dimensión máxima del objeto a visualizar. Por este motivo son más grandes, más pesados y más caros que los objetivos comunes.



**Figura 27 | Comparación del diagrama de rayos de una lente telecéntrica y un objetivo convencional. A)** Diagrama de un objetivo convencional: Los rayos que no inciden perpendicularmente en el frontal del objetivo llegan al sensor de la cámara con una trayectoria oblicua. **B)** Diagrama de un objetivo telecéntrico: Todos los rayos que inciden en el frontal de la lente se alinean en paralelo y mantienen una dirección perpendicular al sensor de la cámara. Imagen adaptada del artículo Edmund Optics.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25	
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34	
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59	



**Figura 28 | Corrección óptica de un objetivo telecéntrico.** A) Fotografía del perfil interno dentado de un objeto cilíndrico obtenida con un objetivo convencional. B) Fotografía del mismo objeto capturada con un objetivo telecéntrico. C) Fotografía de dos tornillos idénticos colocados a una distancia entre ellos de 100mm capturada por un objetivo convencional. D) Fotografía de los mismos tornillos con un objetivo telecéntrico. Imagen adaptada del artículo Opto-engineering, 2015.

Para este proyecto se utilizó el objetivo bi-telocéntrico TC12120 (Fig. 29) de la serie *TC-Series Bi-telecentric lenses* (Opto-engineering, Mantova, Italia). Concretamente, se escogió el modelo TC12120 para sensores de imagen de  $\frac{1}{2}$ " por ser compatible con la cámara UI-1490LE-HQ y por tener un campo de visión de 122,8 x 92,1mm; suficiente para observar los 96 pocillos de una placa.



**Figura 29 | Fotografía del objetivo telecéntrico TC12120.** Imagen tomada de [www.opto-engineering.es/products/matrix-detector-telecentrics-lens-model-TC12120](http://www.opto-engineering.es/products/matrix-detector-telecentrics-lens-model-TC12120).

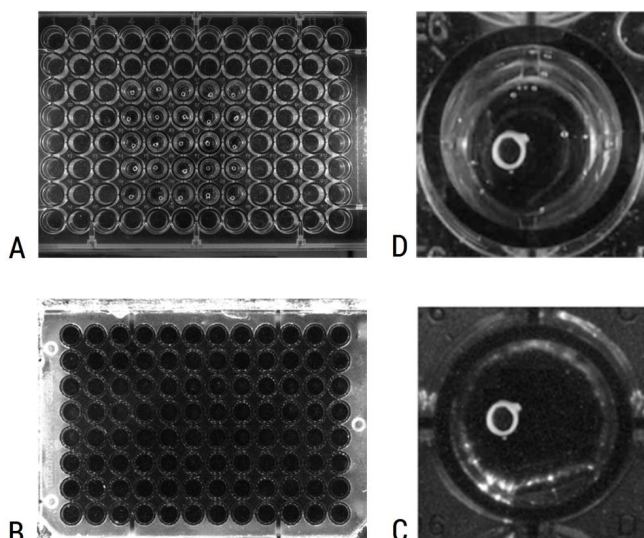
La incorporación del objetivo bi-telocéntrico solucionó inmediatamente la distorsión debida a la perspectiva, con lo cual, se pueden realizar experimentos en los 96 pocillos. El resultado se aprecia mejor al comparar una fotografía tomada sin la lente (Fig. 30A y 30C) y otra con ella instalada (Fig. 30B y 30D).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 30 | Corrección de la distorsión de perspectiva en las fotografías de las placas multipocillos por medio del objetivo telecéntrico TC12120. A)** Fotografía en grises de una placa multipocillos con un objetivo convencional. **B)** Fotografía en grises de una placa multipocillos tomada con el objetivo telecéntrico. **C)** Fotografía en grises y ampliada de un pocillo con un anillo de tejido tomada sin lente telecéntrica. **D)** Fotografía en grises y ampliada del mismo pocillo y tejido tomada con el objetivo telecéntrico.

Para determinar hasta qué punto los efectos correctivos de este objetivo logran minimizar los cambios en la ganancia óptica que se producen al variar el volumen de solución de un pocillo, se repitió el experimento anterior. En este caso, se comprobó que para un mismo anillo, la medida de su área luminal continuaba siendo diferente según estuviera seco, sumergido en 100µL o en 200µL. No obstante, las diferencias en la medida eran mucho menores que en el caso anterior (Tab. 2). Aún así, esto no supone un problema porque, como se verá más adelante, el grado de contracción de un tejido se calcula como el porcentaje de reducción que experimenta su área interior respecto a la medida en reposo, y todas las medidas se realizan en las mismas condiciones, es decir, manteniendo el volumen de líquido constante. En otras palabras, antes de introducir un volumen de fármaco, primero se retira el mismo volumen de solución (Hernández-Jiménez, J.G. 2015).

Volumen (µL)	0	100	200
µm <sup>2</sup> /píxel	1124,9 ± 15,4	1205,5 ± 72,8	1292,9 ± 48,6

Tabla 2 | Relación µm<sup>2</sup>/píxel (media ± sem) con el objetivo bi-telecéntrico instalado.

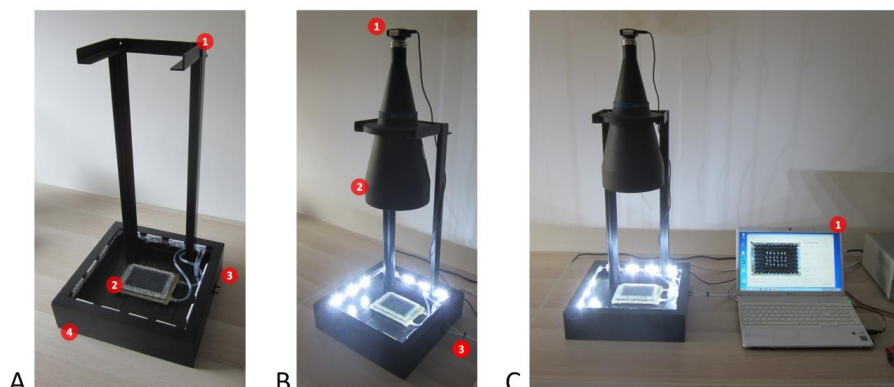
Finalmente, se observó que, con el objetivo bi-telecéntrico instalado, no existían diferencias significativas entre las medidas de los anillos situados en los pocillos del centro y los más cercanos al borde de la placa para un mismo volumen de líquido. Otra muestra de que la lente corrige la distorsión de perspectiva.

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

En definitiva, con la lente bi-telecéntrica se consigue corregir los efectos de la distorsión esférica y de perspectiva y, gracias a ello, es posible realizar experimentos en los 96 pocillos de una placa multipocillos.

### 1.3.2.3. Plataforma de observación.

Para conseguir unos resultados fiables es importante que todas las fotografías se tomen desde un único punto, por lo que la cámara y el objetivo bi-telecéntrico deben permanecer inmóviles durante los experimentos. Para ello, se han instalado sobre una plataforma construida especialmente para el sistema MuWOB (Fig. 31A). En esta estructura, la cámara y la lente se posicionan justo encima de la placa multipocillos, manteniendo una distancia en la perpendicular de  $\approx 750\text{mm}$  con la cámara y de  $\approx 350\text{mm}$  con el frontal del objetivo (Fig.31B).



**Figura 31 | Plataforma de observación:** **A)** Plataforma de observación con el baño de órganos multipocillos instalado. (1) Soporte para el objetivo telecéntrico. (2) Baño de órganos multipocillos. (3) Conductos para la entrada y salida de agua caliente. (4) Base con 14 *leds* de luz fría. **B)** Plataforma de observación con la cámara y el objetivo telecéntrico instalado. (1) Videocámara. (2) Objetivo telecéntrico. (3) Mangueras conectadas al tanque de agua templada. **C)** Sistema MuWOB listo para realizar un experimento. (1) Ordenador con *MuWOB Software* ejecutándose.

Por otro lado, la calidad de las fotografías depende también de unas buenas condiciones de luz que minimicen sombras, brillos y reflejos indeseados y que, al mismo tiempo, den claridad suficiente a las imágenes. En este sentido, la plataforma de observación incluye 14 *LEDs* de luz fría distribuidos alrededor de la base y que iluminan la placa multipocillos desde una posición ligeramente elevada (Fig. 31B). Al estar colocados uno frente a otros la luz incide sobre la placa desde múltiples ángulos, consiguiendo así una iluminación uniforme (difusa) que reduce los brillos y sombras. Además, toda la estructura se ha pintado de negro mate para contribuir en su reducción. Por otra parte, los *LEDs* se han escogido de alta intensidad porque la lente bi-telecéntrica tiene el inconveniente de que absorbe mucha luz. En conjunto, todo el sistema MuWOB apenas una ocupa una superficie de 340 x 340mm y tiene una máxima altura de 860 mm.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

### 1.3.2.4. Algoritmo de análisis de imagen.

#### *La pieza clave de MuWOB.*

Una de las piezas clave del sistema de medida MuWOB reside en el nuevo *software* de análisis, el cual ha sido específicamente diseñado para cuantificar la actividad contráctil de muestras de tejido con forma de anillo a partir de fotografías. Sin este *software*, todo el sistema anterior carece de sentido, pues resulta inútil transformar el baño de órganos convencional en un modelo totalmente nuevo si este no cuenta con las herramientas apropiadas con las que evaluar el efecto de los fármacos.

El desarrollo de este *software* se ha llevado a cabo con la plataforma *Matlab®* (The Mathworks Inc., 2011), abreviatura que responde a *Matriz Laboratory*, por ser una de las herramientas más comunes a la hora de abordar diseños que impliquen procesos informáticos de tratamiento y análisis de imágenes. Las razones para el uso de *Matlab®* en este proyecto van ligadas a su descripción. En términos generales, se trata de un lenguaje de programación de alto nivel, cuyas funciones y librerías están optimizadas para operar con matrices. El cálculo matricial permite operar con imágenes de una forma altamente flexible, matemáticamente eficiente y facilita muchísimo el diseño y programación de algoritmos de tratamiento y análisis de imagen. Para ello cuenta con avanzadas herramientas de análisis numérico, cálculo matricial, procesamiento de señal y visualización gráfica, entre otras. Además, ofrece una amplia colección de librerías, denominadas *Toolboxes*, desde las que se puede acceder a infinidad de funciones que, en la actualidad, cubren prácticamente casi todas las áreas principales en el campo de la ingeniería y simulación. Para este proyecto, tienen especial interés el *Image Acquisition Toolbox* (The Mathworks Inc., 2015a), *Image Processing Toolbox* (The Mathworks Inc., 2015b), y *Matlab GUI* (The Mathworks Inc., 2015c). Esta última herramienta permitió realizar la interfaz visual del programa.

Es cierto que para desarrollar algoritmos de tratamiento y análisis de imagen, como es el caso que nos ocupa, es posible utilizar otros lenguajes de programación más formales como *C*, *Java* o *C++*. Sin embargo, utilizar estos lenguajes para el desarrollo de los primeros prototipos supondría invertir muchísimo tiempo sin tener la certeza de lo que se quiere implementar funcionará. Estos lenguajes no están optimizados para el cálculo matricial y es muy probable cometer errores programáticos en la multiplicación de matrices o al operar con vectores, por ejemplo. Naturalmente, el tiempo que se invierte en detectar y corregir estos errores ralentiza el ritmo de trabajo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



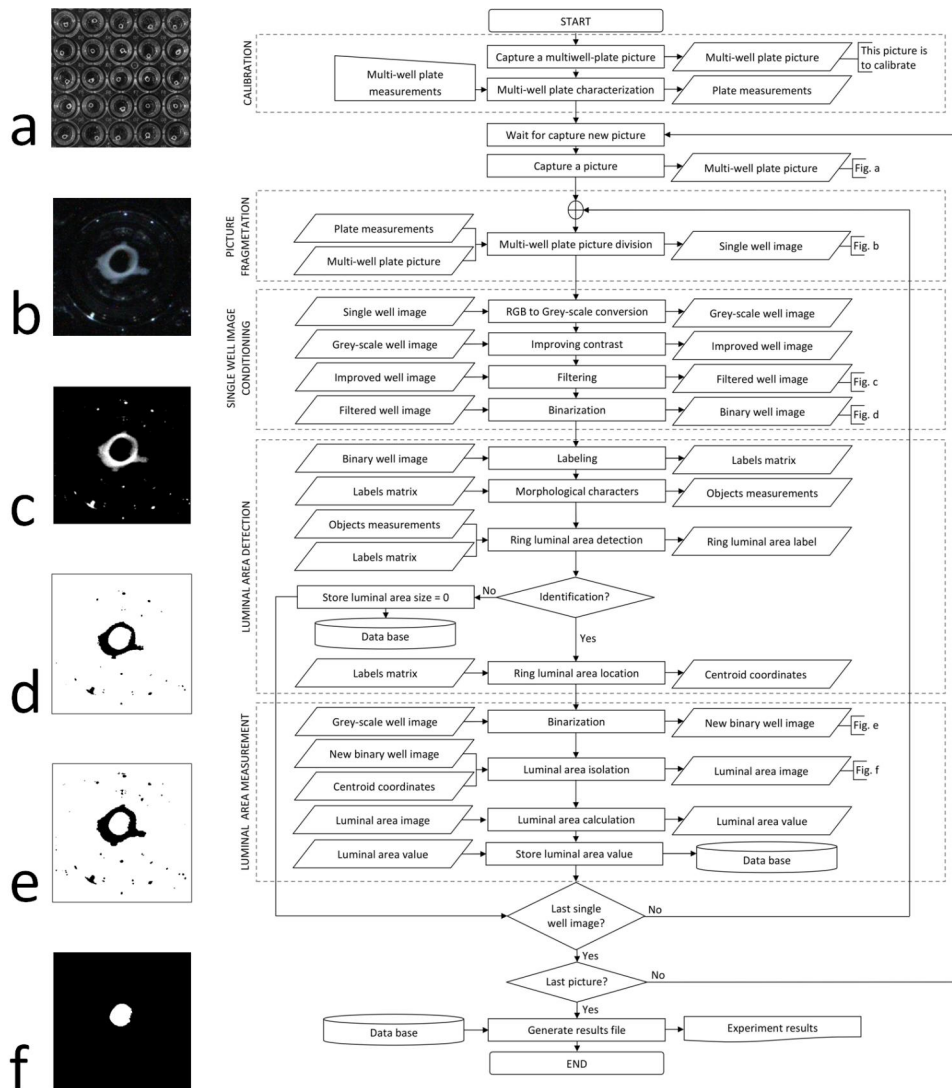


Figura 32 | Diagrama de flujo del algoritmo de análisis de imagen MuWOB.

En adelante, no se expone la creación y edición de interfaces y programas en *Matlab®*, pues son aspectos que se pueden consultar en la *World Wide Web*. En cambio, sí se describe con detalle cómo se detectan los anillos de tejido y cómo se miden sus contracciones. El código fuente de este programa está incluido en el CD adjunto a esta memoria.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Como se ha comentado anteriormente, con la nueva técnica de medida se registra la respuesta contráctil de los anillos de tejido en una secuencia temporal de fotografías, siendo necesario sustraer la información contenida en cada imagen para evaluar los efectos de los fármacos. Para medir las contracciones se ha desarrollado un algoritmo, basado en técnicas de fotogrametría y de visión por computador, que identifica los anillos de tejido en cada imagen y luego calcula, en píxeles, el tamaño del área luminal de cada uno. De esta manera, la acción del fármaco se determina en función del grado de reducción o aumento que experimenta el área luminal de cada anillo en las distintas fotografías.

La figura 32 muestra un diagrama de flujo del algoritmo que se ha implementado. En este diagrama están representados todos los procesos que intervienen en la ejecución del algoritmo, empezando por la calibración del sistema y terminando con el cálculo del tamaño de área luminal de cada anillo de tejido. Cada una de estas fases, se ha desarrollado a partir de funciones muy específicas de *Matlab®* y están diseñadas para resolver aspectos muy concretos del problema. Como se puede ver en la figura 32, la implementación del algoritmo está dividida en cinco procedimientos fundamentales: Calibración, Fragmentación de fotografías, Acondicionamiento de imágenes, Identificación del área luminal y Cálculo del área luminal.

La captura de las fotografías es automática y lo gestiona la aplicación *software*. El investigador solo tiene que configurar, a través de la interfaz de usuario, el número de imágenes y el tiempo de espera entre una y otra. Esto se consigue gracias al *Image Acquisition Toolbox*, que permite gestionar casi cualquier cámara que se encuentre instalada en el ordenador del usuario. Para ello, es fundamental que antes de comenzar con la ejecución del programa, los controladores de la cámara se encuentren correctamente instalados en el ordenador. Además, es fundamental que el dispositivo este encendido y conectado al ordenador antes de ejecutar el programa.

Cuando se inicia la aplicación lo primero que se ejecuta es un proceso que determina cuántas y cuáles son las videocámaras instaladas y conectadas al ordenador. Este proceso utiliza la función *'imqhwinfo'*, la cual detecta las cámaras disponibles, asigna un número de identificación a cada una y devuelve información como el nombre referencia y su resolución. Estos datos se muestran en la interfaz de usuario del programa, de manera que el investigador puede ver las cámaras disponibles y seleccionar aquella con la que desea trabajar. La cámara se activa mediante la función *'videoinput'*. Luego, la aplicación utiliza la función *'preview'* para mostrar la vista en vivo de la cámara y *'getsnapshot'* para tomar una fotografía

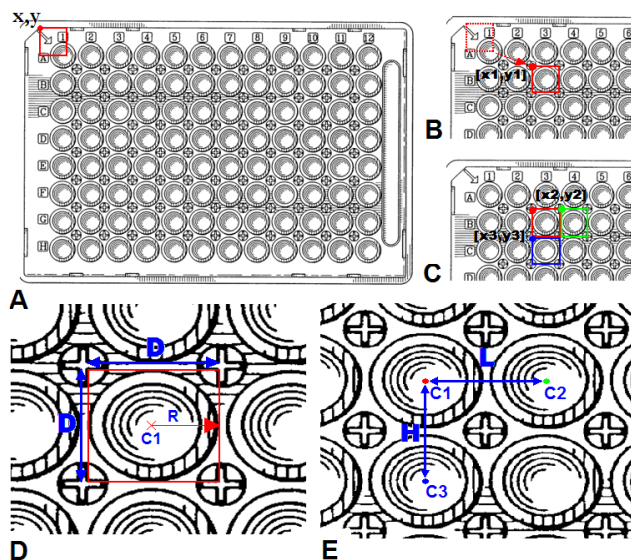
*Calibración.*

En cada fotografía pueden aparecer un total de 96 anillos de tejido, y el algoritmo debe identificarlos todos y medir su área luminal. Sin embargo, la escena que aparece en las fotografías es bastante compleja y está repleta de objetos indeseados que dificultan extremadamente la identificación de los anillos (Fig. 32a). No obstante, este problema se reduce si se delimita el área de búsqueda y se deja fuera del cómputo las zonas de la fotografía que carecen de información útil. Por tanto, se ha aprovechado el hecho de que cada pocillo representa un experimento totalmente independiente, para copiar fragmentos de la fotografía y construir imágenes más pequeñas en las cuales solo aparezca un único pocillo y donde el objeto principal de la escena sea el anillo de tejido (Fig. 32b). El algoritmo construye estas imágenes de forma concéntrica al pocillo y con unas dimensiones de  $D \times D$  píxeles, siendo  $D$  el diámetro de los pocillos, también en píxeles. Por tanto, el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

algoritmo necesita conocer, antes de comenzar un experimento, las coordenadas del píxel que ocupa el centro de cada pocillo así como el valor de su diámetro. Y esto se consigue por medio del procedimiento de Calibración.

La interfaz de usuario del programa incluye un *Asistente de Configuración de Placas* (ver apéndice I) que guía al investigador, paso a paso, para realizar correctamente la calibración. Aún así, la forma en que se calcula el diámetro y las coordenadas del centro de cada pocillo se explica a continuación.



**Figura 33 | Ilustración del procedimiento de calibración.** A) Ilustración de una fotografía de la placa multipocillos: Superpuesta a la imagen aparece el recuadro que debe ajustar el investigador. B) Ajuste del pocillo de referencia: el pocillo está perfectamente enmarcado por el marco cuadrado. Las coordenadas  $[x_1, y_1]$  se corresponden con el píxel de la esquina superior izquierda del recuadro. C) Ajuste de dos pocillos ortogonales y contiguos al de referencia: Las coordenadas  $[x_2, y_2]$  y  $[x_3, y_3]$  se corresponden con el píxel de la esquina superior izquierda del recuadro verde y azul respectivamente. D) Ajuste ideal del marco y el pocillo: el correcto ajuste permite aproximar la longitud del cuadrado al diámetro del pocillo. E) Cálculo de la distancia entre los centros de los pocillos contiguos.

Al iniciar el *Asistente de Configuración de Placas*, el programa captura una fotografía de la placa multipocillos. Luego, el investigador selecciona el tipo de placa que está utilizando de entre las opciones que le ofrece el programa (en esta versión del prototipo, solo está disponible la opción 8x12, lo que implica placas con 96 pocillos distribuidos en 8 filas y 12 columnas). A continuación, el asistente dibuja sobre la fotografía un marco cuadrado (Fig. 33A) cuya posición y tamaño se ajusta manualmente por medio de los controles disponibles en la interfaz de usuario. El investigador debe elegir un pocillo cualquiera y ajustar el recuadro hasta enmarcar el pocillo, procurando siempre que el recuadro resulte lo más ajustado posible al perímetro del pocillo en cuestión (Fig. 33B). Con cada acción de los controles, el programa recalcula las dimensiones y la posición del recuadro. Al terminar, el asistente solicita al investigador que enmarque otros dos pocillos contiguos al pocillo anterior en

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

direcciones ortogonales. Una vez ajustados los tres recuadros a sus respectivos pocillos (Fig. 33C), el programa calcula las coordenadas de píxel más próximo al centro de cada uno de la siguiente manera:

Al ajustar el marco cuadrado al perímetro del pocillo, resulta que la longitud D de cualquiera de sus lados es igual al diámetro del pocillo (Fig. 33D). Por otro lado, el programa toma como referencia las coordenadas [x,y] del píxel situado la esquina superior izquierda del recuadro para desplazarlo por la fotografía. Entonces, teniendo esto en cuenta, la ubicación del píxel más cercano al centro del primer pocillo viene dada por las coordenadas  $C_1 = [(x_1 + D/2), (y_1 + D/2)]$ . De igual manera, las coordenadas del píxel central de los otros dos pocillos serán  $C_2 = [(x_2 + D/2), (y_2 + D/2)]$  y  $C_3 = [(x_3 + D/2), (y_3 + D/2)]$ .

Finalmente, con estas tres coordenadas y aprovechando la geometría regular de las placas multipocillos, el programa calcula la distancia horizontal y vertical entre pocillos contiguos mediante las expresiones  $L = (x_2 + D/2) - (x_1 + D/2)$  y  $H = (y_3 + D/2) - (y_1 + D/2)$  respectivamente (Fig. 33E). A partir de estos datos, el programa determina las coordenadas de todos los centros y almacena la información en un fichero para utilizarla luego en la ejecución del algoritmo. Mencionar que todos estos cálculos se realizan en unidades de píxel.

### Fragmentación de fotografías

Una vez hecha la calibración, el programa aguarda en un estado de inactividad hasta que finalice el tiempo de espera para la captura de una nueva fotografía. Concluido el tiempo, el programa toma la fotografía de la placa multipocillos (Fig. 32a) y luego accede al fichero donde quedó almacenado el diámetro junto con las coordenadas de los píxeles centrales de todos los pocillos. Con esta información, el programa construye pequeñas imágenes copiando fragmentos de la fotografía donde solo aparece el interior de los pocillos (Fig. 32b). Dichas imágenes tienen unas dimensiones DxD píxeles, siendo D el diámetro de los pocillos. Por otra parte, y con el fin de ahorrar tiempo de cómputo, el programa solo genera imágenes de los pocillos señalados por el investigador durante la configuración del experimento. Gracias a esta práctica, se consigue aislar la escena de un anillo de tejido y procesar cada caso según sus condiciones particulares.

### Acondicionamiento de las imágenes.

En este procedimiento, los distintos fragmentos se someten, uno a uno, a una serie de operaciones y tratamientos para realzar el anillo de tejido respecto al resto de la escena. Así, resultará más fácil identificar el área luminal de los anillos y el programa podrá obtener resultados satisfactorios invirtiendo menos tiempo de cómputo. Los procesos que intervienen en el acondicionamiento de los fragmentos se ejecutan de forma secuencial, obteniendo como resultado final una imagen binaria a partir de la cual el programa determinará la cantidad de objetos presentes en la imagen así como algunas de sus propiedades geométricas. Los procesos que intervienen en esta fase son: Conversión a escala de grises, Mejora del contraste y Binarización.

Conversión a escala de grises: Independientemente de que la videocámara sea a color o en grises, las fotografías tomadas a través del *Image Acquisition Toolbox* son imágenes que por defecto se presentan en formato RGB. Por consiguiente, las copias de fragmentos para analizar cada pocillo por separado presentan el mismo formato. Como se mencionó anteriormente, el resultado final de esta

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

etapa de acondicionamiento es una imagen binaria (Fig. 32d), las cuales se construyen a partir de una imagen en grises y un nivel de gris que determina el umbral a partir del cual el programa decide qué píxeles serán blancos y cuales negros. Para convertir los fragmentos de fotografía de formato RGB a escala de grises se ha utilizado la función 'rgb2gray' incluida en el *Image Processing Toolbox*.

**Mejora del contraste y filtrado:** Para que el programa identifique correctamente el área luminal de los anillos de tejido, es importante que los fragmentos de la fotografía estén limpios de ruidos y aberraciones, ya que cualquier rasgo u objeto indeseado que aparezca en la escena entorpece la identificación de los anillos. Por tanto, el objetivo de este proceso es reducir, en la medida de lo posible, la presencia reflejos, brillos intensos y burbujas procurando, al mismo tiempo, realzar el anillo. En este caso, el efecto deseado se ha conseguido incrementado el contraste de la imagen y luego aplicando un filtro de mediana. Para manipular el contraste de una imagen, se dispone de la función 'imadjust'. Esta función calcula el histograma de la imagen y luego modifica la intensidad de los píxeles siguiendo una de las tres distribuciones que se muestran a continuación (Fig. 34):

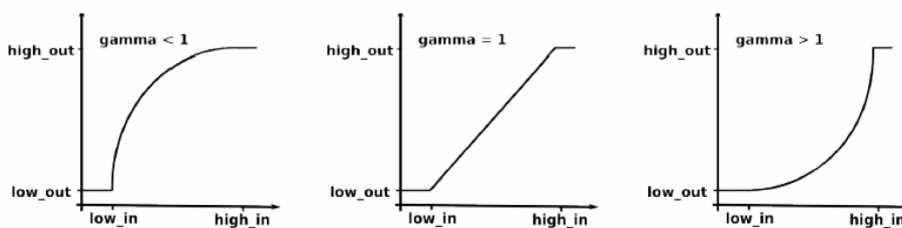


Figura 34 | Distribución de la intensidad de los píxeles en función del valor de gamma.

En el caso de este programa, el contraste de las imágenes se manipula según la siguiente configuración:  $gamma = 1$ ,  $low\_out = 0,75$ ,  $high\_out = 1$ ,  $low\_in = 0$  y  $high\_in = 1$ . Estos valores se han determinado tras realizar numerosos ensayos con multitud de fotografías y obtener resultados muy satisfactorios en la identificación de las áreas internas de los anillos.

Luego, la imagen resultante se somete a un proceso de filtrado que suaviza la intensidad de pequeños grupos de píxeles muy blancos resultantes de reflejos y brillos muy intensos debido a las condiciones de luz. Para esta operación se ha utilizado la función 'medfilt2'. Esta función implementa un filtro de imagen que recalcula el valor de un píxel tomando el promedio de la intensidad de los nueve píxeles que lo rodean más su propia intensidad. La figura 32c muestra el aspecto del tejido tras aplicar estos dos procesos.

**Binarización:** La binarización es una técnica ampliamente utilizada en aplicaciones industriales donde se reconocen objetos a partir de imágenes, ya que la simplicidad de las imágenes binarias permite encontrar y reconocer características estructurales de los objetos con cierta facilidad. Una imagen binaria se construye a partir de una imagen en escala de grises y un umbral de intensidad; es decir, se elige un valor límite a partir del cual todos los píxeles con niveles de intensidad mayores a ese umbral son codificados como píxeles negros, mientras que los que se encuentren por debajo son codificados como píxeles blancos, o viceversa. Por tanto, las claves para la binarización de imágenes son dos: elegir el valor óptimo para dicho umbral y utilizar imágenes de grises donde exista una diferenciación clara entre los objetos y el fondo. Esto último se consigue gracias a los procesos de mejora de contraste y filtrado anteriores.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

El método típico para determinar el valor del umbral es meramente empírico. Lo normal es realizar multitud de pruebas tras las cuales se determina cual es el valor que devuelve el resultado más próximo a la imagen binaria que se espera conseguir. Esto es un procedimiento totalmente manual. No obstante, para esta aplicación es fundamental que el cálculo del umbral se realice de forma automática y que tome el valor óptimo para binarizar cada fragmento de fotografía según sus condiciones particulares. En *Matlab*® esto es posible gracias a la función *threshold*, la cual implementa el método de *Otsu* (Otsu, N., 1975).

Este método calcula el umbral procurando que la dispersión de los niveles de gris dentro de un grupo de píxeles sea lo más pequeña posible y, al mismo tiempo, que la dispersión entre grupos diferentes de píxeles sea lo más alta posible. Para ello, primero calcula el cociente entre ambas variancias y luego determina como umbral el valor de cociente máximo. El inconveniente de este método radica en que cuantos más grupos de píxeles estén presentes en la escena, más tiempo llevará determinar el umbral óptimo. Sin embargo, con la mejora del contraste se consigue disminuir considerablemente la gama de grises de la imagen, eliminando muchos grupos aislados de píxeles sin interés y por tanto, reduciendo el tiempo de cómputo. Además, el filtrado elimina las zonas de la imagen con brillos muy intensos, los cuales supondrían una concentración elevada de píxeles en la zona más clara del histograma que rompe con la distribución de grises apropiada para el cálculo del umbral. Por otro lado, las mayores ventajas del método de *Otsu* son el automatismo y que las imágenes binarias que se obtienen tras aplicar el umbral representan con mucha fidelidad la escena de la imagen de grises.

El proceso de binarización termina al aplicar el umbral a la imagen de grises que resulta de los procesos de acondicionamiento anteriores. Esto se lleva a cabo con la función *im2bw*. Como resultado, se obtienen imágenes como las que se muestran en la figura 32d.

#### *Identificación del área luminal de los anillos de tejido.*

La capacidad del programa para distinguir entre lo que es y no es un anillo de tejido es la base del sistema MuWOB. Con lo cual, se ha desarrollado un método que permite identificar el área interna de los anillos a partir de una imagen binaria. En este método intervienen cuatro procesos: Etiquetado de los objetos, características morfológicas de los objetos, identificación del área luminal del anillo y, finalmente, ubicación del área luminal del anillo.

Etiquetado de los objetos: Este proceso determina la cantidad de objetos presentes en la imagen binaria, entendiendo por objetos las áreas blancas delimitadas por píxeles negros. Para ello, se ha utilizado la función *bwlabel*. Esta función implementa el método de conexión de componentes por etiquetado llamado *Run-Lenght encoding* (Haralick, R.M. et al., 1991). Este método, asigna a todos los píxeles que forman parte de un objeto un mismo número (etiqueta) y devuelve como resultado una matriz (matriz de etiquetas) con las mismas dimensiones que la imagen binaria y donde el valor de cada elemento corresponde con la etiqueta que le ha sido asignada a un píxel según el objeto al que pertenece. A partir de esta matriz de etiquetas, el programa determina cuántos objetos aparecen, estando entre ellos el área interior del anillo, el fondo de la escena y alguna que otra sección en blanco de menor tamaño resultado de brillos y reflejos que no se eliminaron totalmente después de mejorar el contraste, filtrar y binarizar.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

A continuación se explica muy brevemente cómo funciona el método. Básicamente, dos píxeles blancos forman parte del mismo objeto si son contiguos en alguna de las direcciones ortogonales (Fig. 35A) o si son contiguos en alguna dirección ortogonal o diagonal (Fig. 35B).

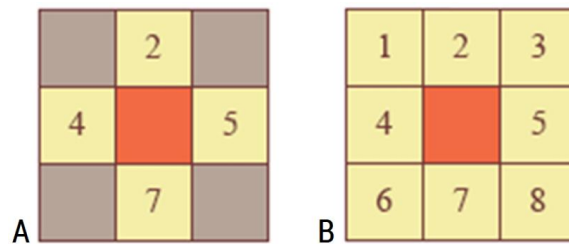


Figura 35 | Máscaras de conectividad. A) Máscara de 4 píxeles. B) Máscara de 8 píxeles.

Si se utiliza la máscara de 8 píxeles como criterio de conectividad, el píxel central (representado en naranja) pertenecerá al mismo objeto si existe un píxel blanco en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Por otra parte, si se escoge la máscara de 4 píxeles, solo se tiene en cuenta el valor de los píxeles vecinos situados en las posiciones 2, 4, 5 y 7. Naturalmente, utilizar un criterio u otro influye directamente en la cantidad de objetos estimados, tal y como muestra la imagen de la figura 36. En el caso de este proyecto se ha optado por una máscara de 8 píxeles.

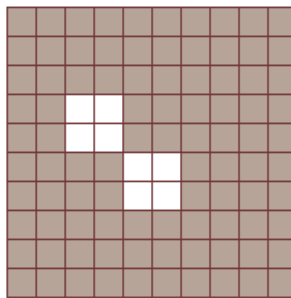


Figura 36 | Detección de objetos en función de la máscara de conectividad.

En ese caso, si se utiliza una máscara de 8 píxeles el programa interpreta que solo hay un objeto. Por el contrario, si se aplica la máscara de 4 píxeles, interpretaría que hay dos objetos distintos. Finalmente, el proceso de etiquetado de este método se entiende fácilmente si se analiza conjuntamente una imagen binaria (Fig. 37A) y su matriz de etiquetas (Fig. 37B).

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

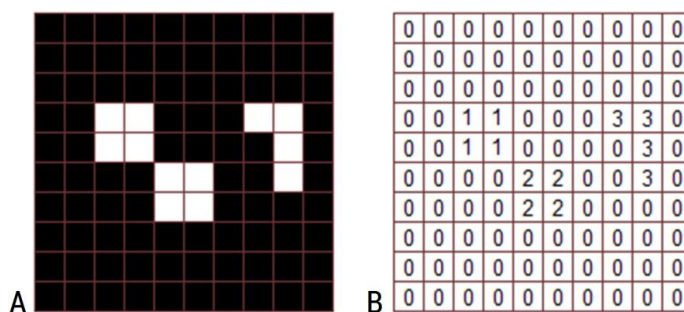


Figura 37 | Detección de objetos en función de la máscara de conectividad. A) Imagen binaria, B) Matriz de etiquetas generada con una máscara de conectividad de 4 píxeles.

En este ejemplo, se ha utilizado una máscara de conectividad de 4 píxeles, por lo que el programa interpreta que existen 3 objetos diferentes. Cada elemento de la matriz de etiquetas se corresponde con un pixel en la imagen binaria y sus valores dependen de si el pixel asociado pertenece a un objeto u otro. En este caso particular, los píxeles del primer objeto clasificado llevan la etiqueta 1, los del segundo objeto se etiquetan con un 2 y los que pertenecen al tercer objeto con un 3. Los píxeles de color negro representan al fondo de la escena y se les asigna la etiqueta 0. A partir de esta matriz, pueden calcularse características geométricas de los objetos como el área, el perímetro o su excentricidad.

Características morfológicas de los objetos: Dividir la fotografía en fragmentos más pequeños elimina del cómputo muchos píxeles superfluos y sitúa los anillos de tejido como objetos principales de las escenas; el procedimiento de acondicionamiento de imágenes reduce una parte considerable de los brillos y resalta el anillo; Aún así, resulta imposible conseguir que el área luminal de los tejidos aparezcan como único objeto en la escena, pues normalmente los brillos más intensos sobreviven a los procesos de acondicionamiento y aparecen como objetos tras el proceso de binarización. Por tanto, el programa diferencia el área interna de los anillos de otros objetos.

Su capacidad para discernir entre lo que es tejido y lo que no depende de la cantidad de información que pueda extraer de la escena, como características morfológicas de los objetos, detalles en la colorimetría o en la brillantez, etc. Cualquier particularidad es útil para establecer diferencias entre unos objetos y otros.

Por tanto, en primer lugar se estudió qué parámetros caracterizan mejor el área interna de los anillos en una imagen binaria. Y una vez definidos, se diseñó el programa para que calculase esos mismos parámetros para todos los objetos presentes en la escena. Así, el programa determina que el objeto que guarda una mayor relación en esos parámetros establecidos es el área luminal del anillo. Obviamente, cuantos más parámetros se incorporen en la búsqueda, mayor es la probabilidad de identificarlo con éxito. Estos parámetros se denominan comúnmente descriptores, pues su función es describir el objeto que se pretende encontrar.

La función 'regionprops' obtiene medidas de los objetos a partir de una matriz de etiquetas. El programa utiliza esta función para calcular el área y la excentricidad de los objetos. Se ha comprobado que estos dos descriptores son suficientes para diferenciar el área interior de los anillos del resto de objetos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Identificación del área luminal de los anillos: El objetivo de este proceso es determinar qué objeto es el área interior de los tejidos. Tras muchísimos análisis y estudios con multitud de fotografías, se comprobó que después de la fase de acondicionamiento, el área interior del tejido siempre resulta ser, y con diferencia en muchos casos, uno de los objetos con mayor tamaño de la escena. Por tanto, primero se descartan todos los objetos cuya área no sobrepase un número determinado de píxeles. A aquellos que sobreviven a este primer filtro, que son muy pocos (entre 4 y 6 objetos normalmente), se les evalúa el grado de excentricidad. El área contenida en el anillo es un objeto claramente circular y destaca tener un alto nivel de excentricidad. Sin embargo el resto de objetos que aparecen en la imagen son el resultado de brillos y reflejos difíciles de eliminar y tienen una morfología muy irregular. Por lo tanto, de entre los objetos que pasaron el umbral área, aquel que presenta mayor grado de excentricidad se identifica como el área luminal del anillo.

Lógicamente, tras los procesos de acondicionamiento pueden darse situaciones en las que existan objetos que cumplan la condición de área y que presenten un mayor grado de excentricidad que el área interior del tejido. Sin duda, esto daría lugar a resultados erróneos. Sin embargo, se realizaron pruebas de reconocimiento en más de 3600 fragmentos de fotografías y el criterio de búsqueda solo falló en 3 de las pruebas. También puede ocurrir que dentro del pocillo no haya tejido, lo cual es atribuible a un error humano y no del sistema. En este último caso, el programa responde asignando como resultado final un valor de área igual a 0 píxeles y comienza con el análisis de otro fragmento de fotografía.

Ubicación del área luminal de los anillos: En este proceso, el programa utiliza nuevamente la función 'regionprops' para obtener las coordenadas del píxel más cercano al centroide del área luminal de los anillos.

#### *Cálculo del área luminal.*

En principio, este último procedimiento puede parecer redundante, ya que con los procesos anteriores se identificó el anillo de tejido y se calculó el tamaño de su área interna. Sin embargo, hay que considerar el hecho de que esta medida se obtuvo a partir de una imagen manipulada para facilitar la identificación del anillo. Al aumentar el contraste y filtrar la imagen de grises, la apariencia original de los objetos cambia considerablemente y la imagen binaria no representa con fidelidad la escena real (Fig. 32d). En particular, el área interna del anillo aumenta de tamaño y toma una forma más redondeada, efectos que contribuyen eficazmente en su identificación. En estas circunstancias, la medida de área que se obtiene discrepa de la realidad.

Para solucionar el problema, el programa retoma el fragmento de fotografía en escala de grises, calcula su umbral de binarización y construye una nueva imagen binaria (Fig. 33e). Al no ejecutar la fase de acondicionamiento, ahora el área luminal del anillo muestra un aspecto mucho más próximo a su imagen real; es imposible que sea idéntico. Como contrapartida, en la nueva imagen binaria aparecen todos los objetos que se consiguieron eliminar con la etapa de acondicionamiento, con lo que la escena es más engorrosa para identificar el anillo. Sin embargo, esto no supone ningún problema gracias a la función *bwselect*. Esta función recibe como entrada una imagen binaria y las coordenadas de uno de los píxeles que pertenecen al objeto de interés. Como resultado, devuelve otra imagen binaria donde solo aparece ese objeto. El programa ejecuta esta función con la nueva imagen binaria y las coordenadas del píxel centroide obtenidas en la etapa anterior. El resultado es otra imagen binaria con fondo negro y un único objeto blanco, el área luminal del anillo (Fig. 32f). Finalmente, el programa

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

calcula el tamaño del área contabilizando la cantidad de píxeles blancos presentes en esta imagen, luego guarda el valor en memoria y comienza con el análisis de otro fragmento de fotografía.

Llegado a este punto, el algoritmo se ejecuta tantas veces como fotografías determine el investigador que son necesarias para la evaluación de su experimento.

### 1.3.2.5. Programa *MuWOB Software*.

#### *Guía de Usuario*

*MuWOB Software* es un programa informático desarrollado específicamente para el proyecto MuWOB. Esta aplicación toma las fotografías, procesa las imágenes y mide los anillos de tejido de forma totalmente automática. Además, gracias a su interfaz gráfica, el investigador puede configurar el registro de su experimento de una manera rápida y realmente sencilla. Se ha preferido no entrar en los detalles sobre la edición del programa, pues explicar el código resulta muy engorroso y en la mayoría de los casos no aclara mucho. Aún así, el funcionamiento de la aplicación puede consultarse en la *Guía de Usuario* adjunta en el apéndice I. Además, los ficheros con el código fuente están incluidos en el CD que acompaña a esta memoria.

## 1.4. Experimentos en el Laboratorio de Farmacología.

Para validar el sistema de medida MuWOB se llevaron a cabo una serie de experimentos farmacológicos para determinar si los resultados que se obtienen con el nuevo instrumento son comparables a los resultados conseguidos con el baño de órganos tradicional y si la información que devuelven ambos sistemas permite valorar los efectos de los fármacos de igual manera. Los resultados que demuestran la validez del MuWOB han sido publicados en los artículos Díaz-Martín, D., et al., 2015; Borges, R., et al., 2016 y en Hernández-Jiménez, J.G., 2015. A continuación, se resumen algunos de los experimentos más representativos.

En el primer experimento se estudió la contracción de anillos de aorta de rata añadiendo dosis ascendentes y acumulativas de noradrenalina (NA), sustancia que provoca la contracción muscular de los vasos sanguíneos (Exton, J.H, 1895; Kurz, T. et al., 1999). Como cabría esperar, los resultados obtenidos con MuWOB mostraron una reducción del área luminal de los anillos de aorta de rata dependiente de la concentración de noradrenalina, alcanzando una reducción máxima en el área de  $\approx 34\%$  respecto a su área en reposo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

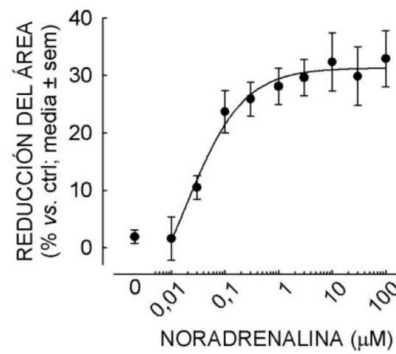


Figura 38 | Reducción del área luminal de anillos de aorta de rata tratados con concentraciones ascendentes y acumulativas de NA.

En estas mismas condiciones experimentales, se sustituyeron los anillos de aorta de rata por anillos de aorta de conejo. En este caso, la respuesta contráctil resultó ser algo menor que con la aorta de rata, pero aún así los anillos de aorta de conejo también reaccionaron de forma dependiente a la concentración de NA, experimentando una reducción máxima en el área de  $\approx 16\%$  respecto a su área en reposo. Además, los resultados fueron coherentes con lo publicado por otros autores en lo referente al conejo (Auguet, M. et al., 1982).

En otro estudio, se comprobó el efecto del prazosín o prazosina (PRZ), un fármaco utilizado para el tratamiento de la hipertensión, que bloquea los efectos vasoconstrictores de la noradrenalina (Bolli, P. et al., 1975). En este caso, se utilizaron nuevamente anillos de aorta de rata y dosis acumulativas de noradrenalina, pero ahora en presencia de 10nM de PRZ. En este caso cabía esperar que la respuesta de los anillos a la NA se encontrara desplazada a la derecha como síntoma de la inhibición de la acción de la NA (Adeabo, A.S. & C.R. Triggle, 1993). Efectivamente, las medidas obtenidas con MuWOB revelaron la inhibición del efecto contráctil de la NA por parte del prazosín (Fig. 40).

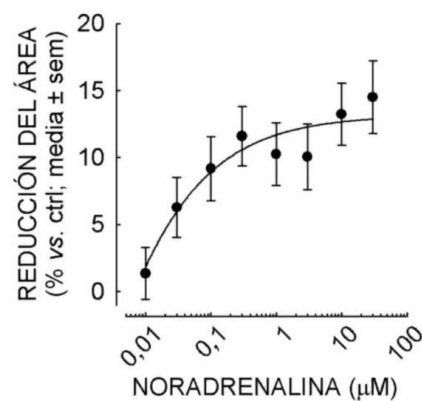


Figura 39 | Reducción del área luminal de anillos de aorta de conejo tratados con concentraciones ascendentes y acumulativas de NA.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

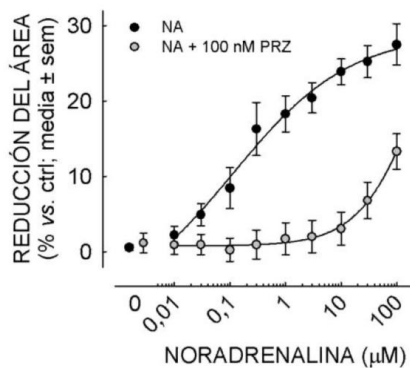


Figura 40 | Reducción del área luminal de anillos de aorta de rata tratados con concentraciones ascendentes y acumulativas de NA en presencia (círculos grises) o ausencia (círculos negros) de 100nM de PRZ.

También se estudió el efecto de la fenilefrina, *phenylephrine* en inglés (PHE), fármaco que lleva utilizándose durante más de medio siglo y que provoca la contracción muscular de vasos sanguíneos como la aorta (Hieble, J.P. et al., 1999). Para ello se utilizaron una vez más anillos de aorta de rata y se añadieron dosis ascendentes y acumulativas de esta sustancia (Fig. 41A). Por otra parte, al igual que hiciera con la noradrenalina, también se evaluó el efecto inhibitor del prazosín en anillos de aorta de rata tratados con fenilefrina (Fig. 41B). Los resultados obtenidos en ambos casos, son similares a los parámetros descritos utilizando el baño de órganos convencional (Buus, N.H. et al., 1994; Holck, M.I., 1988; Macia, R.A., et al., 1984).

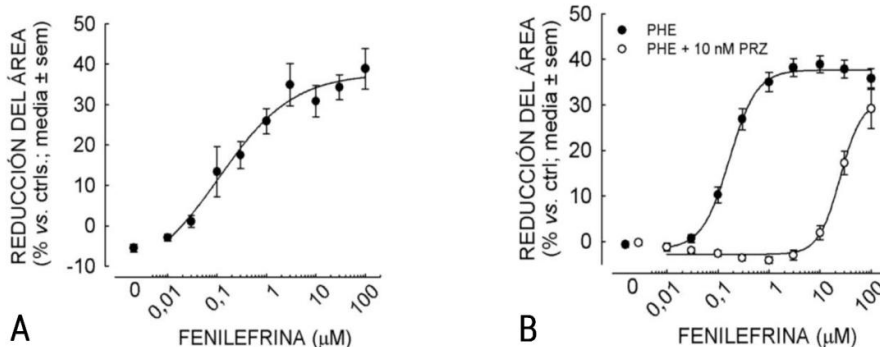


Figura 41 Estudios realizados con fenilefrina | A) Reducción del área luminal de anillos de aorta de rata tratados con concentraciones ascendentes y acumulativas de PHE, B) Reducción del área luminal de anillos de aorta de rata tratados con concentraciones ascendentes y acumulativas de PHE en presencia (círculos grises) o ausencia (círculos negros) de 100nM de PRZ.

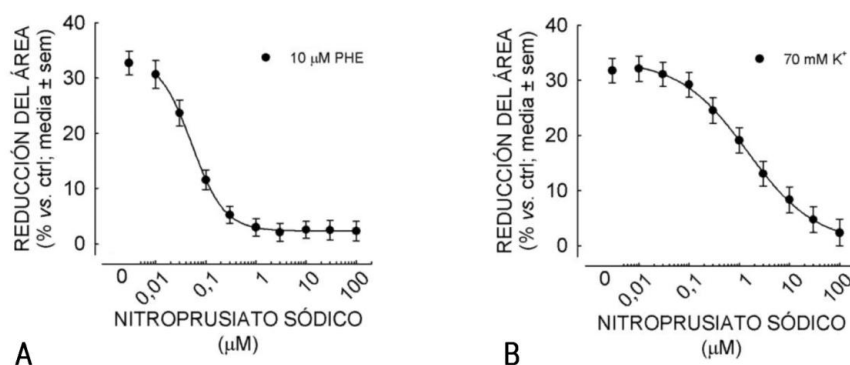
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Por otro lado, también se ensayó los efectos vasodilatadores del nitroprusiato sódico, *sodium nitroprusside* en inglés (SNP), sustancia que puede revertir la contracción producida por PHE y por alto  $K^+$ , de forma dependiente de la concentración (Venturini, C.M. et al, 1993). Para ello, se realizaron dos experimentos utilizando anillos de aorta de rata y dosis acumulativas de SNP: en el primero los anillos fueron previamente contraídos con PHE (Fig. 42A) y en el otro fueron precontraídos por  $K^+$  (Fig. 42B). Tras analizar los datos medidos por MuWOB, se comprobó satisfactoriamente la acción del SNP como vasodilatador. Además, los resultados son comparables a los obtenidos por otros autores utilizando diferentes métodos.



**Figura 42 | A)** Respuesta de anillos de aorta de rata tratados con 10µL de PHE y concentraciones ascendentes y acumulativas de SNP. **B)** Respuesta de anillos de aorta de rata tratados con 70nM  $K^+$  y dosis ascendentes y acumulativas de SNP.

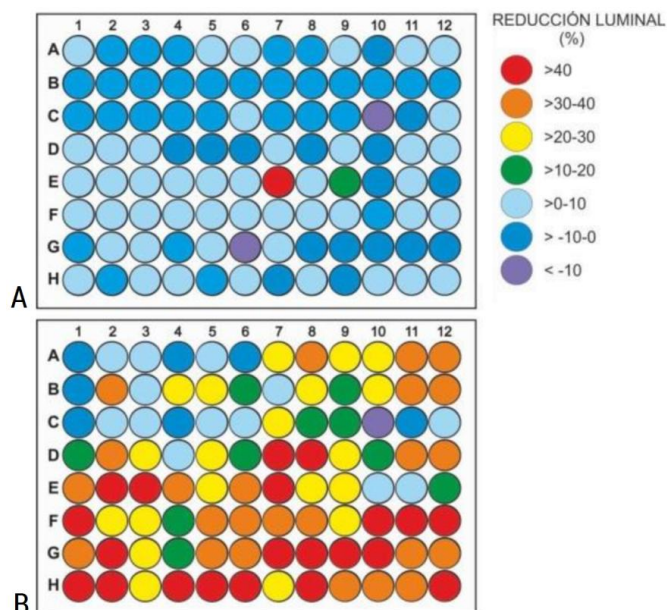
Asimismo, se realizó un experimento para poner a prueba la capacidad de análisis del MuWOB en cribados rápidos con decenas de fármacos al mismo tiempo. Para ello, se llenó la placa multipocillos con 96 anillos de aorta de rata y se añadieron concentraciones de 30 fármacos diferentes (Tab. 3), empleando tres anillos por fármaco. Pasados 30 minutos, se añadió 10µL de PHE a todos los pocillos menos a los que se usaron de control y se esperó otros 30 minutos. Con MuWOB se midió el área interior de todos los anillos justo antes de administrar los fármacos, pasados los primeros 30 minutos (y antes de inyectar la PHE) y pasados los 30 minutos después de añadir la PHE.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Pocillos	Fármaco	Variación del área basal (%)	Variación del área con PHE (%)
A1-6	Ninguno (control)	0 ± 0,4	0,8 ± 0,7
A7-12	10µM PHE	0,1 ± 0,6	31,3 ± 2,4
B1-3	10µM ACh	-2,8 ± 0,9	14,5 ± 10,9
B4-6	10µM ATP-Mg	-2,1 ± 0,5	21,2 ± 5
B7-9	10µM Cafeína	-4,8 ± 1,5	12,4 ± 5,8
B10-12	10µM Cocaína	-2,6 ± 0,6	30,7 ± 2,8
C1-3	10µM ISD	-2,7 ± 0,6	2,1 ± 2,4
C4-6	10µM PRZ	-1,2 ± 1,2	0,8 ± 2,8
C7-9	10µM Histamina	-4,8 ± 1,8	17,2 ± 2,3
C10-12	10µM SNP	-4,5 ± 4,3	12,4 ± 11
D1-3	10µM 5HT	6,9 ± 1	26,3 ± 4
D4-6	<b>0,1ng/mL NF1-56</b>	-3,6 ± 1,2	12,9 ± 6,9
D7-9	10µM Suramina	0,2 ± 2,3	42,6 ± 6,6
D10-12	10µM Tiramina	-1,4 ± 3,9	27,5 ± 5,3
E1-3	<b>1µM AF1</b>	5,3 ± 1,4	44,5 ± 2,8
E4-6	<b>10µM ITH 2001</b>	2,4 ± 0,5	42,8 ± 3,3
E7-9	10µM Dopamina	24,6 ± 13,8	42,3 ± 17,1
E10-12	10µM Yohimbina	-2,9 ± 2,1	12,3 ± 3,8
F1-3	10µM Braquiquinina	4,5 ± 1,6	32,7 ± 4,7
F4-6	10µM Bay K 8644	6,9 ± 0,5	26,3 ± 4,9
F7-9	10µM MCh	1,5 ± 0,4	29,8 ± 6,2
F10-12	10µM Ouabaína	0,2 ± 2,3	59,6 ± 6,9
G1-3	<b>10µM D4</b>	0,6 ± 1	36,2 ± 6
G4-6	<b>10µM D7</b>	-3,8 ± 4	28,1 ± 9,2
G7-9	10µM Antranolol	-2,1 ± 2,4	47 ± 5,4
G10-12	<b>10µM RCTM-3</b>	-3,9 ± 1,5	38 ± 6,2
H1-3	<b>10µM R5</b>	0,8 ± 1,9	42,3 ± 8,8
H4-6	<b>10µM RCTM-7</b>	0,1 ± 1,4	46,7 ± 3,5
H7-9	<b>10µM Comp. 97</b>	0,1 ± 1,2	37,7 ± 6
H10-12	<b>10µM RCTH-8</b>	3,2 ± 0,6	36,1 ± 2,8

**Tabla 3 |** La primera columna muestra los grupos de pocillos utilizados por cada fármaco. La segunda columna muestra la concentración y nombre de los fármacos administrados en los pocillos. En la tercera columna se muestra el porcentaje de reducción en el área luminal de los anillos tras los primeros 30 minutos después de haber añadido los fármacos. La última columna muestra el porcentaje de reducción en el área luminal de los anillos después de añadir 10 µL de PHE y esperar otros 30 minutos. En negrita, compuestos de la colección de fármacos pertenecientes al Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna. Tabla adaptada del artículo Borges, R., et al., 2016.

La figura 42 muestra el porcentaje de reducción del área luminal de cada anillo, representado en falso color según la leyenda a su derecha. Con este experimento, se demuestra que MuWOB permite realizar cribado farmacológico en un solo experimento, de forma rápida y barata.



**Figura 43 | A)** Reducción del área luminal de los anillos 30 minutos después de administrar los fármacos. **B)** Reducción del área luminal de los anillos 30 minutos después de haber añadido 10  $\mu$ L de PHE a todos los pocillos salvo los usados de control. Imágenes adaptadas de las publicadas en el artículo Borges, R., et al., 2016.

## 1.5. Discusión de los resultados.

Como se ha comentado anteriormente, los estudios sobre la contracción de tejidos aislados se llevan realizando, desde hace muchos años, con el baño de órganos tradicional. También se ha explicado que en este sistema, los tejidos permanecen sumergidos en una solución fisiológica (típicamente en 4-50mL) dentro de una copa de vidrio templada (Aboud, R. et al., 1993; Scarborough, N.L. & G.O. Carrier, 1984) y que para llevar a cabo experimentos en paralelo, los farmacólogos precisan tantas copas como ensayos vayan a realizar. Cuantas más copas, más espacio de poyata ocupa el sistema y más gasto económico supone. Tómese de ejemplo el baño de órganos del Laboratorio de Farmacología del IUBO-AG, en la Universidad de La Laguna, que dispone de solo 16 copas, ocupa unos 4 metros de poyata y costó alrededor de los 40.000€.

Es cierto que, de momento, el MuWOB no puede aún suplir al baño de órganos convencional en todas sus utilidades. Por ejemplo, los experimentos con músculos estriados como el corazón y los tejidos esqueléticos requieren estimulación eléctrica y una alta oxigenación del medio, condiciones muy difíciles de conseguir en una placa multipocillos. Sin embargo, las ventajas (Tab. 4) que ofrece el MuWOB para los estudios farmacológicos sobre actividad contráctil son innegables, como igual lo son las posibilidades que este nuevo sistema supone para el desarrollo de nuevas técnicas de cribado farmacológico con tejidos vivos.

	Baño de órganos	MuWOB
Tiempo estimado para preparar 96 muestras <sup>(1)</sup>	120 min.	30 min.
Tiempo estimado para analizar 96 muestras <sup>(2)</sup>	> 18h	5 h
Cantidad de animales para 96 muestras	6	2
Volumen de solución para 96 muestras	24 L	0,2 L
Volumen de solución por muestra	4-20 mL	0,05 – 0,2 mL
Cantidad de fármaco para 96 muestras <sup>(3)</sup>	10 mg	0,2 mg
Número de análisis paralelos <sup>(4)</sup>	16 <sup>(5)</sup>	96
Gases	Carbógeno u oxígeno	Ninguno
Espacio de poyata	4000 x 500 mm	340 x 340 mm
Automatización	Difícil o imposible	Robots disponibles
Precio	≈40.000 € <sup>(6)</sup>	≈3.500 €

**Tabla 4 | Ventajas del MUWOB . Comparación con el baño de órganos convencional.** (1) Muestras con forma de anillo. (2) Para estudios dosis-respuesta. (3) Para una dosis-respuesta. (4) Una muestra por dosis. (5) y (6) Para un baño de órganos de 16 copas.

Como se han dicho es más de una ocasión en esta Tesis, el MuWOB permite analizar las contracciones de un gran número de tejidos y múltiples fármacos al mismo tiempo. Además, es un sistema perfectamente adaptable a los robots para placas multipocillos, pudiendo integrarse en las plataformas automáticas que usan hoy las grandes empresas farmacéuticas para el cribado masivo de sustancias.

Para los pequeños y medianos laboratorios, el MuWOB es una herramienta de estudio relativamente barata, rápida y que ocupa muy poco espacio de poyata. Además, al conseguir un mayor aprovechamiento de animales, fármacos y soluciones, los costes por experimento se reducen notablemente, y laboratorios que antes no podían asumir experimentos con tejidos vivos, ahora podrían abrir nuevas líneas de investigación sobre la contracción en tejidos.

En cuanto al mejor aprovechamiento de los animales, muchas veces no es solo una cuestión económica o ética, sino de escasez. En ocasiones, la fuente de muestras es limitada, como son los tejidos humanos procedentes de cirugías o de animales tratados *in vivo*. En estos casos, el MuWOB cobra especial interés.

Mencionar que, en el sistema MuWOB los anillos de tejido están libres en los pocillos y no están sometidos a una tensión basal, como ocurre con los transductores isométricos típicos usados en el baño de órganos. Mantener estirado el anillo de tejido con una tensión de 1g o más, no es precisamente el estado natural de las arterias, y menos aún de la tráquea. Además, se ha escrito que la tensión basal a la que se someten las aortas en el sistema convencional influye directamente en la respuesta obtenida (Nunes, J.P. & S. Guimaraes, 1999). El MuWOB emplea un método de medida no invasivo con la muestra, y por tanto, el análisis se lleva a cabo en condiciones mucho más próximas al estado natural del tejido.



Por otro lado, también se puede argumentar que, en algunos casos, la respuesta contráctil de los tejidos medida con el MuWOB difiere de la obtenida con el baño de órganos convencional. Sin embargo, no hay que olvidar que también se dan diferencias entre los sistemas ya aceptados en virtud de que se mida tensión, desplazamiento o presión para luego evaluar la contracción (Buus, N.H., 1994). Al final, lo importante es que las conclusiones sobre el efecto del fármaco coincidan indistintamente del sistema que se utilice. En este sentido, el problema proviene, principalmente, de la resistencia al cambio en gran parte de la comunidad farmacológica clásica, en parte comprensible, pues el baño de órganos es un método robusto y en uso desde hace más de 100 años. Sin embargo, esto no puede ser obstáculo para la implantación de nuevas tecnologías complementarias como MuWOB, de menor coste y mayor versatilidad.

A todo lo dicho, hay que sumar el hecho de que el MuWOB permite el análisis farmacológico con muestras de distintos animales. Para validar el nuevo instrumento se realizaron experimentos con aorta y tráquea de rata y, en menor medida, con aorta de conejo, sin embargo también se podrían llevar a cabo estudios farmacológicos en aorta y tráquea de ratón, lo que abre un campo increíblemente amplio dado que permitiría la investigación en tejidos animales transgénicos. Además, con placas con pocillos de mayor tamaño se puede utilizar el MuWOB para estudiar la contracción de tejidos procedentes de animales grandes como porcino, bovino o humano.

Sobre este sistema, la Oficina Española de Patentes y Marcas perteneciente al Ministerio de Industria, Energía y Turismo de España concedió a la Universidad de La Laguna una patente que lleva por título *Dispositivo y procedimiento para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias químicas mediante método ópticos* y código de referencia ES 2 390 961 B1. Tanto el informe de concesión como el certificado de *Patente de Invención* están adjuntos en el apéndice IX.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# CANStim-8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Este capítulo trata sobre la labor científica y técnica llevada a cabo para diseñar, implementar y verificar el electroestimulador CANStim-8. Para facilitar su lectura y comprensión, el capítulo está organizado en diferentes secciones donde se detallarán todos los aspectos relevantes del proyecto. Ante todo, se pretende argumentar, de manera clara y concisa, las decisiones tomadas en el diseño del nuevo aparato para conseguir poner de manifiesto la necesidad y la trascendencia que podría alcanzar en las investigaciones y estudios farmacológicos en el futuro.

Los bloques primero y segundo tratan sobre los objetivos acometidos, de los antecedentes que sirvieron como punto de partida y de los requisitos tanto técnicos como funcionales que debe reunir el sistema. Además, el segundo profundiza en la arquitectura del nuevo aparato, describiendo en detalle su diseño electrónico, el *firmware* que controla su funcionamiento y su construcción. También contempla un breve repaso sobre las herramientas que se han utilizado para diseñar y construir el nuevo electroestimulador, nombrando exclusivamente los aspectos más relevantes para justificar su utilización en este trabajo.

Finalmente, el tercer bloque está dedicado a las diferentes pruebas de laboratorio a las que fue sometido el nuevo equipo para validar su funcionamiento y comprobar su capacidad de estimular preparaciones biológicas.

## 2.1. Los electroestimuladores en Farmacología.

*Limitaciones para la experimentación con electroestimulación.*

Como se trató en el Capítulo I, la estimulación eléctrica ha estado ligada a la investigación biomédica prácticamente desde que se descubrió la electricidad. Desde entonces, se han ido creando ingeniosos aparatos con los que estimular nervios y tejidos excitables como el músculo esquelético, el cardíaco o el liso, permitiendo a los científicos estudiar los efectos que produce la electricidad en la contracción muscular y ensayar multitud de fármacos.

Actualmente, existen en el mercado muchos modelos de electroestimuladores para la experimentación en el laboratorio. En general, estos aparatos cumplen las expectativas para la investigación básica en las áreas de la Farmacología y la Fisiología, pero comparten limitaciones que impiden a los científicos avanzar en sus estudios.

En primer lugar, muy pocos modelos comerciales permiten estimular dos o más preparaciones biológicas de forma simultánea e independiente. En este sentido, un electroestimulador multicanal supondría la realización de experimentos en un tiempo más reducido y un menor consumo de animales, con el consiguiente ahorro económico.

Por otra parte, la gran mayoría de los electroestimuladores comerciales no permiten inyectar corrientes eléctricas superiores a los 250mA, lo que supone un problema cuando se trabaja con preparaciones biológicas cuya impedancia es muy baja, como ocurre con el baño de órganos. En este caso concreto, la solución fisiológica que mantiene funcional la muestra de tejido es muy conductora, de modo que gran parte de la potencia eléctrica que genera el estimulador se disipa en el medio y no se consigue estimular la muestra con intensidad suficiente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Finalmente, ninguno de los electroestimuladores disponibles en el mercado permite añadir nuevas funciones o modificar las que traen de fábrica una vez comercializados. Debido a ello, los investigadores se ven obligados a adquirir equipos de un coste elevado con muchas más prestaciones de las que en realidad necesitan para sus estudios. Incluso, se llega a adquirir varios electroestimuladores porque las funciones que les interesan las implementan equipos diferentes. Por tanto, un electroestimulador que pudiera ser reprogramado fácilmente para personalizar su funcionamiento a las necesidades particulares de cada investigador, supondría un ahorro económico importante para los laboratorios y permitiría plantear experimentos con métodos de estimulación muy específicos y difíciles de encontrar implementados en los equipos comerciales. En base a estas limitaciones, surge la necesidad de crear un nuevo equipo de electroestimulación que solucione estos problemas.

## 2.2. El electroestimulador CANStim-8

En términos generales, el objetivo es diseñar y construir un nuevo equipo de estimulación eléctrica para realizar estudios sobre contracción muscular en los laboratorios de Farmacología y Fisiología. Básicamente, este proyecto consistió en desarrollar un equipo multicanal capaz de estimular varias preparaciones biológicas simultáneamente, con señales independientes y mediante impulsos eléctricos de alta potencia. Además, debe ser totalmente reprogramable y permitir añadir nuevas formas de estimulación o cualquier otra función que el usuario considere oportuno incorporar al sistema.

### 2.2.1. Especificaciones de diseño.

*Las necesidades de los investigadores.*

Como se ha mencionado, este proyecto nace a raíz de las limitaciones que presentan los electroestimuladores comerciales actuales. Sin embargo, muchos de estos equipos, incluso los más antiguos, ofrecen una serie de prestaciones que también debe incluir el nuevo estimulador.

En este sentido, hemos tomado prestadas las características del electroestimulador S48 (Grass Technologies, USA) como punto de referencia para diseñar el nuevo equipo (Fig. 44). El motivo de esta elección se debe a que el S48 es un estimulador que lleva utilizándose desde hace más de 40 años en el Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna, obteniendo, en general, muy buenos resultados.



Figura 44 | Electroestimulador S48 de Grass Technologies.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

El S48 es un electroestimulador de propósito general diseñado para procesos de estimulación tanto nerviosa como muscular, en aplicaciones que se extienden desde preparaciones uni-celulares hasta tejidos y músculos enteros.

El equipo se diseñó para estimular con pulsos de voltaje cuadrados de hasta 150V de amplitud, los cuales pueden combinarse de distinta manera para generar diversas formas de estimulación. De este modo, se puede estimular con una señal compuesta por un único pulso, por dos pulsos, por pulsos repetitivos, trenes de pulsos, etc. Además, incluye señales de sincronización para coordinar la estimulación con otros dispositivos de laboratorio.

Sin embargo, a pesar de la antigüedad del S48, el equipo es un claro reflejo de las principales limitaciones que presentan los electroestimuladores actuales. En primer lugar, la corriente máxima de salida no supera los 650mA de pico. Por otro lado, se trata de un estimulador mono-canal, por lo que solo puede estimular una única preparación. Adicionalmente, es un electroestimulador totalmente analógico, así que resulta imposible reprogramar el sistema para añadir nuevas funciones. Incluso la forma de onda de los impulsos eléctricos se ve afectada por el valor óhmico de la preparación que se vaya a estimular. [Para una valoración más detallada del S48 puede consultar la página web [www.grasstechnologies.com](http://www.grasstechnologies.com)].

Por tanto, el nuevo equipo debe reproducir, al menos, las mismas opciones de configuración que ofrece un electroestimulador bien probado como el S48 y, al mismo tiempo, resolver todas las limitaciones referenciadas anteriormente.

Además, también debe incluir las especificaciones que se detallan a continuación, las cuales fueron definidas en base a las necesidades de los científicos que trabajan en el Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis de la Universidad de La Laguna:

- a) El equipo debe contar con ocho canales de estimulación independientes para experimentar con diferentes preparaciones biológicas de manera aislada.
- b) El equipo debe reprogramarse fácilmente para añadir nuevas funciones de control y otras formas de estimulación o modificar las que se establecen por defecto.
- c) El control y configuración del equipo debe realizarse a través de una única pantalla táctil para facilitar la interacción del usuario con el aparato y para implementar interfaces con un aspecto personalizado.
- d) Cada canal debe incluir un sistema de seguridad que detenga la estimulación de forma automática en caso de producirse un consumo excesivo de corriente eléctrica a su salida. El usuario podrá configurar el límite de corriente a partir del cual se producirá la detención del estímulo. Cada canal tendrá capacidad para inyectar una corriente eléctrica máxima de 2A.
- e) Los impulsos eléctricos generados por el nuevo electroestimulador deberán ser pulsos de voltaje cuadrados con una amplitud máxima de 60V (Fig. 45). Dado que en la práctica resultará imposible conseguir una onda cuadrada ideal debido a los retardos propios de una implementación *hardware*, se deberá exigir que los tiempos de transición  $T_{OFF-ON}$  y  $T_{ON-OFF}$  sean lo suficientemente despreciables como para que los pulsos mantengan una forma cuadrada aceptable. Para este proyecto, se especifica que esos tiempos no superen los 50 $\mu$ s.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

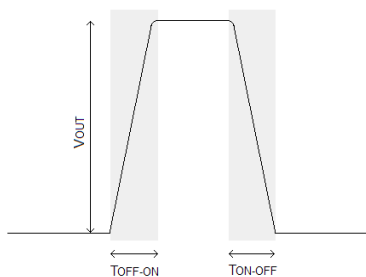


Figura 45 | Forma de onda de los impulsos eléctricos.

- f) Por defecto, el equipo debe generar dos tipos de señales de estimulación diferentes: señales de pulsos (Fig. 46) y señales de trenes de pulsos (Fig. 47).



Figura 46 | Forma de onda de una señal de pulsos.

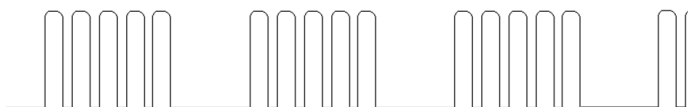


Figura 47 | Forma de onda de una señal de trenes de pulsos.

- g) Los parámetros que podrá configurar el usuario para las señales de pulsos serán:

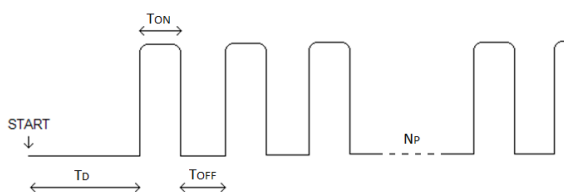


Figura 48 | Parámetros configurables para una señal de pulsos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Parámetro	Descripción	Min.	Máx.	Resolución	Uds.
$V_{OUT}$	Amplitud de los pulsos	0,001	60	0,001	V
$I_{OUT}$	Corriente de salida por canal	0,01	2	0,01	A
$T_D$	Tiempo de retardo	0	600	0,001	s
$T_{ON}$	Ancho de los pulsos	0,001	600	0,001	s
$T_{OFF}$	Tiempo entre pulsos	0,001	600	0,001	s
$N_P$	Número de pulsos	1	1000	1	Pulsos

Tabla 5 | Parámetros y valores configurables para una señal de pulsos.

- h) Los parámetros que podrá configurar el usuario para las señales de trenes de pulsos serán:

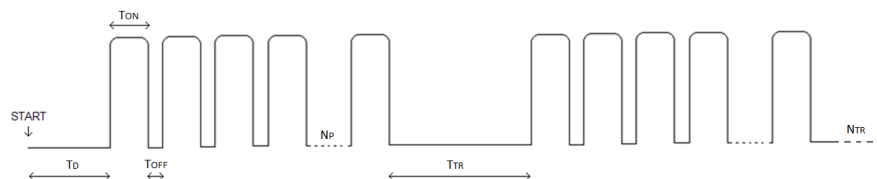


Figura 49 | Parámetros configurables para una señal de trenes de pulsos

Parámetro	Descripción	Min.	Máx.	Resolución	Uds.
$V_{OUT}$	Amplitud de los pulsos	0,001	60	0,001	V
$I_{OUT}$	Corriente de salida por canal	0,01	2	0,01	A
$T_D$	Tiempo de retardo	0	600	0,001	s
$T_{ON}$	Ancho de los pulsos	0,001	600	0,001	s
$T_{OFF}$	Tiempo entre pulsos	0,001	600	0,001	s
$N_P$	Número de pulsos por tren	1	1000	1	pulsos
$T_{TR}$	Tiempo entre trenes de pulsos	0,001	600	0,001	s
$N_{TR}$	Número de trenes	1	1000	1	Trenes

Tabla 6 | Parámetros y valores configurables para una señal de trenes pulsos.

- i) Cada canal debe contar con al menos una salida para señales digitales de sincronización que permitan coordinar la estimulación con otros dispositivos de laboratorio.
- j) El equipo debe contar con una memoria interna para guardar la configuración de las señales.
- k) El equipo debe tener la opción de estimular con una única señal o de concatenar automáticamente varias señales que estén almacenadas en la memoria interna.
- l) La construcción del equipo debe ser totalmente modular de manera que los distintos canales del estimulador sean independientes y puedan sustituirse fácilmente en caso de avería. Asimismo, el equipo debe permanecer operativo incluso cuando se retiren uno o varios canales.
- m) El chasis del equipo debe ser robusto y con un grado de protección suficiente con motivo de evitar que entren líquidos en su interior.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/06/2017 14:20:25

RICARDO BORGES JURADO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 14:34:34

MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 16:48:37

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:35:59

## 2.2.2. Arquitectura funcional básica.

*Una visión general.*

La estructura funcional básica del nuevo electroestimulador CANStim-8 está formada por dos bloques básicos: Unidad de Control Principal y Canales de Estimulación (Fig. 50).

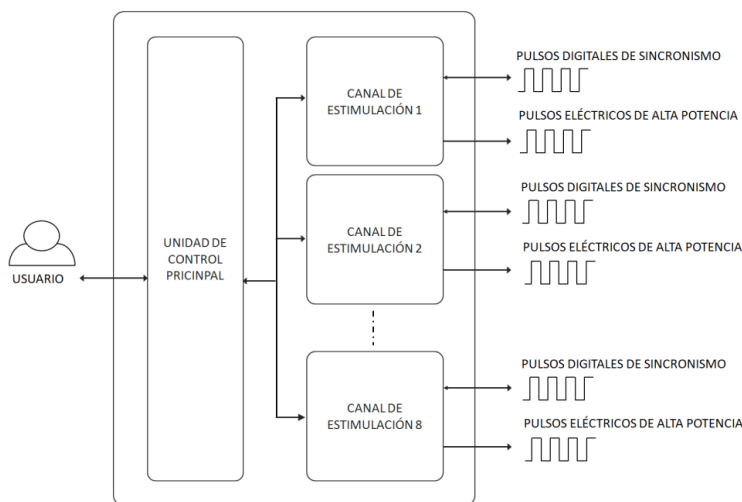


Figura 50 | Diagrama de bloques de la arquitectura funcional básica del electroestimulador CANStim-8

Cada uno de los bloques tiene asignada la ejecución de una o varias tareas específicas, y su diseño e implementación se ha realizado siguiendo una metodología *hardware/software*. En otras palabras: la implementación física de cada bloque supuso el diseño de un soporte electrónico con prestaciones suficientes para desarrollar las diferentes tareas de manera eficiente, y para ello, fue necesario complementarlo con programas software (firmware) que gestionan el control de los dispositivos electrónicos programables que estos incluyen.

## 2.2.3. La Unidad de Control Principal.

La Unidad de Control Principal es la encargada de gestionar el funcionamiento global del equipo. Sus funciones principales consisten en interactuar con el usuario, calcular y almacenar los parámetros que definen las señales de estímulo, transferir esta información a los canales y detectar incidencias que sucedan durante el funcionamiento del equipo. A continuación se describe el diseño y la implementación *hardware/software* de esta unidad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



### 2.2.3.1. Diseño e implementación *hardware*.

De acuerdo con las especificaciones del apartado 2.2.1, la interacción entre el usuario y el CANStim-8 debe realizarse a través de una pantalla con panel táctil. Además, el equipo debe contar con memoria interna para almacenar la configuración de varias señales. También se mencionó que el funcionamiento del nuevo electroestimulador debe poder reprogramarse fácilmente para añadir mejoras y prestaciones personalizadas. Por tanto, cumpliendo con estos requisitos, se definió la siguiente arquitectura *hardware* (Fig. 51).

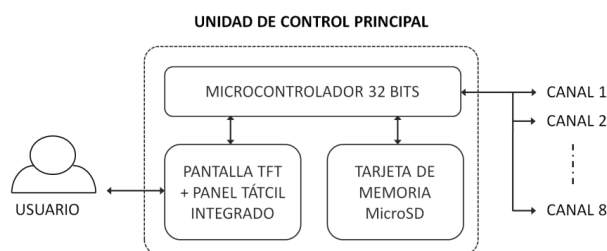


Figura 51 | Diagrama de bloques de la Unidad de Control Principal del CANStim-8.

Su implementación electrónica se llevó a cabo con el kit de desarrollo *Mikromedia Board for PIC32* (Fig. 52, Mikroelektronika, Serbia). Este kit resultó ser una solución ideal, pues tiene integrado en un microcontrolador, una pantalla TFT con panel táctil y un *slot* para tarjetas de memoria MicroSD, entre otras cosas.

Particularmente, este kit está especialmente diseñado para explotar las prestaciones del microcontrolador PIC32MX460F512L (Microchip Technology Inc. USA) y pesar de la cantidad de periféricos ofrece, en este proyecto solo son relevantes aquellos componentes relacionados con el monitor TFT, el panel táctil, el *slot* de tarjetas MicroSD, los pines de expansión y, claro está, el microcontrolador. [Puede consultar más características técnicas de este *kit* en [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)].

Sin embargo, aún a riesgo de no aprovechar con totalidad la versatilidad que ofrece este kit de desarrollo, resulta evidente que su diseño compacto y altamente integrado lo convierten en una solución rápida, eficaz y económica para este trabajo. A continuación, se describen aquellas partes que son de interés para el diseño del nuevo electroestimulador.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

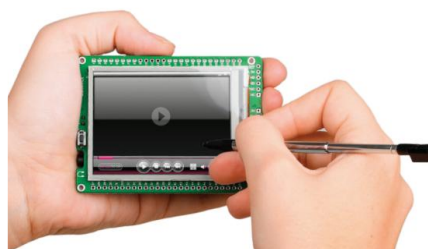
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 52 | Mikromedia Board for PIC32.** 01) Pines de expansión. 02) Monitor TFT con panel táctil de 320 x 240 píxeles. 03) Conector USB MINI-B. 04) Conector para batería de Litio. 05) Conector de 3.5mm para auricular. 07) Memoria Flash. 08) Codificador/decodificador MP3 estéreo. 09) Botón de Reset. 10) Microcontrolador PIC32MX460F512L. 11) Acelerómetro. 12) Oscilador. 13) LED de alimentación. 14) Slot para tarjeta MicroSD. 15) Conector ICD2/3. 16) Conector Mikroprog. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com).

El Monitor TFT con panel táctil integrado.

El kit de desarrollo *Mikromedia Board for PIC32* incluye un monitor TFT de 4 pulgadas (resolución de 320 x 240 píxeles) con un panel táctil resistivo integrado (Fig. 53). Juntos, constituyen una herramienta ideal para el diseño de interfaces orientadas a la monitorización y control de equipos, aumentando las posibilidades de comunicación entre el usuario y el sistema. Gracias a esta interfaz táctil, es posible eliminar multitud de controles analógicos, como potenciómetros e interruptores del panel frontal del estimulador, lo que permite realizar un diseño más compacto, integrado y simple. Además, dado que la configuración y el aspecto del display son totalmente programables, pueden implementarse interfaces totalmente personalizadas y con una gran variedad de funciones.

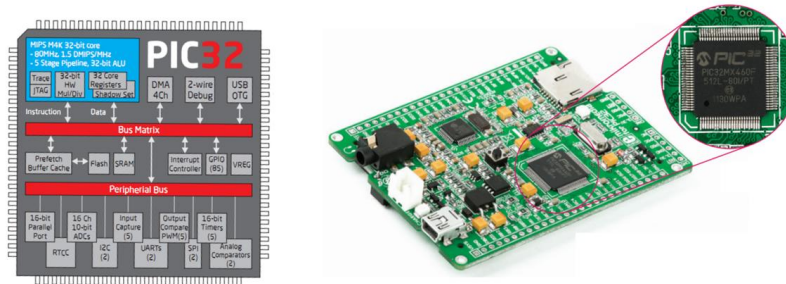


**Figura 53 | Interfaz de usuario.** El monitor tiene una capacidad de 262.000 colores diferentes. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## El microcontrolador de 32 bits

El componente principal de este kit de desarrollo es el microcontrolador de 32 bits PIC32MX460F512L (Fig. 54). Este microcontrolador cuenta con la ventaja añadida de que dentro del mismo chip, están integrados multitud de módulos con distintas características funcionales (canales DMA, *timers*, comparadores, comunicaciones tipo serie como UART, USB, I<sup>2</sup>C, SPI, etc.). Por tanto, este microcontrolador no solo destaca por su alta capacidad computacional, sino también por su adaptabilidad para abordar diseños electrónicos con variedad de prestaciones.



**Figura 54 | Microcontrolador PIC32MX460F512L.** A) Diagrama de bloques que representa los diferentes módulos que componen el microcontrolador. B) Ubicación del microcontrolador en el kit *Mikromedia Board for PIC32*. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)

## Los pines de expansión.

El *kit* de desarrollo dispone de dos filas verticales de 26 pines dispuestos a ambos lados de la placa (Fig. 55). Estos pines están conectados con los distintos *pads* del microcontrolador, por lo que se dispone de total acceso a los módulos internos del PIC. Lógicamente, estas conexiones se emplean cuando se desea establecer un control de un periférico que no está implementado en el *kit*.

Particularmente, en este proyecto se han utilizado los pines de expansión para comunicar la Unidad de Control Principal con los Canales de Estimulación. Esta comunicación se ha implementado vía SPI (*Serial Peripheral Interface*) por considerarlo un protocolo de comunicación robusto y muy fácil de manejar con las librerías de programación del PIC.

El bus SPI, es un bus de comunicaciones serie que utiliza dos líneas para la transmisión de datos, SDI (*Serial Data In*) y SDO (*Serial Data Out*), una línea de reloj SCK (*Shift Clock*) y tantas líneas de habilitación CS (*Chip Select*) como periféricos participen en la comunicación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

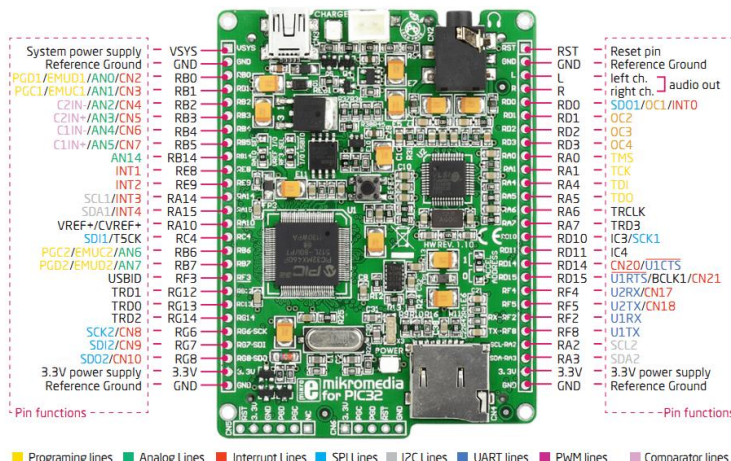


Figura 55 | Mapa de pines del kit Mikromedia Board for PIC32. Imagen tomada de www.mikroe.com.

Por este motivo, en este proyecto solo interesan aquellos pines de expansión que guarden relación con alguno de los dos módulos SPI que incluye el microcontrolador. En este caso, se han utilizado los pines SDI1, SD02 y SCK1. Sin embargo, las líneas de habilitación CS no están incluidas en este bloque, por lo que se ha utilizado el módulo GPIO (*General Purpose In/Out*) para implementarlas. En la tabla 7 se muestran los pines que han sido asignados para habilitar la comunicación con cada canal del electroestimulador.

CS	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7	Canal 8
Pin	RG12	RB3	RB14	RB2	RB0	RB8	RB9	RB1

Tabla 7 | Pines asignados a las líneas de habilitación SPI de cada canal.  
CS = '1' → inhabilitada. CS = '0' habilitada.

El slot para tarjetas MicroSD.

El kit dispone de una ranura para insertar tarjetas de memoria microSD (*micro Secure Digital*) con diferente capacidad de almacenamiento (Fig. 56). Esta ranura conecta la tarjeta directamente con el segundo módulo SPI disponible en el microcontrolador a través de los pines SDI2, SD02, SCK2 (RF13 se utiliza como línea de habilitación CS de la tarjeta). Gracias a esta prestación, el kit ofrece la opción de almacenar una gran cantidad de datos de manera externa, ahorrando de este modo memoria interna del microcontrolador, de forma realmente fácil gracias a las librerías de programación que ofrece el fabricante de este kit.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

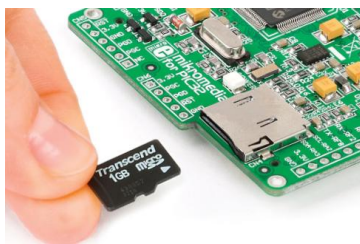


Figura 56 | Slot para tarjetas de memoria MicroSD del kit *Mikromedia Board for PIC32*. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com).

En el caso de este proyecto, se ha hecho uso de una tarjeta MicroSD con 8GB de capacidad y con formato FAT (*File Allocation Table*), versión FAT32, para almacenar la configuración de diferentes señales de estimulación

#### Alimentación.

De acuerdo con las especificaciones técnicas del fabricante, el kit se alimenta a través de un conector USB tipo mini B (Fig. 57) y con una tensión máxima de 5V. Internamente, diferentes reguladores de tensión instalados en el *kit*, adecuan los niveles de voltaje a las condiciones particulares de cada componente.

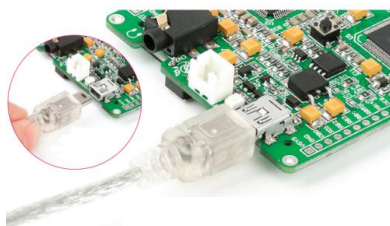


Figura 57 | Suministro eléctrico del kit *Mikromedia Board for PIC32* a través del conector USB mini tipo B. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)

#### 2.2.3.2. Diseño e implementación *software*.

El desarrollo de la Unidad de Control Principal no estaría completo sin la implementación del programa *firmware* para el PIC32. En este caso, el programa se encarga de gestionar el funcionamiento general de todo el equipo, incluyendo la generación de los gráficos para la interfaz visual de la pantalla, el controlador para el panel táctil y el almacenamiento de datos en la tarjeta MicroSD.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Se ha prestado mucho interés en desarrollar una aplicación completa, eficiente y lo más óptima posible. En esta sección, no se entra en detalles sobre la edición del programa, pues explicar el código resulta muy engorroso y en la mayoría de los casos no aporta información significativa. Aún así, el funcionamiento básico se muestra en el diagrama de flujo de la figura 58. Por otro lado, en la *Guía de Usuario* del apéndice II también se explica, paso por paso, el funcionamiento de la aplicación que se ha desarrollado. Además, los ficheros con el código fuente están incluidos en el CD que acompaña a esta memoria.

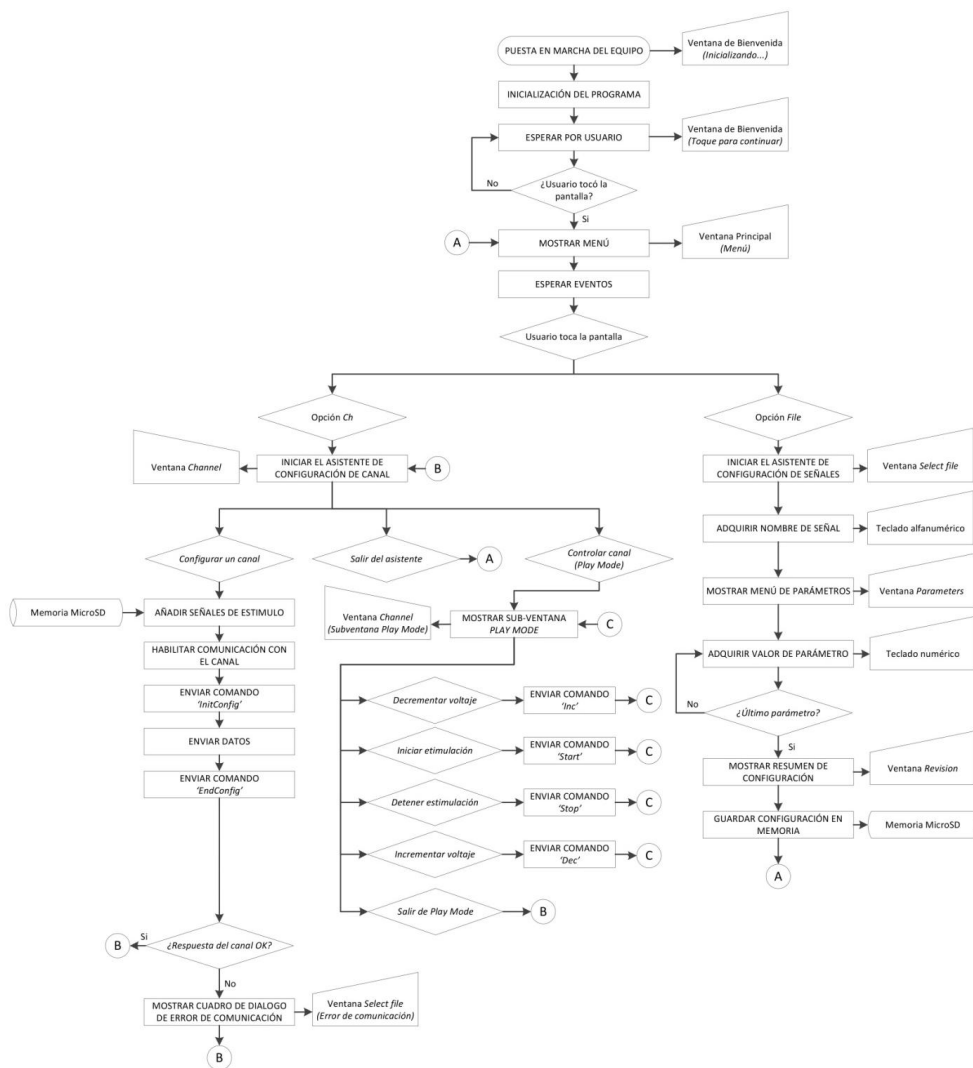


Figura 58 | Diagrama de flujo del programa firmware de la Unidad de Control Principal.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## 2.2.4. Canales de Estimulación.

Los Canales de Estimulación son los encargados de generar la señal de pulsos eléctricos para estimular las preparaciones biológicas. Su funcionamiento está gestionado por las Unidades de Control Secundario (Fig. 59), que se encargan de la comunicación con la Unidad de Control Principal, generar pulsos eléctricos de pequeña señal, generar y atender las señales de sincronismo y de detectar incidencias que sucedan en el funcionamiento interno del canal. Además, estas unidades operan de forma conjunta con las Unidades de Potencia y las Unidades de Protección. En particular, las Unidades de Potencia se encargan de amplificar los pulsos eléctricos y de suministrar la corriente eléctrica necesaria para estimular las preparaciones biológicas con la energía suficiente. Por otro lado, las Unidades de Protección son las responsables de proteger al equipo, a las preparaciones biológicas y al usuario de sufrir daños por un exceso de corriente eléctrica durante un estímulo. Su misión consiste en detectar la sobrecorriente y, en caso de suceder, desconectar la salida del canal e informar a la Unidad de Control Secundario para que detenga la estimulación automáticamente. Con todo, se consigue que los Canales de Estimulación operen de forma totalmente independiente del resto, por lo que, una vez configurados por la Unidad de Control Principal, se manejan como si cada uno fuera un electroestimulador en sí mismo. A continuación se describe el diseño y la implementación *hardware/software* de los canales.

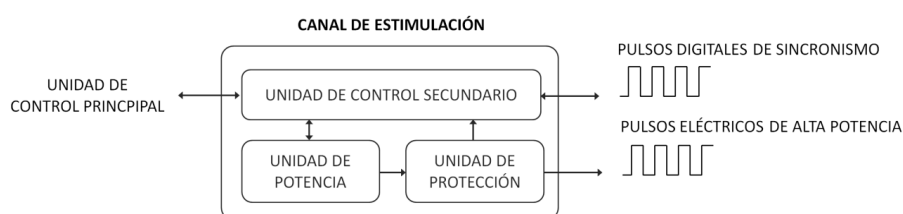


Figura 59 | Diagrama de bloques de Los Canales de Estimulación del CANStim-8.

### 2.2.4.1. Diseño e implementación *hardware*.

#### 2.2.4.1.1 La Unidad de Potencia.

El diseño de este módulo *hardware* está dividido en dos etapas (Fig. 60): por un lado, se ha implementado un amplificador de tensión para elevar la amplitud de los pulsos de pequeña señal hasta un máximo de 60V y, por otro, una etapa de potencia que suministra la corriente eléctrica suficiente para estimular las preparaciones biológicas sin que el equipo sufra daños.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

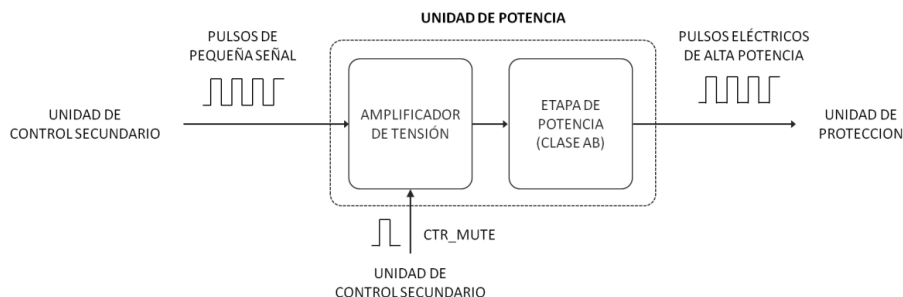


Figura 60 | Diagrama de bloques de la Unidad de Potencia de los canales.

En los apartados siguientes, se describen las características de diseño junto con algunos de los aspectos técnicos más relevantes de este módulo. Para interpretar correctamente el contenido de estos apartados, es aconsejable consultar el esquema eléctrico CANStim8.E1. Véase el apéndice V.

#### El Amplificador de tensión.

El componente principal de esta primera etapa es el integrado LME49830TB (National Semiconductor, USA). Básicamente, se trata de un amplificador operacional fabricado con tecnología *mosfet* y diseñado para operar con altos niveles de voltaje. El fabricante recomienda este componente como amplificador de señales de audio con alta fidelidad y gran potencia de salida. Sin embargo, a pesar de las recomendaciones, sus características técnicas indican que también es un excelente amplificador de pulsos y, por lo tanto, una solución ideal para el diseño del estimulador.

Voltaje y corriente de salida. Según la hoja de características de este componente, el rango máximo de operación es de  $\pm 100V$ , lo cual proporciona margen suficiente para generar pulsos de hasta 60V de amplitud. Sin embargo, la máxima corriente de salida no supera los 56 mA, valor que apenas se acerca a los 2A que debe ser capaz de suministrar el equipo. Por este motivo, el integrado ya viene diseñado para incorporar una etapa de potencia a su salida, lo que permite inyectar suficiente corriente a la carga sin provocar daños en el componente.

Velocidad de respuesta. Dado que la intención es utilizar este integrado como amplificador de pulsos y no de audio, debe garantizarse que la velocidad de respuesta del componente sea lo suficientemente alta como para generar una señal de salida que mantenga la forma cuadrada de los pulsos (Fig. 61).

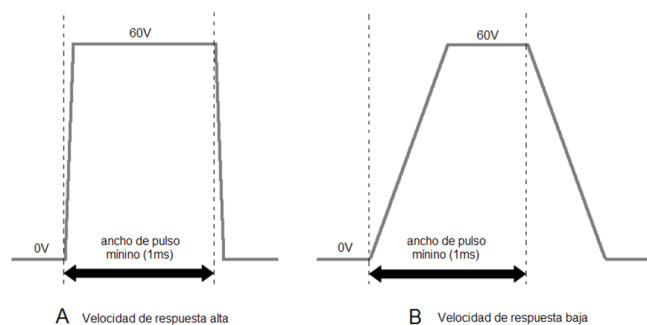
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59





**Figura 61 | Relación de la velocidad de respuesta del amplificador y la forma de onda de los pulsos. A)**

**Velocidad de respuesta alta:** Cuando el tiempo de respuesta del amplificador supone un porcentaje pequeño del ancho de pulso mínimo, se considera que la forma de onda cuadrada es aceptable. **B) Velocidad de respuesta baja:** Si el tiempo de respuesta del amplificador supone un alto porcentaje del ancho de pulso mínimo, la forma cuadrada no es aceptable.

En la ficha técnica, la velocidad de respuesta se nombra como *slew rate* y su valor es de  $39\text{V}/\mu\text{s}$ . Este valor indica que el componente es capaz de variar su voltaje de salida de 0 a  $39\text{V}$  en un  $1\ \mu\text{s}$ . Haciendo una aproximación lineal, se tiene una idea de cuánto tiempo tarda el integrado en variar su tensión de salida, en el peor de los casos, de 0 a  $60\text{V}$ . En este caso, el tiempo aproximado es de  $1,54\ \mu\text{s}$ .

Para evaluar si esta velocidad de respuesta es suficiente, se debe tener en cuenta el mínimo ancho de pulso  $T_{ON}$  que según las especificaciones del apartado 2.2.1 es de  $1\text{ms}$ . Realizando el cálculo, se comprueba que para los pulsos de mayor amplitud, el tiempo de respuesta es un  $0,154\%$  del ancho de pulso mínimo. Por lo tanto, el integrado es perfectamente capaz de mantener la forma de onda cuadrada de los pulsos, incluso en el peor de los casos.

Esquema eléctrico. El esquema eléctrico que se ha diseñado para este módulo corresponde con el mismo circuito que recomienda el fabricante en la hoja de características del integrado LME49830TB. Básicamente, este circuito es un kit de prueba para comprobar el funcionamiento del componente como amplificador de audio. Por lo tanto, el objetivo es convertir este kit en un amplificador de pulsos. Para ello, solo hay que eliminar del esquema todos los componentes relacionados con el acondicionamiento de señales de audio, tales como filtros de entrada para la continua, filtros para limitar el rango de frecuencias, etc. Una vez hecho esto, este kit de prueba queda reducido a un amplificador operacional en configuración no inversora, un pequeño circuito para regular el voltaje de *offset* y la etapa de potencia que se comenta más adelante.

Ganancia. Puesto que el integrado está configurado como un amplificador no inversor, la ganancia viene dada por la ecuación:

$$Av = \frac{V_{OUT}}{V_{IN}} = 1 + \frac{R_F}{R_I} \quad (\text{V/V})$$

El fabricante recomienda establecer una ganancia superior a  $26\text{dB}$  para garantizar un funcionamiento estable del componente. Haciendo caso de esta recomendación, se ha definido una ganancia de  $30$  ( $29,5\text{dB}$ ). Esto implica que para generar pulsos de  $60\text{V}$ , la máxima amplitud de la señal

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

de entrada al amplificador no debe superar los 2V. Como se verá más adelante, esta condición está regulada por la UCS.

Por otro lado, las especificaciones técnicas también advierten que para mejorar la inmunidad al ruido, deben utilizarse resistencias de bajo valor óhmico. En este caso,  $R_F$  es de  $7k\Omega$  y  $R_I$  de  $240\Omega$ . Además, se ha preferido usar resistencias con un 1% de tolerancia para evitar variaciones significativas en el valor de la ganancia.

Circuito de control para el voltaje de *offset*. Este circuito permite regular el voltaje de *offset* a la salida del amplificador. El voltaje de *offset* se utiliza para polarizar los transistores de la etapa de potencia y para ello, solo se tiene que ajustar el potenciómetro  $R_{BIAS}$  hasta alcanzar el nivel de tensión adecuado. El rango de tensiones para polarizar la etapa de potencia es de 0 a 16V, por lo que se dispone de mucha libertad para elegir los *mosfet* de salida. También se da el caso que este circuito viene recomendado en la hoja de características del LME49830TB.

Función *mute*. El integrado LME49830TB incluye una función *mute* para habilitar o inhabilitar la salida del amplificador. En este sentido, activar o desactivar el componente dependerá de la cantidad de corriente que circule por su pin 2. Por ejemplo, para inhabilitar el amplificador debe circular una corriente inferior a  $100\mu A$ . Esto se consigue cortocircuitando el pin 2 con la masa del sistema. Por recomendación del fabricante, se ha colocado el condensador  $C_M$  de  $47\mu F$  entre el pin 2 y masa para reducir posibles fluctuaciones de tensión durante la transición del estado activo al inactivo.

Por otro lado, si la corriente que circula por el pin 2 está entre  $130\mu A$  y  $2mA$ , el componente se activará y se podrá ver señal a la salida del amplificador. Esto se consigue conectando el pin 2 con una fuente de alimentación  $V_{MUTE}$  a través de la resistencia  $R_M$ , de manera que la corriente que circula está determinada por la siguiente ecuación (esta ecuación viene especificada en la hoja de características del integrado LME49830TB).

$$I_{MUTE} = \frac{V_{MUTE} - V_{BE}}{1k\Omega + R_M} \text{ donde } V_{BE} \cong 0,7V$$

Para este diseño se ha decidido establecer la corriente de activación en  $154\mu A$  con una fuente  $V_{MUTE}$  5V. Por lo tanto, el valor de  $R_M$ , de acuerdo con la ecuación anterior, es de  $27k\Omega$ . En consecuencia, activar o desactivar el amplificador dependerá del valor de  $V_{MUTE}$ . Si  $V_{MUTE}$  es 0V, el componente permanecerá inhabilitado. Si por el contrario  $V_{MUTE}$  es 5V, se activará. En ambos casos, el nivel de voltaje lo establece la UCS.

Esta función *Mute* se utiliza, sobre todo, para apagar el amplificador en situaciones de emergencia, como puede ser un exceso de corriente a la salida del estimulador. Además, mantener el integrado inhabilitado mientras el equipo espera para ejecutar una nueva estimulación, reduce enormemente el sobrecalentamiento del componente.

Protección térmica. El LME49830TB cuenta con un pequeño circuito interno para evitar daños por sobrecalentamiento. Cuando la temperatura del componente supera los  $150\text{ }^\circ C$ , este sistema corta, de forma automática, la corriente interna que alimenta al integrado, de manera que la salida del amplificador queda inhabilitada. Solo cuando la temperatura desciende por debajo de  $145\text{ }^\circ C$ , el componente vuelve a retomar su funcionamiento normal.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Como apoyo para este sistema de protección, el fabricante recomienda acoplar un disipador en el encapsulado del integrado para facilitar la transferencia de calor con el aire. Sin embargo, durante el periodo de pruebas, se comprobó que la temperatura del integrado no se eleva de forma significativa, por lo que se decidió no incorporar ningún disipador externo para no ocupar demasiado espacio en la placa de circuito impreso.

#### Etapa de potencia.

Como se comentó anteriormente, la corriente máxima de salida del integrado LME49830TB está muy por debajo de los 2A que debe ser capaz de suministrar el estimulador. Por este motivo, se ha complementado el funcionamiento del amplificador con una etapa de potencia Push-Pull en clase AB (Rashid, M., 2002). De esta manera, el equipo podrá estimular preparaciones de muy bajo valor óhmico si ningún tipo de problemas.

En términos generales, esta clase de etapa de potencia consiste en dos transistores *mosfet*, uno de canal N y otro de canal P, conectados según la configuración de fuente común. En este sentido, el diseño implementado es idéntico al de la etapa de potencia recomendada en la hoja de características del integrado LME49830TB. Particularmente, se ha utilizado el transistor de canal N IRFP240 (Fairchild Semiconductor, USA) y el transistor de canal P IRF9640 (Fairchild Semiconductor, USA), señalados en el esquemático CANStim8.E1 como  $Q_N$  y  $Q_P$  respectivamente.

Sin embargo, no parece lógico implementar una etapa de potencia en clase AB si el estimulador solo trabaja con pulsos de voltaje positivos. La razón se debe a que el integrado LME49830TB está especialmente diseñado para funcionar con este tipo de etapas de salida. Durante los ensayos preliminares sobre *protoboard*, se comprobó que si eliminaba la rama del transistor de canal P, el amplificador dejaba de funcionar correctamente. Aún así, las ventajas que ofrece este integrado compensan, sin ninguna duda, el inconveniente de tener que añadir algunos componentes de más. En consecuencia, la calidad de la señal de salida del estimulador dependerá, en gran medida, de las características técnicas del transistor IRFP240.

Potencia de salida. Según la hoja de características, el transistor IRFP240 admite tensiones de hasta 200V y soporta corrientes de 20A de pico. Obviamente, estas condiciones le permiten manejar sin problemas una señal de 60V de amplitud e inyectar a la carga una corriente máxima de 2A.

Velocidad de respuesta. La velocidad de respuesta del transistor debe ser lo suficientemente alta para continuar manteniendo la forma cuadrada de los pulsos. En principio, el transistor IRFP240 es capaz de conmutar de 0 a 100V en tan solo 77 nanosegundos. Sin embargo, la presencia de capacidades parásitas, provoca que la resistencia de puerta ( $R_{GN}$ ) influya sobre los tiempos de conmutación del transistor. En este caso, cuanto mayor sea la resistencia, más lenta es la respuesta. Por otro lado, esta resistencia también afecta a la estabilidad del circuito. De hecho, se comprobó cómo el funcionamiento del transistor se ve comprometido a medida que disminuye el valor de  $R_{GN}$ . En este caso, la resistencia  $R_{GN}$  es de 200Ω. Este valor garantiza un funcionamiento estable del transistor y, además, establece el tiempo de conmutación de 0 a 60V  $\approx 5\mu s$ , lo cual supone un  $\approx 0.5\%$  del ancho de pulso mínimo (1ms). Este resultado asegura que la etapa de potencia también es perfectamente capaz de mantener la forma cuadrada de los pulsos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Polarización. Uno de los principales inconvenientes de esta clase de etapas de potencia, es que los transistores *mosfet* necesitan un mínimo de tensión de puerta para conducir corriente hacia la carga. Esto provoca una distorsión en la señal de salida conocida como distorsión de cruce por cero. El valor mínimo de voltaje necesario para la conducción del transistor se denomina voltaje umbral ( $V_{TH}$ ) y en el caso del IRFP240 es de 4V. Esto quiere decir que los pulsos que estén por debajo de 4V de amplitud no serán transmitidos a la carga.

Este problema se soluciona manteniendo, de forma continua, un mínimo de tensión en la puerta del transistor, lo que se conoce como tensión de polarización. En este caso, este voltaje se ajusta con el circuito de control *offset* sobre el que se habló en el apartado anterior. El único problema consiste en que el transistor consume potencia incluso cuando no hay señal. Sin embargo, en estas condiciones, el consumo es tan bajo que es perfectamente asumible.

Impedancia de salida. Este tipo de etapas de potencia se caracterizan porque ofrecen una baja impedancia de salida. Normalmente, el valor de esta impedancia lo determina la resistencia entre el drenador y la fuente del transistor en conducción  $R_{DSON}$ . Sin embargo, en este caso también hay que sumar los  $0.1\Omega$  de la resistencia  $R_{E1}$ . En total, teniendo cuenta que la  $R_{DSON}$  del transistor IRFP240 es de  $0.180\Omega$ , la impedancia de salida del estimulador asciende a  $0.280\Omega$  aproximadamente. Cabe señalar que la resistencia  $R_{E1}$  no suele tenerse en cuenta para diseñar este tipo de etapas de potencia. Sin embargo, contribuyen a mantener la estabilidad del transistor. Además, su bajo valor óhmico apenas influye en la corriente de salida, por lo que es ideal para medir la corriente que circula hacia la carga (apartado 2.2.4.1.2).

Linealidad. En este tipo de diseños, el valor óhmico de la carga influye directamente sobre la ganancia en tensión del transistor. En este caso, el factor de ganancia debe mantenerse siempre en 1. Sin embargo, se comprobó que este valor se reduce a medida que la impedancia de la carga disminuye. En consecuencia, la señal de salida presentará mayor distorsión al estimular preparaciones de bajo valor óhmico. Este problema se soluciona con el lazo de realimentación que conecta la salida del estimulador con la entrada del amplificador. Esta solución ayuda a mantener una respuesta lineal del transistor y, por tanto, a reducir la distorsión de la señal de salida.

Protección térmica. Teniendo en cuenta la potencia eléctrica que ha de soportar este componente, es muy posible que, bajo ciertas condiciones, llegue a alcanzar valores elevados de temperatura. Obviamente, esta situación no es recomendable, pues un exceso de temperatura puede llegar a destruir el componente. Por este motivo, se ha decidido acoplar un disipador de calor sobre el encapsulado del transistor, con la finalidad de evitar sobrecalentamientos.

#### 2.2.4.1.2. La Unidad de Protección.

El diseño de este módulo *hardware* está dividido en tres circuitos diferentes (Fig. 62). El primero se encarga de medir la corriente eléctrica a la salida del electroestimulador. El segundo consiste en un comparador de nivel que determina si esa corriente se encuentra por encima del límite de seguridad establecido por el usuario. Y el tercero, es el responsable de desconectar la carga en caso de haberse detectado un exceso de corriente.

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

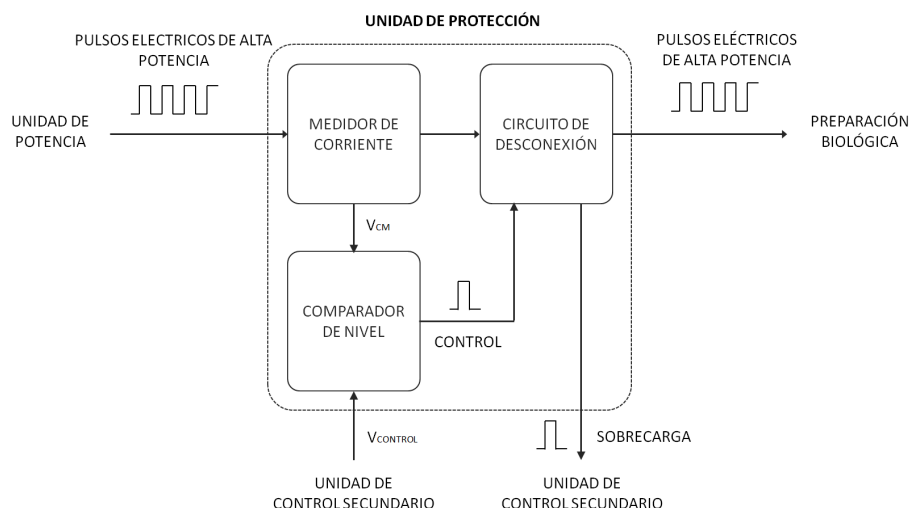


Figura 62 | Diagrama de bloques de la Unidad de Protección de los canales.

En los apartados siguientes, se describen las características de diseño junto con algunos de los aspectos técnicos más relevantes de cada circuito. Para interpretar correctamente el contenido de estos apartados, se recomienda consultar el esquema eléctrico CANStim8.E2 adjunto en el apéndice V.

#### Medidor de corriente.

La forma más inmediata de estimar la corriente instantánea que fluye por la preparación biológica consiste en medir el voltaje de salida y posteriormente aplicar la ley de Ohm.

$$I_{CARGA} = \frac{V_{PULSOS}}{Z_{CARGA}} \quad (A)$$

No obstante, para aplicar este método, es necesario conocer la impedancia de la carga para realizar el cálculo. Sin embargo, la carga es una preparación biológica y su impedancia varía en función de la composición química de las disoluciones, del tipo de tejidos, etc. Por lo tanto, resulta muy complicado conocer el verdadero valor óhmico de la carga en cada caso.

A pesar de ello, existe una solución para calcular la corriente de salida. Al conectar una preparación al equipo, también se conecta en serie con la resistencia  $R_{E1}$ . En consecuencia, por las dos impedancias fluye la misma corriente eléctrica. Por tanto, para conocer la corriente instantánea de salida basta con medir la caída de tensión que tiene lugar en  $R_{E1}$  y aplicar la ley de *Ohm*.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

$$I_{\text{CARGA}} = \frac{V_{\text{RE1}}}{R_{\text{E1}}} = \frac{V_{\text{RE1}}}{0,1} \text{ (A)}$$

El valor de  $R_{\text{E1}}$  es conocido ( $0,1\Omega$ ) e independiente del tipo de preparación que se vaya a estimular. Por lo tanto, solo hay que determinar la caída de tensión  $V_{\text{RE1}}$ .

Para ello, se ha utilizado el amplificador de instrumentación INA111AP (Burr-Brown Corp., USA). Este integrado genera una señal de voltaje directamente proporcional a la diferencia de tensión en bornes de  $R_{\text{E1}}$  y, por tanto, también proporcional a la corriente de salida.

Concretamente, la relación entre la señal de salida y la diferencia de tensión  $V_{\text{RE1}}$  está determinada por la resistencia  $R_{\text{G4}}$ , cuyo valor en el circuito es de  $500\Omega$ . Esto define una relación aproximada de 100 a 1. De esta forma si, por ejemplo, en  $R_{\text{E1}}$  existe una diferencia de voltaje de  $100\text{mV}$  (lo que equivale a  $1\text{A}$  de corriente de salida), a la salida del amplificador se obtendrán  $10\text{V}$ . Este valor de ganancia es el mínimo que recomienda el fabricante para garantizar un funcionamiento estable del componente.

Sin embargo, no es posible conectar los terminales de  $R_{\text{E1}}$  directamente con las entradas  $V_{\text{in}}^+$  y  $V_{\text{in}}^-$  del INA111AP. La razón se debe a que en los bornes de esta resistencia, el voltaje puede alcanzar hasta  $60\text{V}$ , nivel que está muy por encima del máximo voltaje de entrada que soporta el componente. Por este motivo, se ha colocado un divisor de tensión con un factor de atenuación de  $0,1$  entre los bornes de  $R_{\text{E1}}$  y cada entrada del INA111AP. Esto garantiza que, incluso en el peor de los casos, el amplificador de instrumentación no tenga que soportar tensiones de entrada superiores a los  $6\text{V}$ . En consecuencia, la relación entre la corriente que circula por la carga y la señal de voltaje generada por el circuito medidor viene dada por la siguiente ecuación.

$$V_{\text{CM}} = 0,1\Omega \times 0,1 \times 100 \times I_{\text{CARGA}} \rightarrow V_{\text{CM}} = 1 \times I_{\text{CARGA}}$$

Con el siguiente ejemplo se muestra cómo se ha llegado a esta expresión. Para ello, suponiendo el caso más extremo, en el que la corriente instantánea que fluye por la carga es de  $2\text{A}$ . En ese caso, la diferencia de tensión entre los terminales de  $R_{\text{E1}}$  es de:

$$V_{\text{RE1}} = I_{\text{CARGA}} \times 0,1\Omega \rightarrow V_{\text{RE1}} = 2\text{A} \times 0,1\Omega = 0,2\text{V}$$

Ahora, aplicando el factor de atenuación de los divisores de tensión, se obtiene la diferencia de tensión a la entrada del INA111AP:

$$V_{\text{in}}^+ - V_{\text{in}}^- = 0,1 \times V_{\text{RE1}} \rightarrow V_{\text{in}}^+ - V_{\text{in}}^- = 0,1 \times 0,2\text{V} = 0,02\text{V}$$

Finalmente, con el factor de ganancia del amplificador se obtiene que:

$$V_{\text{CM}} = 100 \times (V_{\text{in}}^+ - V_{\text{in}}^-) \rightarrow V_{\text{CM}} = 100 \times 0,02\text{V} = 2\text{V}$$

En resumen, el circuito medidor de corriente genera una señal de voltaje  $V_{\text{CM}}$  con una relación de 1:1 con respecto a la corriente de salida.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

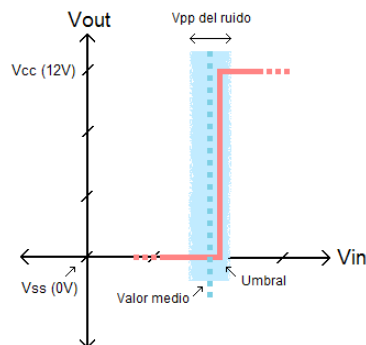
### Comparador de nivel.

Este otro circuito decide cuando desconectar la carga y aislar la salida el equipo. Para ello, el circuito compara la señal de salida  $V_{CM}$  de la etapa anterior con un nivel de tensión definido como *umbral de seguridad* ( $V_{CONTROL}$ ). Este umbral de seguridad lo establece la Unidad de Control Secundario y varía de 0 a 2V en función de la máxima corriente de salida programada por el usuario. El resultado de la comparación determinará si el Circuito de Desconexión debe o no desconectar la carga.

Como se verá más adelante, el Circuito de Desconexión se encarga de desconectar la carga cuando recibe una tensión de 0V en su entrada de control ( $V_{CP}$ ). Por otro lado, para mantener o restablecer la conexión, esta tensión debe ser de 12V.

Por lo tanto, la salida del circuito Comparador de Nivel será 0V cuando la corriente de salida supere el umbral establecido. En caso contrario, su salida permanecerá a 12V.

Por otro lado, hay que obrar con precaución debido al ruido presente en las señales a comparar, ya que provoca fluctuaciones aleatorias en la amplitud de las señales y, si estas fluctuaciones llegan a ser lo suficientemente significativas, podrían provocar errores en la comparación. En la figura 63 se ilustra el efecto que provoca el ruido en un comparador convencional.



**Figura 63 | Efecto del ruido en un comparador de voltaje convencional.** La señal de salida del comparador oscila constantemente entre 0 y 12V como consecuencia de las fluctuaciones de amplitud que causa el ruido.

Como muestra la figura 62, el valor medio de la señal de entrada (señal azul) no supera la tensión umbral del comparador, por lo que la tensión de salida debería de mantenerse en 0V. Sin embargo, las oscilaciones de alta frecuencia que provoca el ruido en la amplitud de la señal, sobrepasan el umbral constantemente y de forma aleatoria. En consecuencia, la salida del comparador está continuamente oscilando entre 0 y 12V de manera totalmente descontrolada. Este efecto se acentúa a medida que aumenta la amplitud pico a pico del ruido y aparece, sobre todo, cuando la amplitud de las señales a comparar está muy próxima la una de la otra. Estas oscilaciones provocarían la conexión y desconexión de la carga de forma fortuita y descontrolada. Obviamente, este no es un comportamiento deseado para un comparador, y menos aún cuando la protección del equipo depende de su funcionamiento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Teniendo esto en cuenta, se decidió implementar un circuito *Schmitt Trigger* en configuración no inversora<sup>21</sup>. Este circuito permite comparar las dos señales, asignar libremente el voltaje de salida en función del resultado de la comparación y minimizar el problema del ruido. Para diseñar el *Schmitt Trigger* no inversor se ha utilizado el amplificador operacional LM358AD (National Semiconductor, USA). El funcionamiento del circuito está determinado por una curva de histéresis como la que se muestra en la figura 64.

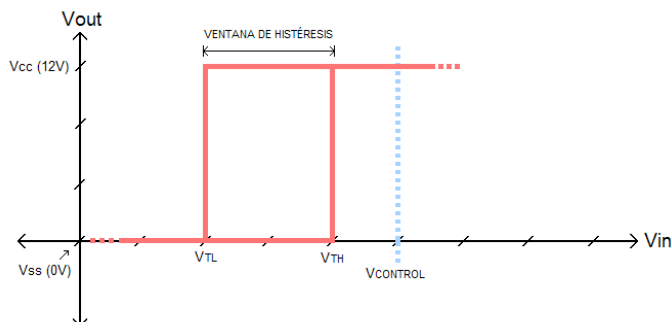


Figura 64 | Curva de histéresis de un circuito *Schmitt Trigger* no inversor.

Su funcionamiento es considerablemente sencillo. Cuando el límite inferior  $V_{TL}$  de la ventana de histéresis sobrepasa el valor de tensión del umbral  $V_{CONTROL}$ , la salida del comparador es igual a la tensión de alimentación negativa  $V_{SS}$ , que en este caso es 0V. Por el contrario, si el límite superior  $V_{TH}$  de la ventana de histéresis está por debajo de la tensión umbral, la salida del comparador será igual a la tensión de alimentación positiva  $V_{CC}$ , es decir, 12V.

En el caso del electro-estimulador, los límites de voltaje  $V_{TL}$  y  $V_{TH}$  varían en función de la corriente de salida. Es decir, dependen de la amplitud de la señal del circuito Medidor de Corriente  $V_{CM}$ . Para calcular estos valores se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$V_{TH} = V_{CM} + \left( \frac{R_{ST1}}{R_{ST1} + R_{ST2}} \right) V_{CC}$$

$$V_{TL} = V_{CM} + \left( \frac{R_{ST1}}{R_{ST1} + R_{ST2}} \right) V_{SS}$$

Donde  $V_{CM}$  varía en un rango de 0 a 2V,  $V_{CC}$  es igual a 12V y  $V_{SS}$  es 0V. Por lo tanto, aplicando estos valores a las ecuaciones anteriores resulta que:

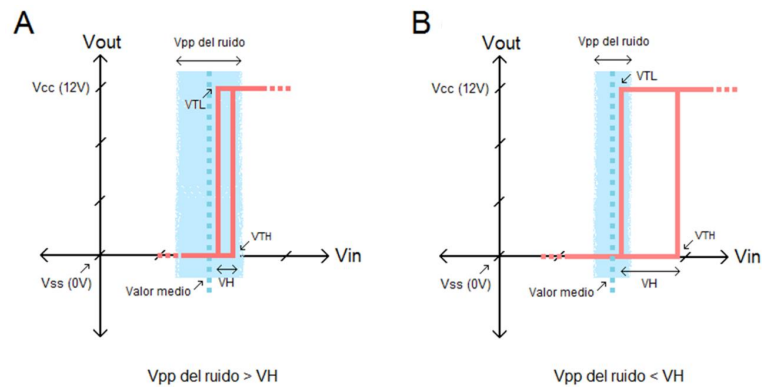
$$V_{TH} = V_{CM} + \left( \frac{R_{ST1}}{R_{ST1} + R_{ST2}} \right) \times 12 \quad \text{y} \quad V_{TL} = V_{CM}$$

Por otro lado, el ancho de la ventana de histéresis, comúnmente conocido como voltaje de histéresis ( $V_H$ ) viene dado por esta otra ecuación:



$$V_H = V_{TH} - V_{TL} = \left( \frac{R_{ST1}}{R_{ST1} + R_{ST2}} \right) \times 12$$

Particularmente, el ancho de la ventana de histéresis es lo que soluciona el problema del ruido mencionado anteriormente. A diferencia de un comparador convencional, el *Schmitt Trigger* presenta dos umbrales,  $V_{TL}$  y  $V_{TH}$ . Por lo tanto, el efecto solo aparecerá si la amplitud pico a pico del ruido llega a superar los dos umbrales a la vez (figura 65A). Para solucionarlo, basta con aumentar el ancho de la ventana lo suficiente como para que el ruido no alcance  $V_{TL}$  y  $V_{TH}$  al mismo tiempo (figura 65B). En resumen, si  $V_H$  es mayor que la tensión de pico a pico del ruido, no habrá problemas.



**Figura 65 | Efecto del ruido en un *Schmitt Trigger*.** **A)** Si la ventana de histéresis es muy estrecha el ruido afecta de la misma forma que en un comparador convencional. **B)** Si aumenta el ancho de la ventana lo suficiente, el ruido no afectará al comportamiento del comparador.

En este caso, se comprobó que la amplitud del ruido no supera los  $100\text{mV}_{pp}$ , por lo que:

$$V_H = \left( \frac{R_{ST1}}{R_{ST1} + R_{ST2}} \right) \times 12 \geq 0,1V \rightarrow 119 \times R_{ST1} \leq R_{ST2}$$

Para configurar  $V_H$  se ha elegido  $R_{ST1}$  ( $R_{21}$  en el esquema CANStim8.E2) de  $1\text{K}\Omega$  y  $R_{ST2}$  ( $R_{22}$  en el esquema CANStim8.E2) de  $118\text{K}\Omega$ . Con estos valores, los límites de voltaje  $V_{TL}$  y  $V_{TH}$  pueden expresarse de la siguiente forma:

$$V_{TH} = V_{CM} + 0,1$$

$$V_{TL} = V_{CM}$$

Por lo tanto, la curva de histéresis queda de la siguiente forma (Fig. 66),

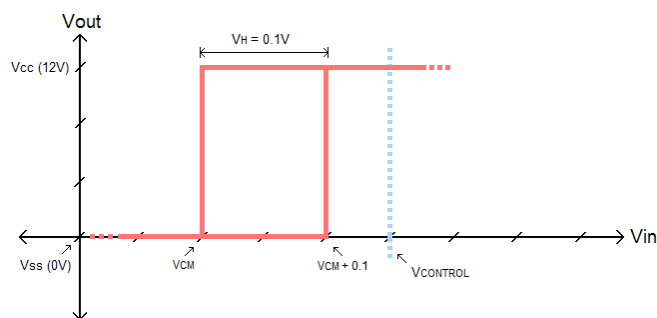


Figura 66 | Curva de histéresis del circuito *Schmitt Trigger* implementado.

En el siguiente ejemplo se muestra el funcionamiento del comparador implementado. Para ello suponga que el usuario ha establecido el límite de corriente en 1A; por lo tanto, la tensión  $V_{\text{CONTROL}}$  será de 1V.

En primer lugar, suponga que la corriente que circula por la carga es inferior al límite establecido, por ejemplo 0.5A. En estas condiciones, la tensión de salida del circuito Medidor de Corriente  $V_{\text{CM}}$  es de 0.5V. Al calcular  $V_{\text{TL}}$  y  $V_{\text{TH}}$  según las ecuaciones anteriores, se comprueba que su valor es de 0.5V y 0.6V respectivamente. En este caso,  $V_{\text{TH}}$  está por debajo de  $V_{\text{CONTROL}}$  así que la salida del Comparador de Nivel será de 12V y no habrá desconexión de la carga (Fig. 67).

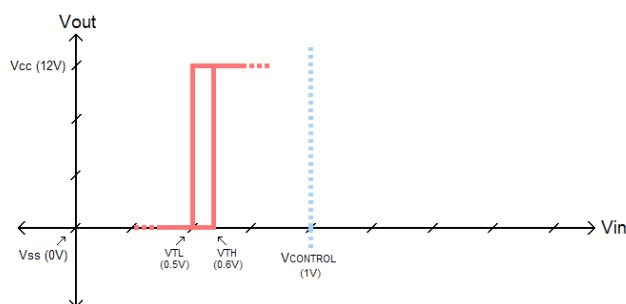
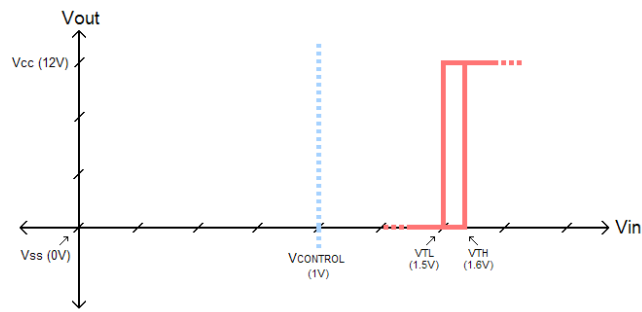


Figura 67 | Funcionamiento del circuito comparador. Fase 1: Al no producirse un exceso de corriente, la salida del comparador es 12V. Por tanto, la carga sigue conectada al equipo.

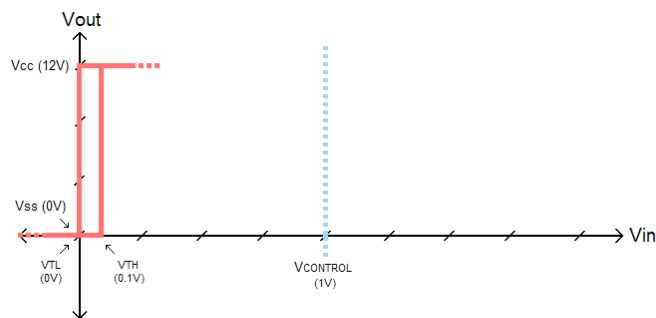
Ahora, suponga que la corriente que circula por la carga es superior al límite establecido, por ejemplo 1.5A. En este otro caso, la tensión de salida del circuito Medidor de Corriente  $V_{\text{CM}}$  es de 1.5V. Ahora, la tensión  $V_{\text{TL}}$  es superior a la tensión  $V_{\text{CONTROL}}$ , con lo cual la salida del comparador será de 0V y producirá la desconexión de la carga (Fig. 68).

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 68 | Funcionamiento del circuito comparador. Fase 2:** Al producirse un exceso de corriente, la salida del comparador es 0V. Esto implica la desconexión inmediata de la carga.

Al desconectarse, la corriente de salida desciende inmediatamente a cero, lo que implica que  $V_{CM}$  es 0V. En consecuencia  $V_{TL}$  es igual a 0V y  $V_{TH}$  a 0.1V. En este momento,  $V_{TH}$  vuelve a estar por debajo de  $V_{CONTROL}$ , con lo que la salida del comparador será nuevamente de 12V (Fig. 69). En este instante, el circuito de desconexión permite restablecer la conexión con el pulsador de rearme.



**Figura 69 | Funcionamiento del circuito comparador. Fase 3:** Al desconectarse la carga, la corriente de salida es 0A, por lo que la salida del comparador vuelve a ser de 12V. Esto implicaría volver a conectar la carga con el equipo, sin embargo, permanecerá desconectada hasta que el usuario accione el pulsador de rearme del circuito de desconexión.

### Circuito de desconexión.

El objetivo de este circuito consiste en desconectar la carga y mantener el equipo aislado en caso de producirse un consumo excesivo de corriente. Una vez desconectada, el circuito solo permitirá restablecer la conexión con el equipo si el usuario acciona un pulsador de rearme.

Para conectar la carga con el equipo se ha utilizado un relé, etiquetado U12 en el esquema CANStim8.E2. El interruptor de este relé permanecerá cerrado siempre que no circule corriente eléctrica por su bobina. En caso contrario, el interruptor se abre y el equipo queda totalmente aislado

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

de la carga. Además, y para mayor seguridad, una vez se haya producido la desconexión, el relé debe mantener su interruptor abierto hasta que el usuario considere seguro volver a conectar la carga. Para ello, la corriente eléctrica que circula a través de la bobina debe permanecer constante. Por este motivo, se ha implementado un circuito que permite inyectar una corriente eléctrica constante a la bobina de U12 una vez se haya producido la desconexión. Este circuito se conoce comúnmente como circuito de enclavamiento y su montaje resulta realmente sencillo.

Para construir un circuito de enclavamiento es necesario otro relé, etiquetado como U8 en el esquemático. Este relé es la pieza clave del funcionamiento del circuito, pues es el encargado de mantener un flujo continuo de corriente por el solenoide de U12 después de producirse la desconexión de la carga. Las bobinas de ambos relés están conectadas en serie, por lo que los dos interruptores actúan de forma conjunta. Al contrario que U12, el interruptor de U8 es normalmente abierto.

El funcionamiento del circuito es bastante simple y se puede dividir en tres estadios: fase inicial o de reposo, fase de enclavamiento y fase de rearme. A continuación se describen las condiciones del circuito en estas tres etapas.

En su fase inicial, el circuito de enclavamiento permanece en estado de reposo si no se detecta ningún exceso de corriente. En este caso, la salida del Comparador de Nivel es de 12V. Esto implica que el transistor Q<sub>1</sub> permanece en conducción y por lo tanto, la señal etiquetada como *sobrecarga* será de 0V. Esta señal informa a la Unidad de Control Secundario de que el funcionamiento del equipo es normal. Al mismo tiempo, el transistor Q<sub>2</sub> está en corte y no permite el paso de corriente. En esta situación, la corriente eléctrica no puede fluir por las bobinas de ambos relés. Al no haber corriente, el interruptor de U8 está abierto y el interruptor de U12 está cerrado, por lo que la carga permanece conectada al equipo (Fig. 70)

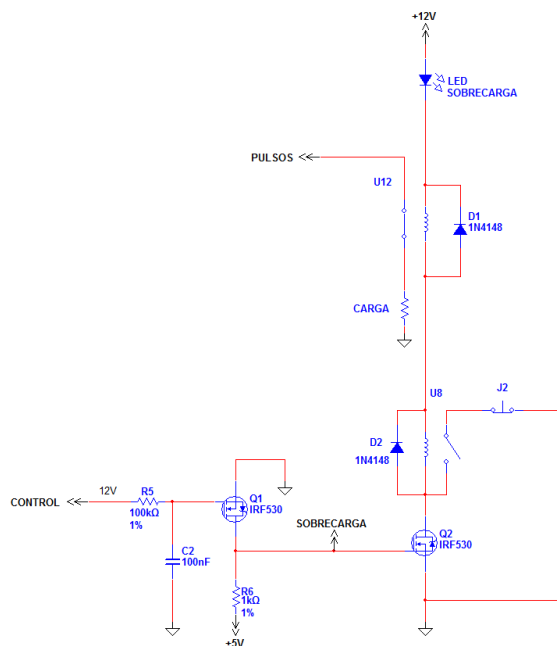


Figura 70 | Circuito de desconexión. Fase inicial o de reposo.

Ahora suponga que el sistema ha detectado un exceso de corriente. En ese caso, la salida del Comparador de Nivel es de 0V y por lo tanto el transistor  $Q_1$  está en corte. Como consecuencia, la señal *sobrecarga* será de 5V. Este cambio en la señal *sobrecarga* informa a la Unidad de Control Secundario de que se ha producido un exceso de corriente a la salida del estimulador. Al mismo tiempo, esta señal obliga al transistor  $Q_2$  a entrar en conducción. Por lo tanto, la corriente puede fluir a través de las bobinas de los relés, provocando la desconexión de la carga, el cierre del interruptor de U8 y el encendido del LED indicador. En este instante la corriente que circula por los relés sigue dos caminos: uno a través de  $Q_2$  y otro a través del interruptor de U8 y el pulsador J2 (Fig. 71).

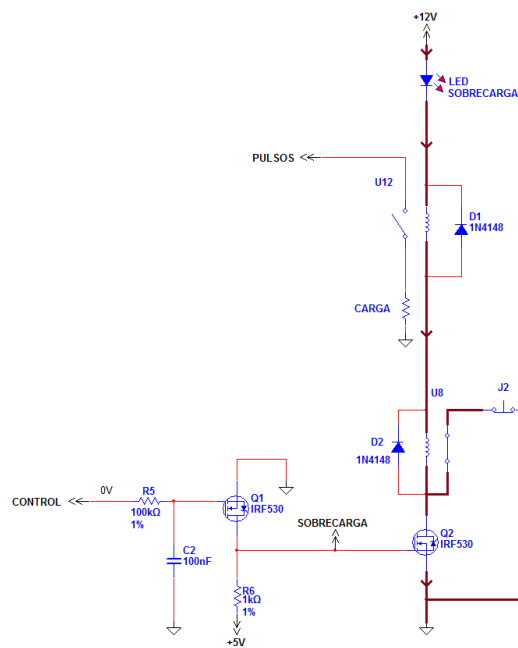


Figura 71 | Circuito de desconexión. Fase de enclavamiento

En el instante en el que la carga se desconecta, el estimulador deja de inyectar corriente, por lo que la señal del Comparador de Nivel vuelve a ser 12V. La señal *sobrecarga*, a su vez, vuelve a ser 0V y el transistor  $Q_2$  a estar nuevamente en corte. Sin embargo, el interruptor de U12 sigue abierto y la carga desconectada. Esto se debe a que la corriente que alimenta a las bobinas de U12 y U8 continúa fluyendo por el camino a tierra que ofrece el interruptor de U8. En este momento, el circuito se encuentra en su estado de rearme (Fig. 72).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/06/2017 14:20:25

RICARDO BORGES JURADO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 14:34:34

MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 16:48:37

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:35:59

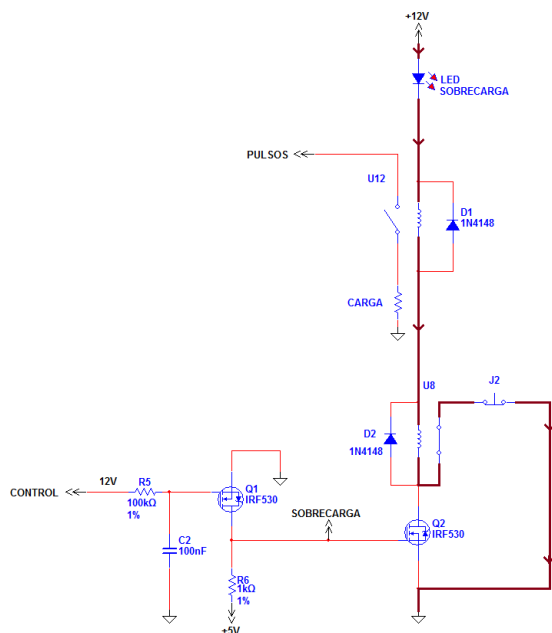


Figura 72 | Circuito de desconexión. Fase de rearme.

Finalmente, cuando el usuario considere que es seguro volver a conectar la carga, solo tiene que romper el flujo de corriente que mantiene activos los dos relés. Para ello, tan solo debe accionar el pulsador de rearme J2. Al pulsar J2, se rompe el circuito, y dado que Q<sub>2</sub> está en corte, la corriente que mantiene activos a los dos relés desaparece. En este momento, los relés vuelven a su estado inicial (Fig. 70) y se apaga el LED indicador. La carga vuelve a estar conectada con el equipo.

Por último cabe mencionar que durante los ensayos preliminares en la *protoboard*, se comprobó que en el momento en que se detecta un exceso de corriente, la salida del Comparador de Nivel pasa de 12V a 0V rápidamente. De forma casi inmediata, el sistema desconecta la carga y la corriente desaparece, por lo que esta señal vuelve a cambiar de 0V a 12 voltios en muy poco tiempo. Al cambiar de estado tan rápido, el relé U8 no dispone de tiempo suficiente para cerrar su interruptor, por lo que no se producía el enclavamiento de U12. Para solucionar este problema, se ha incluido un filtro RC en la puerta de Q<sub>1</sub>. De esta manera, los cambios en la señal de salida del comparador se ralentizan y ahora U8 cuenta con tiempo suficiente para establecer el enclavamiento de U12.

### 2.2.4.1.3. La Unidad de Control Secundario.

El diseño de este módulo *hardware* está dividido en tres bloques o secciones (Fig. 73): el primer bloque consiste en un microcontrolador de 16 bits, que se encarga de gestionar el funcionamiento general del canal. El segundo bloque es responsable de controlar de la Unidad de

Protección, mientras que el tercero se encarga de generar los pulsos de pequeña señal que luego serán amplificados por la Unidad de Potencia para aplicarlos directamente sobre la preparación biológica.

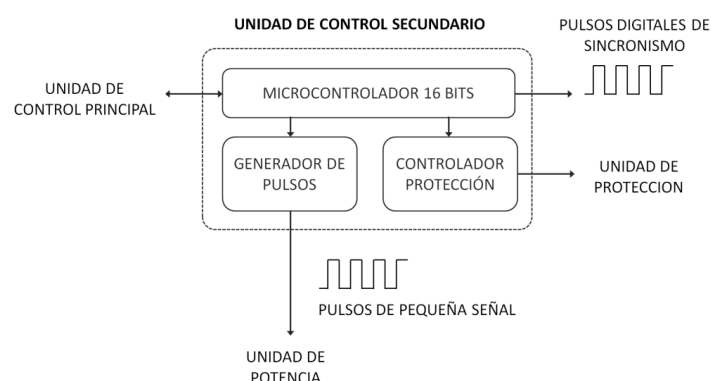


Figura 73 | Diagrama de bloques de las Unidades de Control Secundario de los canales.

En los apartados siguientes, se describen las características de diseño junto con algunos de los aspectos técnicos más relevantes de este módulo. Para interpretar correctamente el contenido de estos apartados, se aconseja consultar los esquemas eléctricos CANStim8.E3, CANStim8.E4 y CANStim8.E5 adjuntos en el apéndice V.

El microcontrolador de 16 bits:

El componente principal de las Unidades de Control Secundario es el microcontrolador PIC24HJ32GP302 (Microchip Technologies Inc., USA). Al igual que el PIC32 (del apartado 2.2.3.1), este microcontrolador también tiene la ventaja añadida de que dentro del mismo *chip* están integrados multitud de módulos con distintas características funcionales, como por ejemplo *timers*, comparadores y periféricos de comunicación. En términos generales, se trata de un microcontrolador con una alta capacidad computacional, cuyas prestaciones permiten abordar el diseño de sistemas electrónicos complejos de manera sencilla, eficiente y, sobre todo, económica.

La razón principal por la que se utiliza un PIC24 y no otro, reside en la amplia variedad de librerías (Robert B. Reese, 2009) y funciones disponibles para programar microcontroladores del modelo PIC24. Particularmente, se ha utilizado el PIC24HJ32GP302 por sus altas prestaciones, su reducido tamaño y su bajo coste.

A diferencia de la Unidad de Control Principal en este caso no se ha utilizado un kit de desarrollo comercial donde el microcontrolador ya viene integrado y listo para ser programado. En su lugar, se ha implementado una electrónica personalizada y adaptada a los requisitos particulares del diseño planteado. Esta electrónica incluye:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

**Oscilador:** El oscilador es el componente que se encarga de marcar el ritmo de ejecución de las instrucciones programadas en el microcontrolador. En este caso, se ha utilizado el oscilador de cristal de cuarzo *FQ7050B-8.000* (FOX Electronics, USA), capaz de generar una señal de reloj de 8MHz de frecuencia. Internamente, se ha configurado el microcontrolador para multiplicar esta frecuencia por 4 a través de un circuito PLL integrado en el propio *chip*, lo que implica que el programa se ejecuta a una velocidad de 25 nanosegundos por instrucción (1/40MHz).

**Circuito de reset:** Este circuito es el encargado de reiniciar el microcontrolador. Al presionar el pulsador J1, el pin MCLR (*Memory Clear*) del PIC24 recibe 0V, equivalente a un 0 en lógica digital, y esto provoca un reinicio inmediato del programa.

**Conector de programación:** Este conector (U16 en el esquema CANStim8.E3) se utiliza para descargar el programa en la memoria interna del microcontrolador y realizar operaciones de depuración. Para ello, se utiliza el programador *PICKit3* (ver apartado 2.2.6), cuyos pines son totalmente compatibles con los de este conector.

**Conector UART-TTL:** Se ha utilizado uno de los módulos UART incluidos en el microcontrolador para establecer una comunicación serie con un PC (conector J5 en el esquema CANStim8.E3). Esta conexión está pensada para llevar a cabo labores de revisión y reparación del equipo. A través de esta comunicación, el microcontrolador envía mensajes sobre el estado del programa e informa sobre las posibles causas de un error de funcionamiento. Para monitorizar estos mensajes, puede usarse una aplicación como el *Hyperterminal* de *Windows*. Las señales de comunicación operan con niveles TTL, por lo que es necesario asegurarse de utilizar el cable adaptador apropiado (Fig. 74).



**Figura 74 | Cable FTDI TTL-232R:** Este cable es totalmente compatible con el conector UART-TTL. Para más información consulte la página web [www.microchip.com](http://www.microchip.com).

**Condensador VCAP:** Este condensador (C40 en el esquema CANStim8.E3) es un componente crítico para el buen funcionamiento del microcontrolador. Debe colocarse lo más próximo posible al pin  $V_{cap}$  del *chip*.

**LED indicador de flujo de datos:** Este LED parpadea cuando el microcontrolador intercambia datos con la UCP. Está etiquetado como LED1 en el esquemático CANStim8.E3.

**Circuito de alimentación:** Como se verá más adelante, las fuentes de alimentación del equipo cuentan con salidas de voltaje de +5V, +12V, -12V y +60V. Sin embargo, tanto el microcontrolador, como los otros dos circuitos que forman parte de este módulo, reciben una tensión de alimentación de +3.3V a partir de la fuente de +5V. Para ello, se ha utilizado el regulador de tensión MC33269-3.3 (On Semiconductor, USA). Según su hoja de características, este componente está especialmente diseñado

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



para operar en aplicaciones de electrónica digital y ofrece una gran precisión en el voltaje de salida. Además, las pérdidas de potencia para la conversión de un nivel de voltaje a otro son mínimas, lo que evita el calentamiento excesivo del integrado. Aún así, el bajo consumo de los componentes a los que alimenta y los apenas 1.7V de diferencia entre la entrada y la salida del regulador, contribuyen a que la potencia disipada en forma de calor sea insignificante.

#### Controlador de la Unidad de Protección.

Como se ha explicado anteriormente, la Unidad de Protección se controla a través de la señal *umbral de seguridad* ( $V_{\text{CONTROL}}$ ). Recordar que esta señal define la corriente máxima de salida durante un estímulo y solo puede tomar valores entre 0 y 2V. El valor concreto de tensión lo calcula la Unidad de Control Principal en función del límite de corriente que haya configurado el usuario. La relación entre el límite de corriente en amperios y el *umbral de seguridad* en voltios es de 1 a 1. Es decir, si la corriente de salida se limita a 1.5A, el *umbral de seguridad* debe ser un voltaje fijo de 1.5V. La figura 75 representa un diagrama de bloques del controlador que gestiona la Unidad de Protección.

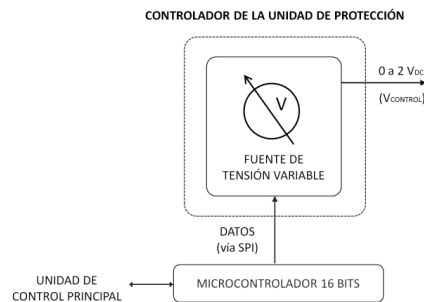


Figura 75 | Diagrama de bloques del controlador de la Unidad de Protección.

Una vez que la Unidad de Control Principal ha calculado el voltaje correspondiente, los datos digitales se envían a la Unidad de Control Secundario. Allí son recibidos por el microcontrolador PIC24, el cual procesa la información para reenviarla a una fuente de tensión variable encargada de generar el voltaje estimado. Esta fuente de tensión esta implementada con el convertidor digital/análogo DAC8811 (*Texas Instruments, USA*)

Este convertidor está diseñado con una arquitectura en escalera R-2R, cuenta con una resolución de 16 bits y su salida es en modo corriente. En cuanto a la entrada de datos digital, el DAC8811 cuenta con una interfaz de comunicación SPI de tan solo tres hilos: una línea de reloj (SCLK\_DAC), una línea de entrada de datos serie (SDI\_DAC) y una línea para habilitar la comunicación con el componente (CS\_DAC\_CC). Por tanto, para enviar los datos, se ha utilizado el segundo módulo SPI disponible en el PIC24.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Como se puede ver en el esquema eléctrico CANStim8.E4, el circuito que se ha implementado es bastante simple. Básicamente, se trata del mismo esquema que recomienda el fabricante del integrado DAC8811 en su hoja de características. Con este montaje, el DAC8811 trabaja en modo tensión, de manera que su corriente de salida se traduce, proporcionalmente, en valores de voltaje. El máximo voltaje que se puede obtener con este circuito depende de la tensión de referencia ( $V_{REF}$ ) que se utilice. Así, el rango de tensiones que se pueden conseguir varía de 0V hasta  $V_{REF}$ . Por este motivo, la tensión de referencia también recibe el nombre de *tensión de fondo de escala*. Particularmente, el circuito electrónico implementado utiliza una tensión de referencia de 10V. Este voltaje se obtiene a partir del regulador de tensión REF01HS (Analog Devices, USA), el cual garantiza un nivel de tensión muy preciso y, sobretodo, estable. En consecuencia, el rango de valores que puede tomar la salida de este circuito es de 0 a 10V.

Uno de los parámetros más importantes que se debe de tener en cuenta a la hora de diseñar un convertidor digital/análogo es la resolución. En este caso, la resolución se define como la cantidad de valores diferentes que puede tomar la salida en el rango de 0V a  $V_{REF}$ . Por tanto, para calcular este parámetro, es necesario tener en cuenta el voltaje de fondo de escala (10V) y la longitud en bits de los datos digitales, que en el caso del integrado DAC8811 es de 16 bits. Sabiendo esto, la resolución viene dada por la siguiente ecuación:

$$resolución = \frac{V_{REF}}{2^{16} \text{ BITS}} = \frac{10}{2^{16} \text{ BITS}} \text{ (V)}$$

Haciendo el cálculo resulta que la resolución del circuito que se ha implementado es de 0,2mV aproximadamente. Esto implica que, dentro del rango de 0 a 10V, la salida del circuito solo puede tomar valores múltiplos de 0,2mV, como 0, 0,2mV, 0,4mV, 0,6mV,... y así sucesivamente hasta 10V.

En principio, puede resultar ilógico haber diseñado un circuito para generar una tensión configurable de 0 a 10v cuando el umbral de seguridad solo alcanza un valor máximo de 2V. Sin embargo, esta decisión tiene una explicación razonable. Como se ha comentado, la Unidad de Control Principal es capaz de suministrar corrientes eléctricas muy superiores a los 2A especificados en el apartado 2.2.1, pudiendo llegar incluso a los 10A. En el futuro, es posible que el equipo deba operar con cargas que requieran una estimulación de mayor potencia. Por tanto, al tener predispuesto el *hardware*, se puede aumentar la corriente máxima de salida simplemente actualizando el programa de la Unidad de Control Principal. Esta previsión a nivel *hardware* es fundamental para garantizar una mayor versatilidad del equipo a la hora de reprogramarlo con prestaciones nuevas y mejoras, tal y como exigen las especificaciones de diseño del apartado 2.2.1.

#### Generador de pulsos de pequeña señal.

El generador de pulsos de pequeña señal es uno de los módulos *hardware* más importantes que incluye el diseño del estimulador. Básicamente, su función consiste en dar forma a los pulsos y distribuirlos a lo largo del tiempo según las características y el tipo d estimulación que se vaya a realizar. Estos mismos pulsos son amplificados posteriormente por la Unidad de Potencia para alcanzar niveles de voltaje mucho más elevados. En líneas generales, el diseño del generador de pulsos se divide en dos partes, la primera es una fuente de tensión variable y la segunda consiste en un interruptor con control digital (Fig. 76).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

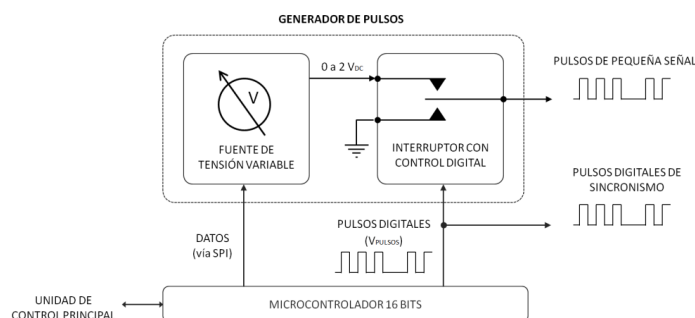


Figura 76 | Diagrama de bloques del generador de pulsos de pequeña señal.

El funcionamiento de este generador es muy sencillo. La idea consiste en ir “troceando” la salida de la fuente de tensión variable. Es decir, para generar pulsos con una amplitud determinada, primero se configura la fuente de tensión con el voltaje deseado y luego se hace conmutar el interruptor según la duración y distribución de los pulsos.

En este caso, la amplitud de los pulsos generados no puede superar los 2V. La Unidad de Potencia fue diseñada con un factor de multiplicación de 30 y la máxima amplitud que pueden alcanzar los pulsos a la salida del estimulador es de 60V, según las especificaciones del apartado 2.2.2. Por otro lado, es necesario garantizar que la velocidad de conmutación del interruptor sea lo suficientemente alta como para generar pulsos con una forma de onda lo más próximo posible a una señal cuadrada.

Para implementar la fuente de tensión variable se ha utilizado, una vez más, el integrado DAC881. Por tanto, el montaje es prácticamente el mismo que para el Controlador de la Unidad de Protección. Este circuito permite obtener tensiones en un rango de 0 a 10V con una resolución de 0,2mV, por lo que puede generar pulsos de 0 a 2V sin ningún problema. En cuanto a la entrada de datos digital, el DAC8811 está conectado al mismo bus SPI que el Controlador de la Unidad de Protección, con la única diferencia de que ahora, la comunicación con el microcontrolador PIC24 se habilita a través de la línea DAC\_CS\_CP.

Como interruptor con control digital, se ha utilizado el integrado ADG451 (Analog Devices, USA). Básicamente, este componente consiste en cuatro interruptores independientes, cada uno con su propia entrada de control digital. Según su hoja de características, estos interruptores están especialmente diseñados para aplicaciones que requieran altas frecuencias de conmutación, por lo que ofrecen unos tiempos de transición muy bajos.

En este sentido, el fabricante asegura que el interruptor es capaz de cerrarse en 70 nanosegundos y de abrirse en 60 nanosegundos. Al comparar estos valores con el mínimo ancho de pulso que debe generar el estimulador (1ms según las especificaciones del apartado 2.2.1.) se comprueba que los tiempos de conmutación no superan el 0,1% del ancho de pulso mínimo. Por lo tanto, el ADG451 es perfectamente capaz de conmutar lo suficientemente rápido como para mantener la forma cuadrada de los pulsos. Sin embargo, no es el único factor que se ha tenido en cuenta para elegir este integrado. También son relevantes otros aspectos técnicos como la capacidad de conmutar

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

tensiones de hasta 44V y que, una vez cerrados, los interruptores ofrecen una resistencia de tan solo 0,2Ω.

La forma de controlar los interruptores es bastante sencilla. Si la entrada de control recibe un 0 lógico, el interruptor permanece cerrado. Si por el contrario, recibe un 1 lógico, se abre. La señal de control (etiquetada  $V_{PULSOS}$  en el esquema CANStim8.E5) se genera en el microcontrolador de acuerdo con los parámetros y el tipo de estimulación que haya seleccionado el usuario.

Por último, mencionar que se ha utilizado otro de los interruptores disponibles en el integrado ADG451 para establecer el control sobre la función *mute* (habilitar o inhabilitar) del amplificador de tensión LME49830TB de la Unidad de Potencia (Fig. 77). En este caso, la señal de control está etiquetada en el esquemático CANStim8.E5 como CTR\_MUTE y también se genera desde el microcontrolador PIC24. Su función es inhabilitar el amplificador en caso de producirse un consumo excesivo de potencia eléctrica a la salida del estimulador.

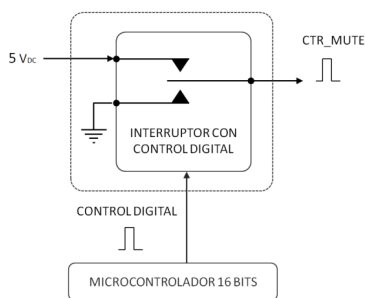


Figura 77 | Diagrama de bloques del circuito de control de la función *mute* del amplificador LME49830TB.

#### 2.2.4.2. Diseño e implementación *software*.

Al igual que en el apartado 2.2.3.2, el desarrollo de los Canales de Estimulación no estaría completo sin la implementación del programa *firmware* para el PIC24 de la Unidad de Control Secundario. En este caso, el programa se encarga de gestionar el funcionamiento interno del canal, incluyendo la comunicación con la Unidad de Control Principal, la generación de pulsos y el control de la Unidad de Protección. Naturalmente, se ha prestado mucho interés en desarrollar una aplicación completa, eficiente y lo más óptima posible. En esta sección, no se entra en detalles sobre la edición del programa, pues explicar el código resulta muy engorroso y en la mayoría de los casos no aporta información significativa. En su lugar, su funcionamiento se recoge en el diagrama de flujo (Fig. 78). Aún así, los ficheros con el código fuente están incluidos en el CD que acompaña a esta memoria para su consulta.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

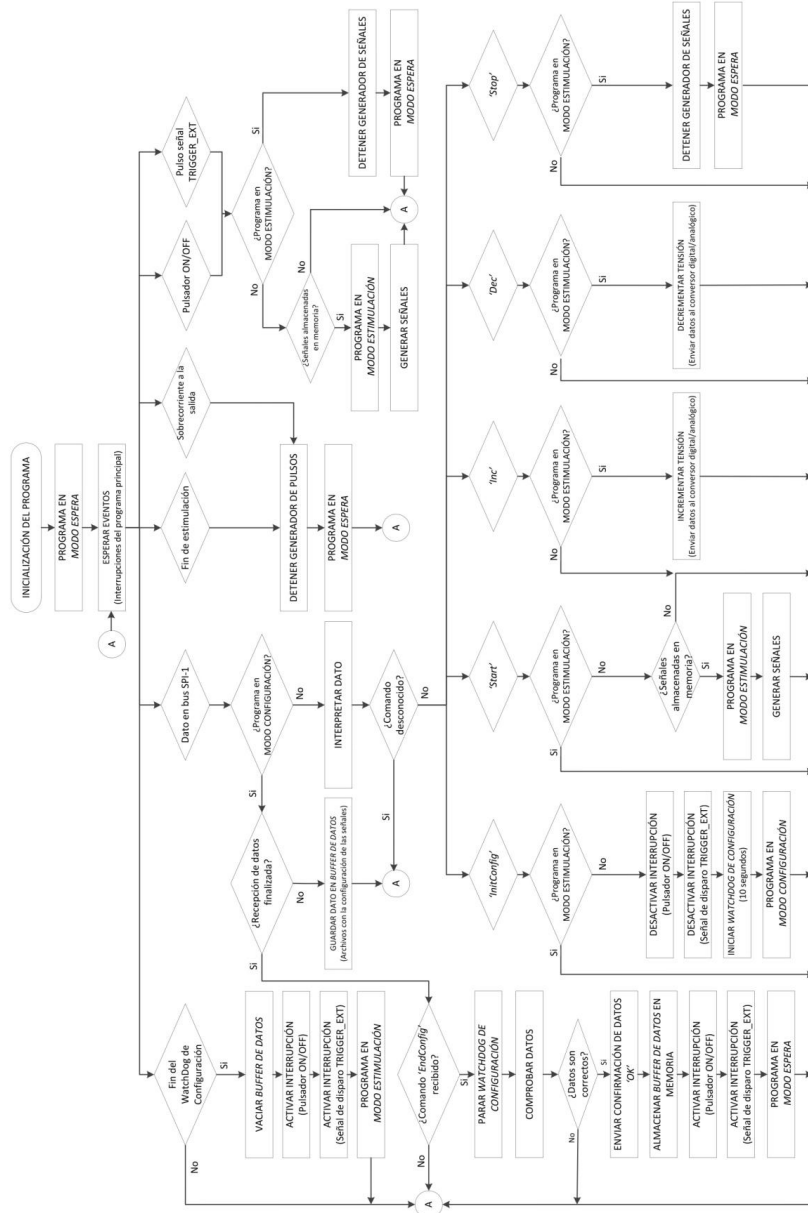


Figura 78 | Diagrama de flujo del programa firmware de la Unidad de Control Secundaria.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/06/2017 14:20:25

RICARDO BORGES JURADO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 14:34:34

MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 16:48:37

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:35:59

## 2.2.5. Fuentes de alimentación.

Desde el punto de vista del consumo eléctrico, el diseño del estimulador se divide en dos grandes bloques. Por un lado se encuentra la electrónica de gran consumo, que básicamente corresponde a las Unidades de Potencia de los canales. Y, por otro lado, está el resto de la circuitería que forma parte del equipo y que apenas consume unos pocos vatios. Por este motivo, se ha dividido el suministro eléctrico en dos fuentes de alimentación: una de alta potencia y otra de baja potencia.

### 2.2.5.1. Fuente de alta potencia

Esta fuente es la encargada de suministrar energía eléctrica a las Unidades de Potencia de cada canal. Para escoger la fuente de alimentación apropiada, primero se ha tenido que realizar un cálculo aproximado de la potencia eléctrica máxima instantánea que consume el equipo en el peor de los casos, es decir, los ocho canales operando de forma sincrónica en modo continuo, con 60 V amplitud y con una carga resistiva de  $30\Omega$ , lo que equivale a una inyección de corriente por canal de 2A. Cabe mencionar que es muy poco probable que un investigador lleve a cabo la estimulación de una preparación biológica con una señal de estas características debido a que inyectar una potencia tan elevada durante mucho tiempo puede provocar quemaduras y otros daños en el tejido. Sin embargo, es necesario contemplar estas condiciones en el cálculo del consumo eléctrico ya que el equipo puede operar con esos valores tan críticos. Por tanto, en esas circunstancias, la fuente de alimentación que incorpore el electro-estimulador debe capaz de suministrar una potencia eléctrica total de  $60V \times 2A \times 8 \text{ canales} = 960W$ .

La fuente de alimentación que se ha escogido es el modelo SWS1000L-60 (Fig. 79, TDK-Lambda Americas Inc., USA). Según su hoja de características, esta fuente es perfectamente capaz de suministrar la potencia eléctrica que se necesita y en las condiciones de operación más críticas del equipo. Además, según las especificaciones de su fabricante, está especialmente diseñada para aplicaciones electro-médicas. Por otro lado, su reducido tamaño hace posible que se pueda instalar dentro del chasis del equipo sin ningún problema.



Figura 79 | Fotografía de la fuente de alimentación SWS1000L-60. Imagen tomada de [www.rs-online.es](http://www.rs-online.es)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

### 2.2.5.2. Fuente de baja potencia.

Esta fuente es la encargada de suministrar energía eléctrica a la Unidad de Control Principal, a las Unidades de Control Secundario y a las Unidades de Protección. En todos los casos, la circuitería que se ha implementado en cada una de estas Unidades consume muy poca potencia eléctrica, pues la mayor parte es electrónica digital y los componentes operan con niveles de tensión y de corriente muy bajos. Sin embargo, la alimentación de los diferentes circuitos implica instalar al menos tres fuentes de alimentación: una de  $+12V_{DC}$ , otra de  $-12V_{DC}$  y finalmente, otra de  $+5V_{DC}$ .

La fuente de alimentación que se ha elegido es el modelo VLT40-3200 (Fig. 79, EOS Inc., USA). Se trata de una fuente de tensión conmutada que tiene la ventaja de contar con tres salidas:  $+12V_{DC}$ ,  $-12V_{DC}$  y  $+5V_{DC}$ ; por lo que es una solución ideal. Además, su reducido tamaño hace posible su instalación dentro del chasis sin problemas y, según el fabricante, está diseñada para disipar muy poco calor. Por otro lado, los 40W de potencia máxima que puede suministrar esta fuente son más que suficientes para alimentar la circuitería de bajo consumo de todo el estimulador.



Figura 80 | Fotografía de la fuente de alimentación VLT40-3200. Imagen tomada de [www.rs-online.es](http://www.rs-online.es).

### 2.2.6. Herramientas CAD utilizadas.

Comúnmente se conoce como herramientas de diseño asistido por computador (CAD) al conjunto de programas informáticos destinados al diseño y fabricación de un producto.

Desde el punto de vista electrónico, en el mercado existen multitud de plataformas CAD que ofrecen infinidad de posibilidades para la simulación y diseño de circuitos eléctricos. En este proyecto en particular, se utilizó el programa NI Multisim (National Instruments Inc., USA) para la simulación de circuitos y para la edición de los esquemas eléctricos. Por otro lado, el diseño de las placas de circuito impreso se llevó a cabo con el programa NI Ultiboard (National Instruments Inc., USA).

Por otra parte, los microcontroladores que incluyen la mayoría de los productos electrónicos se programan a través de plataformas informáticas que, por lo general, las desarrolla la misma empresa que fábrica los componentes. Por tanto, en muchas ocasiones, el desarrollador se ve obligado a usar plataformas de programación específicas para una marca o un tipo de microcontrolador.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

En este sentido, para desarrollar el *firmware* del electroestimulador CANStim-8 fue necesario utilizar diferentes plataformas de programación (Fig. 81). Para programar el *kit Mikromedia Board for PIC32* se utilizó la aplicación *MikroC Pro for PIC32* (Mikroelektronika, Serbia). Además, esta aplicación se complementa con el programa *Mikromedia Visual TFT* (Mikroelektronika, Serbia), ideada para diseñar e implementar interfaces gráficas a partir de las pantallas táctiles que incluyen los productos de Mikroelektronika. Por último, para programar los microcontroladores PIC24, se tuvo que utilizar la aplicación *Mplab-IDE* (Microchip Technology Inc., USA)



Figura 81 | Herramientas de diseño CAD utilizadas en el proyecto CANStim-8.

### 2.2.6.1. NI Multisim.

NI Multisim (Fig. 82) es uno de los muchos programas existentes para el diseño y simulación de circuitos eléctricos y electrónicos. Esta aplicación *software* proporciona características realmente avanzadas que permiten ir desde la fase de diseño hasta la etapa final de producción. Su éxito se debe, principalmente, al hecho de combinar la captura esquemática con el estándar de la industria de la simulación *SPICE* en un entorno gráfico totalmente integrado y muy fácil de manejar.

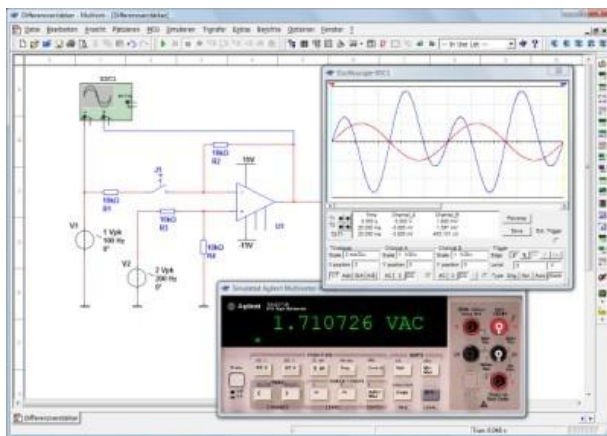


Figura 82 | Entorno gráfico de NI Multisim. Imagen tomada de www.ni.com.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59



### 2.2.6.2. NI Ultiboard.

NI Ultiboard (Fig. 83) es una solución avanzada y de fácil manejo para la creación de placas de circuito impreso o PCB's. Esta plataforma facilita todos los pasos de diseño de placas de circuito impreso, desde la generación de la lista de componentes a la configuración de la placa, pasando por la colocación, enrutado y edición de los componentes y, finalmente, la salida hacia la fabricación y ensamblaje. Además, ofrece todas las características avanzadas que se necesitan para la rápida producción de placas de circuito impreso, pero con la ventaja de ofrecer una curva de aprendizaje muy rápida y con unos costes muy reducidos en comparación con otras herramientas profesionales de este estilo.

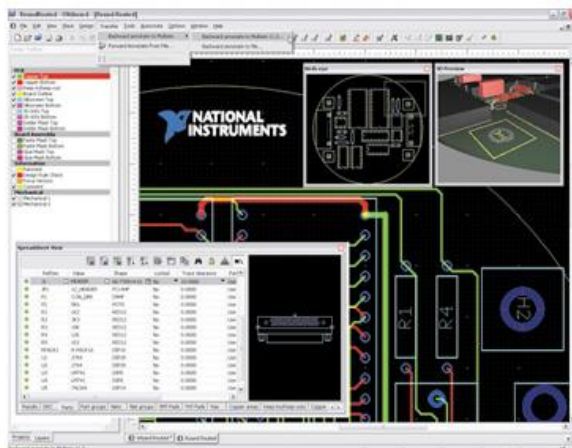


Figura 83 | Entorno gráfico de NI Ultiboard. Imagen tomada de www.ni.com.

### 2.2.6.3. MikroC Pro for PIC32.

La plataforma *MikroC PRO for PIC32* (Fig. 84), es una poderosa y completa herramienta de desarrollo de aplicaciones para los productos de PIC32 que comercializa la empresa *Mikroelektronika*. Su diseño proporciona al programador un entorno de grandes prestaciones con el que poder desarrollar aplicaciones para sistemas embebidos de manera fácil y muy intuitiva.

Para editar los programas, esta aplicación utiliza el lenguaje de programación *MikroC*, desarrollado también por *Mikroelektronika*. Este lenguaje es muy similar al C estándar, no obstante, en determinados aspectos difiere de éste en algunas características. Algunas de estas diferencias se refieren a las mejoras destinadas a facilitar la programación de los microcontroladores PIC, mientras que las demás son la consecuencia de la limitación de la arquitectura del *hardware* de los propios microcontroladores.

La principal ventaja de esta aplicación lo constituye la enorme cantidad de librerías de las que dispone, para las cuales *Mikroelektronika* se ha preocupado de incluir multitud de funciones

expresamente diseñadas para configurar y manejar partes muy concretas de los kits basados en PIC32. Estas librerías hacen que el trabajo de programación sea mucho más fácil y menos engorroso, pero sobre todo ahorran muchísimo tiempo y trabajo.

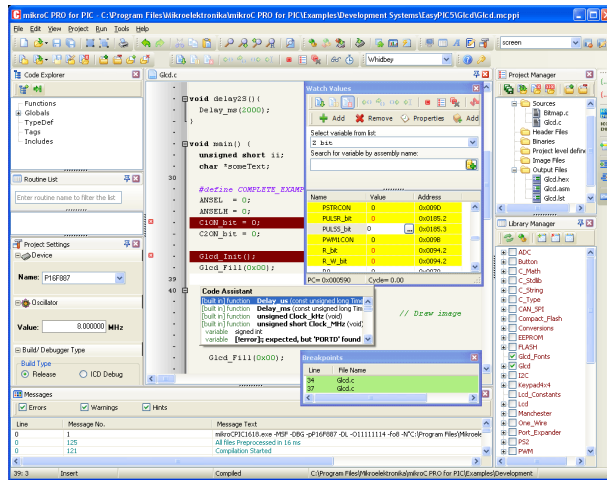


Figura 84 | Entorno gráfico MikroC Pro for PIC32. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)

Para programar la placa *MikroMedia Board for PIC32* es necesario utilizar el programador *MikroProg* (Fig. 85) junto con las aplicaciones *MikroProg Suite for PIC* (Fig. 86) y *Mikrobootloader* (Fig. 87). La primera aplicación se utiliza para configurar las opciones del programador, mientras que la otra permite descargar el fichero `.hex`, generado tras el proceso de compilación, en la memoria de programa del PIC32.

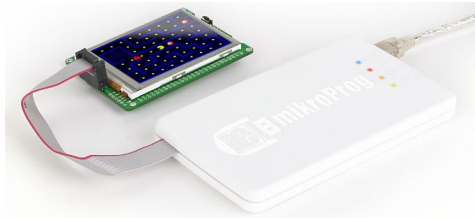


Figura 85 | Programador MikroProg conectado al kit MikroMedia Board for PIC32. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Figura 86 | Entorno gráfico *MikroProg Suite for PIC*. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)



Figura 87 | Entorno gráfico *MikroBootloader*. Imagen tomada de [www.mikroe.com](http://www.mikroe.com)

#### 2.2.6.4. Mikromedia Visual TFT.

*Mikromedia Visual TFT* (Fig. 88) es una aplicación *software* creada para desarrollar interfaces gráficas a partir de las pantallas táctiles que incluyen algunos de los productos de la empresa *Mikroelektronika*. Este programa ofrece un entorno de trabajo verdaderamente fácil de usar para configurar el contenido visual de la pantalla y definir las áreas activas del panel táctil. Gracias a este programa y al *kit Mikromedia Board for PIC32*, se consiguió implementar una interfaz táctil con un aspecto visual muy logrado y con un alto contenido interactivo.

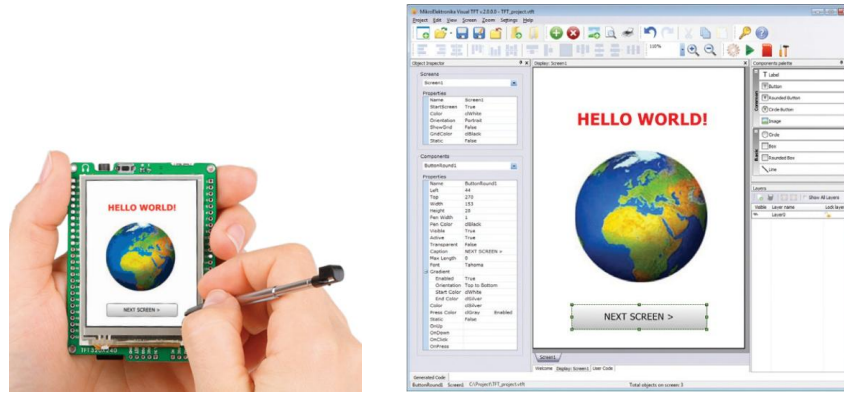


Figura 88 | Entorno gráfico de MikroMedia Visual TFT. Imagen tomada de www.mikroe.com

### 2.2.6.5 Mplab-IDE.

Mplab-IDE (Fig. 89) es una plataforma de desarrollo que permite escribir el programa para los microcontroladores PIC (en lenguaje ensamblador o en C), ensamblar o compilar el código y programar el componente.

Para escribir el programa los microcontroladores PIC24 se importaron al Mplab-IDE las librerías para PIC24 incluidas el libro *Microcontrollers from assembly language to C using the PIC24* (ISBN 1-5845-0583-4, 2009). Por otro lado, el código fuente se generó usando el compilador *Mplab C compiler for PIC24 and dsPIC v3.30c*, disponible de forma gratuita en la web [www.microchip.com](http://www.microchip.com). Finalmente, se utilizó el programador *PickIt3* (Fig. 90) para descargar el programa en la memoria de los microcontroladores

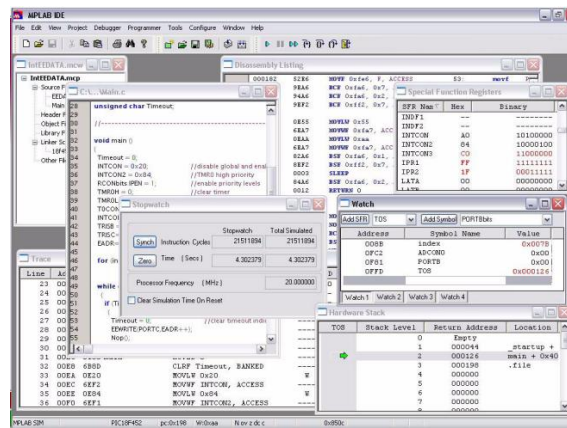


Figura 89 | Entorno gráfico Mplab-IDE. Imagen tomada de www.microchip.com.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Figura 90 | Programador *Pickit3* para microcontroladores PIC. Imagen tomada de [www.microchip.com](http://www.microchip.com).

## 2.2.7. Construcción del prototipo.

En este apartado se describe el primer prototipo del electroestimulador CANStim-8. Tal y como se propuso en la sección Objetivos de la Tesis, el desarrollo de este prototipo alcanza un nivel de madurez TRL-6 en la escala *Technology Readiness Levels* (European Commission, 2014) por haber demostrado con éxito su funcionamiento en un entorno relevante, concretamente en el laboratorio de Farmacología del Instituto Universitario de Bio-Órgánica Antonio González, perteneciente a la Universidad de La Laguna. Los resultados de estas pruebas se detallan en el apartado 2.3 de este Capítulo.

A continuación, se pormenorizan los aspectos técnicos más relevantes del bastidor sobre el que se ha montado el equipo, así como el diseño y fabricación de las placas de circuito impreso que dan soporte a los circuitos electrónicos que se han comentado en apartados anteriores.

### 2.2.7.1. Bastidor.

En líneas generales, el bastidor para el primer prototipo del CANStim-8 se eligió en función de tres parámetros: que fuera fácil de transportar, que tuviera un diseño compacto y que permitiera ensamblar el equipo con módulos independientes. Teniendo esto en cuenta, se optó por un bastidor de sobremesa de la serie *propacPRO* que fabrica la empresa *Schroff-Pentair* (<https://schroff.pentair.com>). Estos chasis están especialmente diseñados para montar sistemas electrónicos modulares mediante *racks* normalizados para tarjetas electrónicas con formato europeo *Eurocard*. Por otra parte, una característica importante para todo aparato a colocar en una poyata de laboratorio es su resistencia ante derrames eventuales de líquidos. Por ello se escogió una carcasa sin ranuras en la parte superior y con pocas posibilidades de penetración lateral.

Concretamente, se utilizó el bastidor *propacPRO 3U 42HP 326D* de dimensiones 155.5mm de alto, 470,3mm de largo y 326,0mm de profundidad, y nueve *racks* compatibles con tarjetas *Eurocard* 3U x 32HP (100mm x 160mm) del modelo *Frame-type plug-in units PRO* que también comercializa

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Schroff-Pentair (Fig. 91). De los nueve racks, ocho se usaron para montar los canales, y uno para montar el kit *Mikromedia Board for PIC32*.



Figura 91 | Vista frontal del electroestimulador CANStim-8.

### 2.2.7.2 Panel central de conexiones.

En el interior del chasis, se ha instalado un panel de conexiones (Fig. 92C ítem 3) que suministra energía eléctrica a los nueve racks, comunica las Unidades de Control Secundario de los canales con la Unidad de Control Principal y dirige las señales de sincronismo y de estimulación de los canales hasta los conectores externos instalados en el panel trasero del chasis. Para acoplar los racks, este panel cuenta con nueve conectores hembra DIN41612 tipo B serie *Eurocard* de 32 contactos (Fig. 92A ítem 1, TE Connectivity, Suiza). Se han escogido estos conectores porque cumplen con las características que especifica el formato de tarjetas electrónicas *Eurocard* para las dimensiones 3U x 32HP, lo que garantiza la compatibilidad con las placas que van instaladas en los racks. Además de estos conectores, el panel central de conexiones también incluye otros terminales por donde recibe la alimentación de las fuentes SWS1000L-60 y VLT40-3200 y por donde da salida a las señales de estimulación y sincronismo de los canales hacia los correspondientes conectores externos.

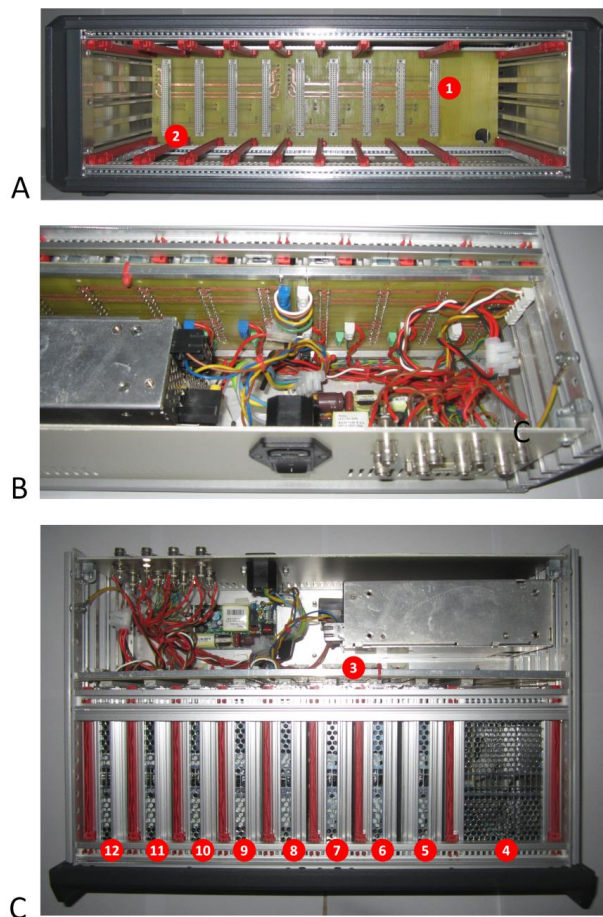
Este panel de conexiones se fabricó en el Servicio de Electrónica de la Universidad de La Laguna. Su diseño resultó muy sencillo y apenas presentó complicaciones al fabricar la primera versión. Sin embargo, se dio el inconveniente de que las dimensiones del panel superaban los límites de fabricación de la maquinaria, así que se optó por dividir el panel en dos placas y luego conectarlas entre sí (Fig. 92B.). Tanto el diseño como el mapa de conexiones de estas placas están incluidos en los esquemas y planos adjuntos en los apéndices V y VI respectivamente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 92 | Montaje del panel central de conexiones en el bastidor.** **A)** Vista frontal: (1) Conectores DIN41612. (2) Ralles para la instalación de los racks. **B)** Vista trasera: Desde este otro ángulo, se observa el resto de conectores del panel así como el cableado interno del equipo. Además, también se puede ver el puente de cables que une eléctricamente las dos placas que forman el panel. **C)** Vista superior: (3) Panel central de conexiones. Se comprueba como divide perfectamente el espacio interior en dos secciones. La parte frontal para los racks y la parte trasera para las fuentes de alimentación y el cableado. (4) Rack de la Unidad de Control Principal. (5) Rack del canal 1. (6) Rack del canal 2. (7) Rack del canal 3. (8) Rack del canal 4. (9) Rack del canal 5. (10) Rack del canal 6. (11) Rack del canal 7. (12) Rack del canal 8.

### 2.2.7.3. Instalación de las fuentes de alimentación.

Las fuentes de alimentación SWS1000L-60 y VTL40-320 se han instalado en la parte trasera del bastidor, entre el panel central de conexiones y el panel trasero del equipo (Fig. 93). Su ubicación quedó determinada por el espacio disponible en el interior del bastidor tras instalar los racks y el panel

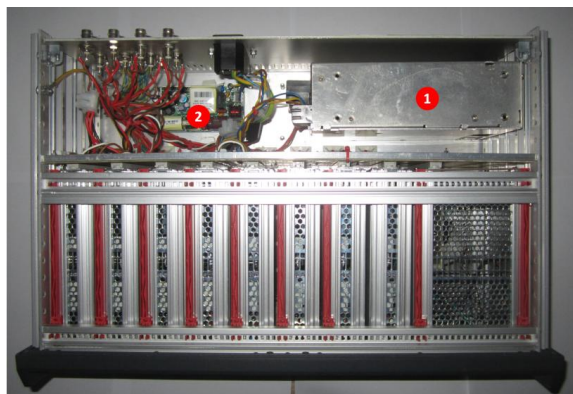
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

central de conexiones. Sin embargo, resultó ser una localización ideal debido a que, al estar el panel de conexiones en medio, se reduce la transferencia del calor que irradian las fuentes hacia los racks.



**Figura 93| Instalación de las fuentes de alimentación en el bastidor.** (1) Fuente SWS1000L-60. (2) Fuente VTL40-3200.

#### 2.2.7.4. Conectores de entrada y salida

Los conectores de entrada y salida del electroestimulador se han instalado en el panel trasero del bastidor. De este modo, el panel frontal queda totalmente libre de cables para que el usuario pueda manejar el equipo con comodidad. Como se puede ver en la figura 94, el equipo dispone de ocho conectores BNC, un conector DB25 y un conector estándar para suministrar alimentación de red al equipo. Este último dispone de un porta-fusibles y un interruptor integrados.



**Figura 94 | Vista trasera del bastidor.** (1) Conector de alimentación con interruptor y porta-fusibles integrado. (2) Salida del canal 4. (3) Salida del canal 3. (4) Salida del canal 2. (5) Salida del canal 1. (6) Salida del canal 8. (7) Salida del canal 7. (8) Salida del canal 6. (9) Salida del canal 5. (10) Conector de señales de sincronización.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



El equipo administra las señales de estimulación a través de los conectores BNC. Por tanto, corresponde un conector por canal. La figura 92 indica qué conector BNC corresponde a qué canal. Al haber utilizado este tipo de conectores, es necesario un cable adaptador de BNC a terminales tipo cocodrilo para llevar la señal de estímulo hasta los electrodos que conectan con la muestra (Fig. 95).



Figura 95 | Cable adaptador de conector BNC a pinzas tipo cocodrilo.

Por otro lado, en el conector DB25 se encuentran agrupadas las señales digitales de sincronismo de los ocho canales. En la tabla 8 se muestra el mapa de pines de este conector.



Pin	Tipo	Descripción	Canal	Pin	Tipo	Descripción	Canal
1	Entrada	Disparo externo	1	14	Entrada	Disparo externo	5
2	---	Masa digital	1	15	---	Masa digital	5
3	Salida	Pulso sincronismo	1	16	Salida	Pulso sincronismo	5
4	Entrada	Disparo externo	2	17	Entrada	Disparo externo	6
5	---	Masa digital	2	18	---	Masa digital	6
6	Salida	Pulso sincronismo	2	19	Salida	Pulso sincronismo	6
7	Entrada	Disparo externo	3	20	Entrada	Disparo externo	7
8	---	Masa digital	3	21	---	Masa digital	7
9	Salida	Pulso sincronismo	3	22	Salida	Pulso sincronismo	7
10	Entrada	Disparo externo	4	23	Entrada	Disparo externo	8
11	---	Masa digital	4	24	---	Masa digital	8
12	Salida	Pulso sincronismo	4	25	Salida	Pulso sincronismo	8
13	---	No conectado	---				

Tabla 8 | Mapa de pines del conector externo DB25.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

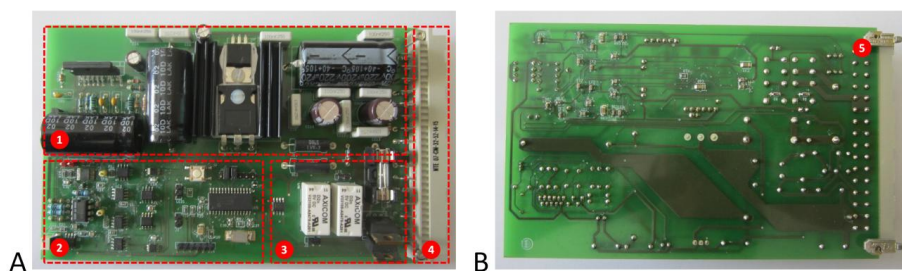
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

### 2.2.7.5. Fabricación y montaje de los Canales de Estimulación.

Los ocho canales del equipo son idénticos tanto en diseño como en implementación, así que también son idénticas las placas de circuito impreso que se han fabricado para dar soporte a su electrónica. Estas placas se han diseñado con el formato estándar *Eurocard* 3U x 32HP (100mm x 160mm) para así poder instalarlas dentro de los *racks*. Además, incluyen un conector macho DIN41612 tipo B serie *Eurocard* de 32 contactos en ángulo (TE Connectivity, Suiza) que cumple con las especificaciones del formato *Eurocard* y se acopla perfectamente a los conectores del panel central de conexiones. Tanto el diseño como el mapa de conexiones de estas placas están incluidos en los planos del apéndice V y VI.

*Grosso modo*, el diseño de la placa se divide en dos secciones: En la parte superior se encuentra la electrónica analógica de alta potencia, es decir, aquella que amplifica los pulsos y suministra la corriente eléctrica necesaria para la estimulación (Fig. 96A *ítem* 1). Estos componentes son susceptibles de calentarse e irradiar calor hacia el resto del circuito, así que, aprovechando que los *racks* posicionan las placas en vertical, estos componentes se han colocado estratégicamente en la mitad superior de la placa. De esta manera, se facilita que el calor generado ascienda y no afecte al resto del circuito.

Por otra parte, en la zona inferior se encuentra la electrónica digital que gestiona el funcionamiento del canal, es decir, la circuitería que implementa la Unidad de Control Secundario (Fig. 96A *ítem* 2). La figura 96 muestra, de manera representativa, las partes del circuito que corresponden a cada una de las unidades funcionales implementadas en los canales.



**Figura 96 | Placa de circuito impreso de los canales. A)** Vista superior. (1) Unidad de Potencia. (2) Unidad de Control Secundario. (3) Unidad de Protección. (4) Conector DIN41612. **B)** Vista inferior. (5) Anclajes de sujeción al *rack*.

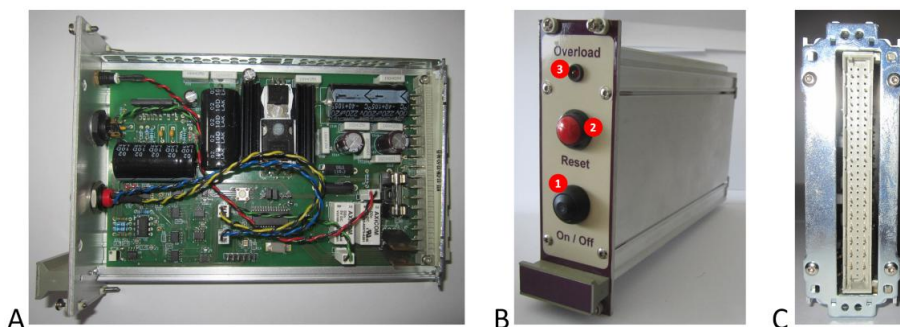
Para realizar los primeros test de funcionamiento, se fabricó una primera placa en las instalaciones del Servicio de Electrónica de la Universidad de La Laguna. Para ello se utilizó una lámina de CEM3 de 2mm de grosor y recubierta por ambas caras de una película de cobre de 35µm. Para mantener la conductividad entre las capas inferior y superior a través de las vías y *pads*, se metalizaron las perforaciones aplicando una pasta conductora que se endurece tras someterla a una temperatura de 160°C durante 30 minutos.

Esta primera versión permitió comprobar que no existieran errores en el diseño y que todo funcionara de la forma en la que se había estimado. Sin embargo, supuso un coste económico notable

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

y mucho esfuerzo para terminarla con los medios disponibles. Así que para las ocho placas necesarias, el diseño se envió a la empresa *Lab-circuits* ([www.lab-circuits.es](http://www.lab-circuits.es)) para su fabricación. No obstante, los componentes se soldaron uno a uno y de forma totalmente manual.

Finalmente, a la hora de montar los *racks* fue necesario mecanizar el panel frontal de cada uno para incluir el pulsador de inicio/parada de la estimulación, el pulsador de rearme del circuito de desconexión y el *LED* rojo indicador de sobrecarga. En la figura 97 se muestra un canal totalmente listo para su instalación en el equipo.



**Figura 97 | Montaje de un rack para un canal.** **A)** Vista interior del montaje: En esta vista se puede observar la placa de circuito impreso perfectamente instalada en el rack así como el cableado para los pulsadores e indicadores del panel frontal. **B)** Vista en perspectiva: Desde este otro ángulo, se observa el montaje definitivo del rack. (1) Pulsador de Inicio/parada de la estimulación. (2) Pulsador de rearme para volver a conectar la carga después de un corte por exceso de corriente. (3) *LED* indicador de sobrecarga. **C)** Vista trasera: En esta otra vista, se observa el conector macho DIN41612.

#### 2.2.7.6 Montaje de la Unidad de Control Principal.

Para instalar el kit *Mikromedia Board for PIC32* dentro del rack y poder luego conectarlo con panel interno del chasis, fue necesario adaptar sus pines de conexión por medio de una placa de circuito impreso *Eurocard 3U x 32HP* (Fig. 98 ítem 6) y un conector macho DIN 41612 idéntico al que tienen instalados los canales (Fig. 98 ítem 1). El diseño de esta placa es sencillo, pudiéndose fabricar sin problemas en las instalaciones del Servicio de Electrónica de la Universidad de la Laguna.

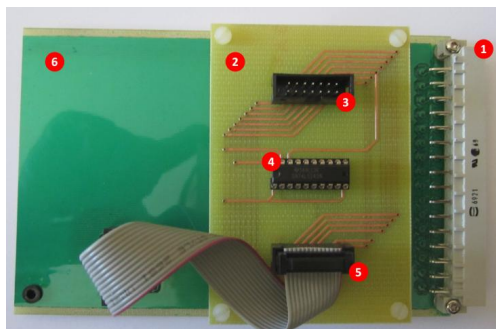
Tras realizar las primeras pruebas de funcionamiento con esta placa, se comprobó que la comunicación entre alguno de los canales y la Unidad de Control Principal no funcionaba correctamente. El problema radicaba en la longitud de las líneas del bus SPI, que resultaron demasiado largas en el panel de conexiones. Como consecuencia, las señales del bus SPI se atenuaban y los datos no llegaban a los canales más alejados de la Unidad de Control Principal. Como solución, se instaló una placa de circuito impreso auxiliar (Fig. 98 ítem 2) con el transceptor 74LS245N (Fig. 98 ítem 4, Texas Instruments, USA). A través de este integrado, se consigue que las señales del bus SPI se transmitan perfectamente a todos los canales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

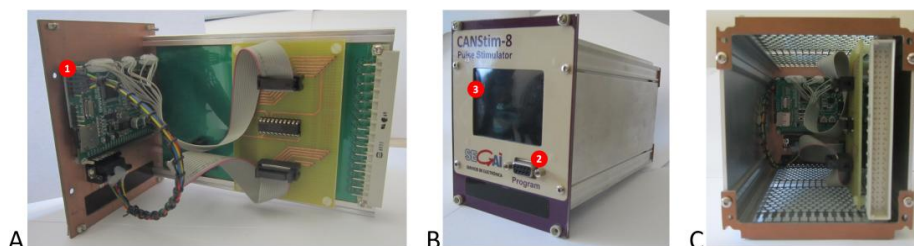
Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 98 | Adaptación de los pines del kit Mikromedia Board for PIC32 para su conexión en un rack.** (1) Conector DIN41612. (2) Placa de circuito impreso auxiliar. (3) Conector que comunica los pines SPI del kit Mikromedia Board for PIC32 con los pines de entrada del transceptor. (4) Transceptor 74LS245N. (5) Conector que comunica los pines de salida del transceptor con la placa del rack. (6) Placa de circuito impreso del rack.

Por otro lado, a la hora de montar el rack se tuvo que mecanizar el panel frontal para instalar el kit Mikromedia Board for PIC32 con la pantalla orientada al exterior y un conector DB9. Este último conecta directamente con los pines de programación del kit y se utiliza para reprogramar el electroestimulador desde un ordenador sin necesidad de retirar el rack del bastidor y desmontarlo. En la figura 99, se muestra el rack de la Unidad de Control Principal totalmente montado.



**Figura 99 | Montaje del rack para la Unidad de Control Principal.** **A)** Vista interior del montaje. (1) Kit Mikromedia Board for PIC32 instalado en el panel frontal. En esta vista se puede observar el cableado que conecta los pines de entrada y salida del kit con la placa del rack. **B)** Vista en perspectiva. Desde este otro ángulo, se observa el montaje definitivo del rack. (2) Conector DB9 para reprogramar el microcontrolador de la Unidad de Control Principal. (3) Pantalla táctil. **C)** Vista trasera: En esta otra vista, se observa el conector macho DIN41612.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

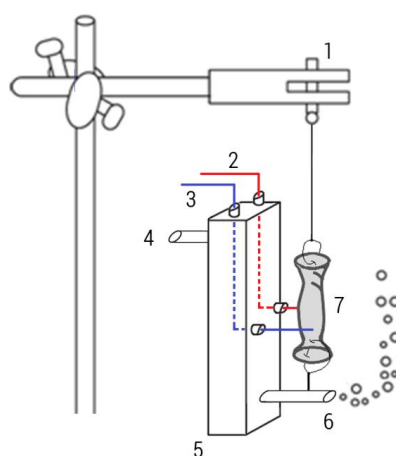
Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## 2.3. Experimentos en el Laboratorio de Farmacología.

Para determinar el rendimiento del CANStim-8 y validar su capacidad de estimulación, se llevaron a cabo una serie de experimentos en el laboratorio de Farmacología del Instituto Universitario de Biogénica Antonio González, perteneciente a la Universidad de La Laguna. Estos ensayos se realizaron de la mano de los científicos del grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis, también perteneciente a esta universidad.

En todas las pruebas se emplearon segmentos tubulares de conducto deferente de rata de unos 3 mm de longitud. Las distintas porciones se sumergieron en un baño de órganos con 3mL de solución Krebs-Bicarbonato a 31°C y burbujeadada con carbógeno. (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>). Para sujetarlas dentro de la copas se utilizó un tipo de soporte muy particular que permite guiar los electrodos y mantenerlos en contacto con la muestra. Cabe mencionar que este soporte fue construido por los propios investigadores del laboratorio. Como electrodos, se usaron dos hilos de plata de 0,5mm de diámetro. La figura 100 muestra una representación gráfica del montaje de los tejidos en el soporte.



**Figura 100 | Ilustración del soporte fabricado por los investigadores del laboratorio de Farmacología de la Universidad de La Laguna.** (1) Sensor isométrico. (2) Electrodo negativo. (3) Electrodo positivo. (4) Entrada de gas carbógeno. (5) Soporte. (6) Salida de gas carbógeno. (7) Segmento tubular de conducto deferente de rata.

En primer lugar, se realizó un estudio para determinar las características eléctricas del tejido sumergido en la solución nutritiva. El objetivo de esta prueba es conocer el tipo de impedancia eléctrica que ofrece la preparación biológica en los bornes de los electrodos. La impedancia es la magnitud física con la que se expresa cuantitativamente la oposición que ofrece un cuerpo al paso de la corriente eléctrica alterna. En este sentido, un cuerpo puede ofrecer una impedancia de características puramente resistivas, capacitivas, inductivas o combinar las tres. Por lo general, la impedancia eléctrica se expresa en forma fasorial con un módulo y un ángulo de fase. El módulo, medido en ohmios ( $\Omega$ ), indica cuánto se opone el cuerpo al paso de la corriente eléctrica, mientras que el ángulo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

de fase, medido en grados o radianes, indica el tipo de impedancia predominante; si el ángulo es 0 grados se considera que la impedancia es puramente resistiva. Si el ángulo aumenta hacia los 90 grados comienza a predominar el comportamiento inductivo, considerándose totalmente inductiva en un ángulo de 90 grados. Si por el contrario, el ángulo de fase decrece hacia los -90 grados predomina el comportamiento capacitivo, siendo totalmente capacitivo en -90 grados. Es importante resaltar que tanto el módulo como el ángulo de fase de la impedancia de un cuerpo varían con la frecuencia de la corriente eléctrica que lo atraviesa.

Conocer la impedancia de la preparación biológica es muy importante para valorar el rendimiento del estimulador CANStim-8, ya que si la impedancia es altamente capacitiva o inductiva puede alterarse la forma de onda cuadrada de los pulsos que genera el equipo. Para medir la impedancia se utilizó el analizador MZ-705 (PROMAX, España). Este equipo permite realizar la medida en tres frecuencias diferentes (100, 1000 y 10000Hz) y devuelve el resultado en forma fasorial. En la figura 100 se muestra el valor de impedancia medida en los bornes de los electrodos:

Teniendo en cuenta la figura 101A se concluye que la preparación biológica gana en conductividad conforme aumenta la frecuencia de la corriente eléctrica alterna que lo atraviesa. Por otro lado, en la figura 101B se comprueba que el ángulo de fase es negativo en las tres medidas, lo que quiere decir que la impedancia es principalmente capacitiva. Además, el comportamiento capacitivo se acentúa conforme disminuye la frecuencia.

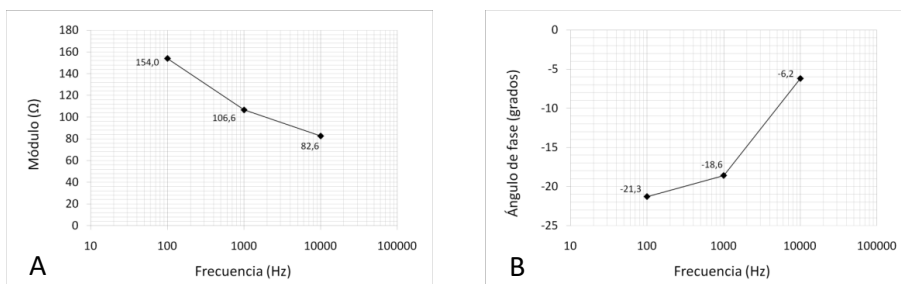


Figura 101 | Representación gráfica de la impedancia de la preparación biológica con conducto deferente de rata. A) Módulo frente a la frecuencia. B) Ángulo de fase frente a la frecuencia.

El electroestimulador CANStim-8 genera señales en el rango de frecuencias  $0 \leq f_{\text{CANStim8}} \leq 500\text{Hz}$ . Exactamente, la frecuencia máxima de 500Hz se da cuando se configuran pulsos repetitivos con  $T_{\text{ON}} = T_{\text{OFF}} = 1\text{ms}$ . Según las gráficas de la figura, en este intervalo de frecuencias la preparación biológica ofrece una impedancia predominantemente capacitiva y del orden de cientos de ohmios.

Al comportarse como un condensador, la preparación biológica puede afectar a la señal de pulsos de dos maneras: ralentizando los tiempos de transición y filtrando los armónicos de alta frecuencia. Si los tiempos de transición aumentan por encima de los  $50\mu\text{s}$ , no se cumplirá una de las especificaciones de diseño recogidas en el apartado 2.2.1. Por otro lado, un filtrado excesivo de los armónicos de alta frecuencia redondearía los pulsos, llegando incluso a perder totalmente su forma cuadrada.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Para valorar el alcance de estos efectos, se realizaron cuatro experimentos. En cada uno de ellos se estimuló un segmento de conducto deferente de rata con un único pulso de 1ms de ancho. La primera prueba se realizó con un pulso de 10V, la segunda con uno de 20V, la tercera con 30V y la última con pulso de 50V. Para visualizar la forma de onda se utilizó el osciloscopio TBS1152B (Tektronix Inc., USA). Los resultados obtenidos son los siguientes:

Como se puede observar en la figura 102 los pulsos mantienen una forma cuadrada bien definida en todos los casos. Esto demuestra que el comportamiento capacitivo de la preparación biológica apenas tiene efecto en la forma de onda de la señal que genera el CANStim-8. También se midieron los tiempos de transición de los pulsos para determinar si superaban los 50µs. Las figuras 103, 104 y 105 muestran los resultados obtenidos.

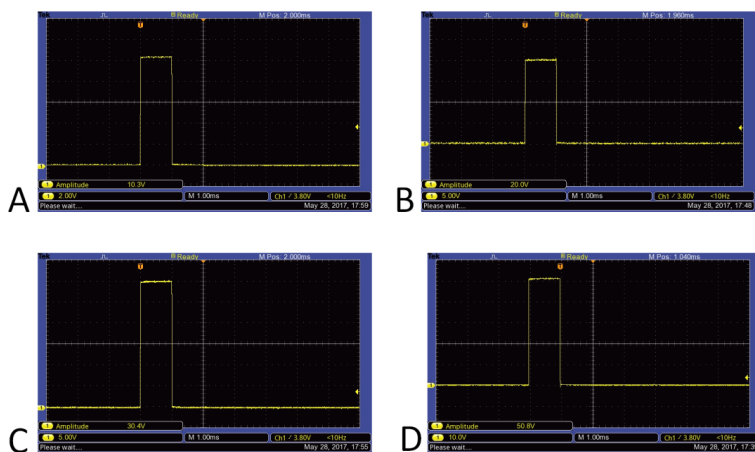


Figura 102 | Estimulación con un pulso de 1ms de ancho y diferentes amplitudes. Visualización de la forma de onda. A) Pulso de 10V. B) Pulso de 20V. C) Pulso de 30V. D) Pulso de 50V.

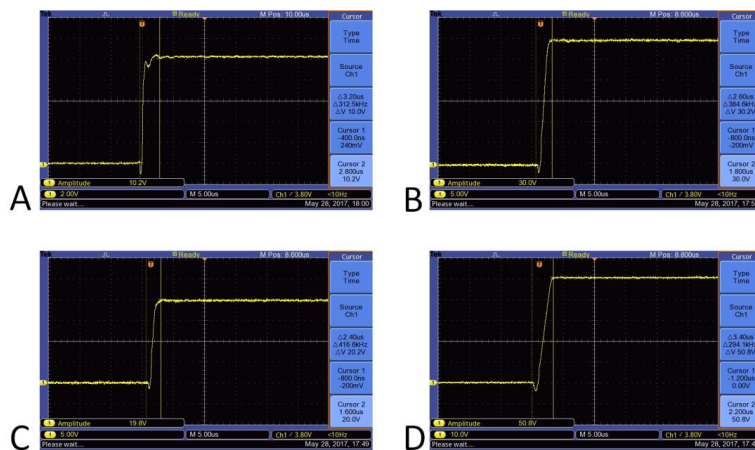


Figura 103 | Estimulación con un pulso de 1ms de ancho y diferentes amplitudes. Medición de los tiempos de transición  $T_{OFF-ON}$ . A) Pulso de 10V. B) Pulso de 20V. C) Pulso de 30V. D) Pulso de 50V.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

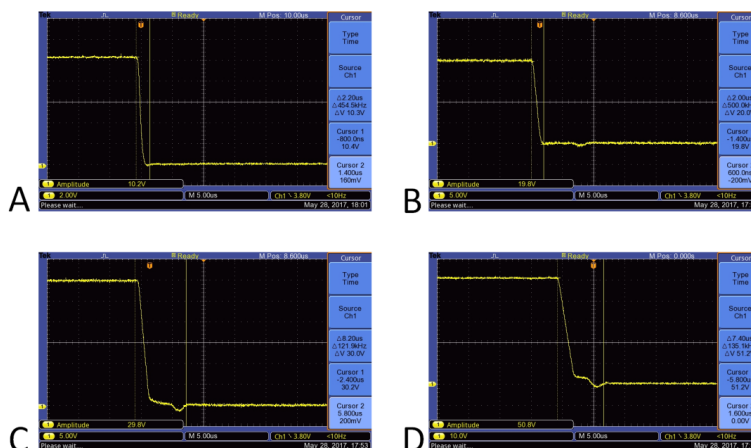


Figura 104 | Estimulación con un pulso de 1ms de ancho y diferentes amplitudes. Medición de los tiempos de transición  $T_{ON-OFF}$ . A) Pulso de 10V. B) Pulso de 20V. C) Pulso de 30V. D) Pulso de 50V.

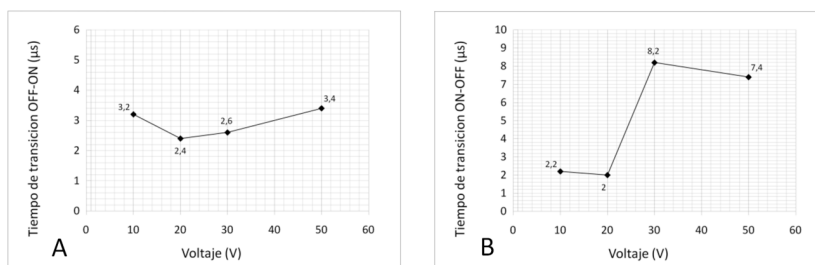


Figura 105 | Representación gráfica de los tiempos de transición obtenidos con los diferentes pulsos. A) Transición  $T_{OFF-ON}$  frente al voltaje. B) Transición  $T_{ON-OFF}$  frente al voltaje.

En la figura 105 se observa que los tiempos de transición tienden a incrementarse a medida que aumenta la amplitud de los pulsos. Aún así, todas las medidas obtenidas están muy por debajo de los 50μs que se especifican en los requerimientos de diseño descritos apartado 2.2.1. De hecho, la transición más lenta registrada tarda solo 8,2μs. A la vista de los resultados, se puede asumir que el comportamiento capacitivo de la preparación biológica no influye en los tiempos de transición de los pulsos.

Tras estas pruebas, se realizaron otras tres estimulaciones pero con diferentes tipos de señal. En este caso, el objetivo es demostrar las posibilidades de estimulación que ofrece el CANStim-8. Las figuras 106, 107 y 108 muestran la visualización de las tres señales configuradas:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59



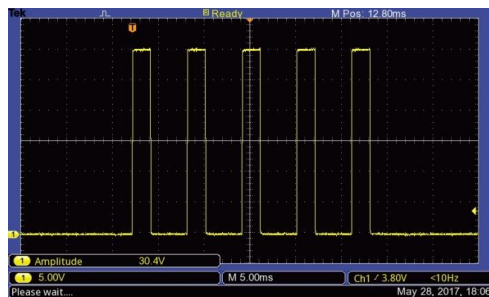


Figura 106 | Estimulación con cuatro pulsos consecutivos: 30V; 2ms de ancho de pulso; 4ms de separación entre pulsos.

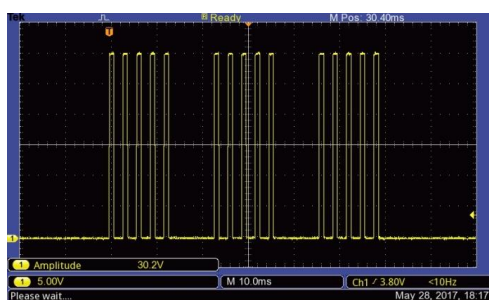


Figura 107 | Estimulación con tres trenes de pulsos: 30V; 1ms de ancho de pulso; 2ms de separación entre pulsos; 5 pulsos por tren; 10ms de separación entre trenes de pulsos.

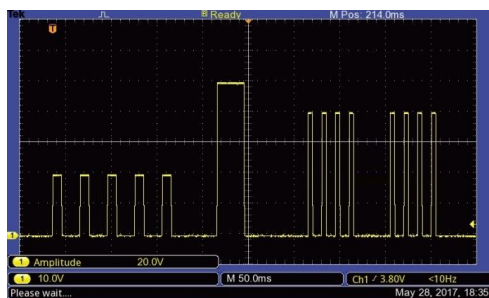


Figura 108 | Estimulación con tres señales distintas y concatenadas: 1) Señal de 5 pulsos consecutivos: 20V; 1ms de retardo; 10ms de ancho de pulso; 20 ms de separación entre pulsos. 2) Señal de un único pulso: 50V; 50ms de retardo; 30ms de ancho de pulso. 3) Señal de dos trenes de pulsos: 40V; 70ms de retardo; 5ms de ancho de pulso; 10ms de separación entre pulsos; 4 pulsos por tren; 4ms de separación entre trenes de pulsos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Finalmente, para evaluar la capacidad de estimulación del CANStim-8 se realizó una última prueba. Esta consistió en estimular dos segmentos de conducto deferente de rata; el primero con una señal eléctrica generada con el equipo S48 de *Grass Technologies* y el otro con la misma señal pero generada por el prototipo CANStim-8. Ahora, el objetivo es comparar la respuesta contráctil según se estimule con un equipo u otro.

Grass S48		CANStim8	
Modo de estimulación	Pulsos repetitivos	Modo de estimulación	Pulsos repetitivos
Voltaje	50V	Voltaje	50V
Límite de corriente	No configurable	Límite de corriente	1A
Retardo	No configurable	Retardo	0s
Ancho de los pulsos	1ms	T <sub>ON</sub>	1ms
Frecuencia	10Hz	T <sub>OFF</sub>	99ms
Duración	10s (manual)	Número de pulsos	100

Tabla 9 | Configuración de los parámetros de cada electroestimulador para generar una misma señal.

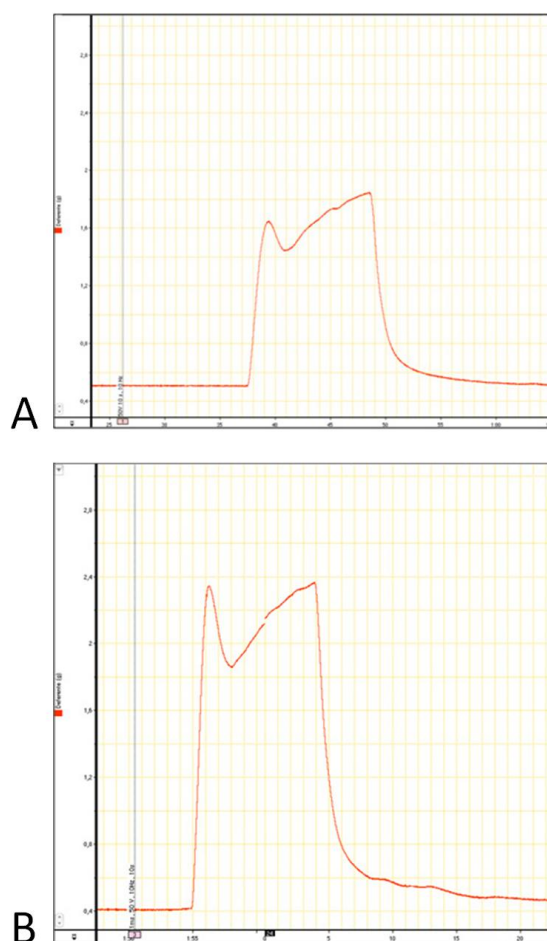
Para medir la amplitud de la contracción se utilizaron dos transductores isométricos modelo Tri202P (Panlab, España), uno para cada muestra y el equipo acondicionador de señal CANSBRIDGE-16. El cabezal sensible de estos transductores se ató directamente al extremo del segmento de tejido de manera que al contraerse, tira del sensor y este genera una señal eléctrica proporcional a la fuerza de la contracción (Fig. 100). Esta señal se monitorizó en el ordenador con el programa informático *LabChart Pro* (ADInstruments, Nueva Zelanda).

El *software* obtuvo la curva contracción-tiempo de cada muestra representando la fuerza de contracción en gramos frente al tiempo en segundos. A continuación, se muestran las curvas obtenidas con cada equipo (Fig. 109).

Como se puede observar en la figura 109A, la curva contracción-tiempo obtenida con el electroestimulador S48 muestra dos picos. El primero corresponde a una contracción muy rápida producida por la liberación de ATP que producen los receptores purinérgicos. La segunda contracción, algo más lenta y sostenida, se debe a la liberación de adrenalina que producen los receptores adrenérgicos. En valor máximo de contracción conseguido es de  $\approx 1.8$  gramos.

Por otro parte, la morfología de la curva obtenida con el prototipo CANStim-8 (Fig. 109B) es exactamente la misma que la obtenida con el estimulador S48. Esto era de esperar debido a que ambos equipos estimularon sus muestras con señales idénticas. No obstante, es fácil apreciar que con el CANStim-8 la fuerza de contracción máxima llega casi a los 2.4 gramos, lo que supone un incremento de 0,6 gramos respecto al valor máximo conseguido con el S48. Este incremento demuestra que, bajo las mismas condiciones, el nuevo electroestimulador es capaz de suministrar más corriente eléctrica y, por tanto, logra una mayor contracción de los tejidos.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Figura 109 | Comparación de la respuesta contráctil. A)** Curva contracción-tiempo obtenida con el estimulador S48. **B)** Curva contracción-tiempo obtenida con CANStim-8.

## 2.4. Discusión de los resultados.

Con CANStim-8 se ha logrado un equipo de electroestimulación de gran versatilidad para la investigación farmacológica y fisiológica. Además, su diseño y construcción reúne todas las características y funcionalidades que especificaron los científicos del grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis de la Universidad de La Laguna (ver apartado 2.2.1).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

En primer lugar, el equipo incluye los ocho canales de estimulación que se estipularon como requisito indispensable de su diseño. Además, se ha conseguido que sean totalmente independientes y cada cual puede estimular una preparación biológica diferente.

En segundo lugar, se especificó que el equipo pudiera ser reprogramado con nuevas funciones y otras formas de estimulación distintas a las que se establecen por defecto. En este sentido, todo el control del CANStim-8 está basado en electrónica digital programable y su *firmware* puede actualizarse para incluir funcionalidades personalizadas en cualquier momento. Esto también implica la posibilidad de cambiar el aspecto visual de la interfaz gráfica y la forma de navegar por las distintas opciones de configuración según las preferencias de los usuarios.

Otro de los requisitos que debía cumplir el equipo es incorporar un sistema de seguridad que detenga la estimulación de forma automática en caso de producirse un consumo elevado de corriente eléctrica a la salida. La Unidad de Protección que incluyen los canales de CANStim-8 no solo detiene la estimulación, sino que también desconecta automáticamente la carga del equipo y no permite conectarla hasta que el consumo esté por debajo del límite establecido por el usuario.

Por otro lado, los pulsos de voltaje que genera el CANStim-8 alcanzan una amplitud máxima de 60V y, según se demostró en el apartado 2.3, mantienen una forma cuadrada muy bien definida a pesar de la impedancia capacitiva de las preparaciones biológicas. Además, en las especificaciones de diseño del apartado 2.2.1 se estableció que los tiempos de transición de los pulsos no debían superar los 50µs. Los resultados obtenidos durante la experimentación en el Laboratorio de Farmacología demuestran que estos tiempos no llegan a superar los 10µs en el peor de los casos.

Por defecto, el *firmware* del equipo se ha programado para generar los dos tipos de señal estipulados. Pulsos y trenes de pulsos. Para configurar las señales, el equipo ofrece los parámetros característicos que definieron los investigadores así como el rango de valores que especificaron para cada uno.

También se especificó que el nuevo electroestimulador debe almacenar en una memoria interna la configuración de distintas señales. Por defecto, CANStim-8 permite guardar hasta diez programas diferentes, pero el número puede ampliarse con una actualización de *firmware*.

Por otro lado, los investigadores mostraron especial interés en la combinación de pulsos y trenes de pulsos para estimular con señales de mayor complejidad. En este sentido, el nuevo equipo permite concatenar automáticamente hasta 4 señales diferentes. El número de señales también puede ampliarse con una actualización de *firmware*.

Otro de los requisitos de diseño establece que cada canal debe contar con al menos una salida para señales digitales de sincronización que permita coordinar la estimulación con otros dispositivos de laboratorio. En el caso del CANStim-8, cada canal ofrece una señal digital de salida idéntica a la señal de estimulación, pero con niveles de tensión TTL. Por otro lado, también disponen de una entrada de señal digital con la que se puede iniciar o detener la estimulación con un pulso TTL.

Por último, la construcción del equipo es totalmente modular, tal y como se especificó en el apartado 2.2.1. Su bastidor *rackeable* permite acoplar y desacoplar las diferentes partes de manera rápida y, además, al ser canales totalmente independientes, el equipo puede permanecer operativo incluso cuando se retira alguno de ellos para su reparación. Al haber enfocado el diseño de esta manera, es posible construir nuevos canales compatibles con las conexiones del CANStim-8 y diseñados especialmente para las necesidades particulares de un investigador. En estos casos, como

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

el equipo es reprogramable, el *firmware* se actualizaría para operar con las prestaciones *hardware* del nuevo canal. No cabe duda de que esta posibilidad supondría una buena oportunidad de negocio para comercializar el CANStim-8.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Perspectivas de futuro

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

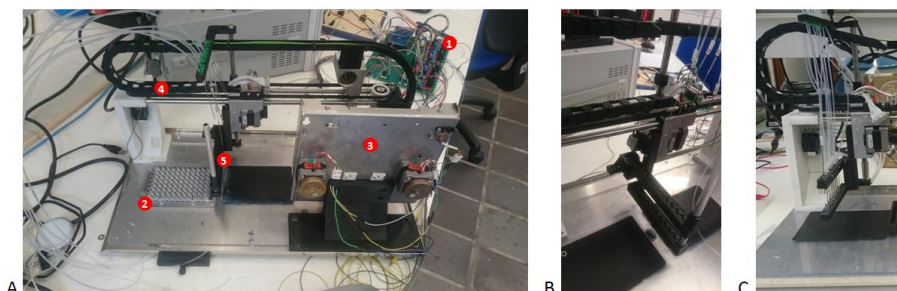
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Recapitulando acerca del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, resulta muy satisfactorio ser participe de una labor de ingeniería que comenzó con algunas ideas desordenadas y unos bocetos dibujados en un papel y ha terminado con la construcción de dos nuevos instrumentos de laboratorio con los que ya se están desarrollando nuevas técnicas de experimentación con tejidos animales vivos.

No obstante, el entusiasmo generado por los resultados de esta Tesis ha sido motivación más que suficiente para seguir trabajando en el desarrollo de estos instrumentos. La intención es seguir incorporando funcionalidades o mejoras que permitan abordar nuevas líneas de investigación o retomar aquellas que, por no existir la tecnología necesaria en su momento, quedaron relegadas.

Con el MuWOB se pretende un proyecto realmente ambicioso. Al haber conseguido trasladar la técnica del baño de órganos a una placa multipocillos, la idea que se plantea para el futuro es construir una multiplataforma robótica, que aunque a menor escala es similar en su concepto a las que poseen las grandes empresas farmacéuticas. Con ella se pretende automatizar los experimentos con tejidos animales vivos mediante pequeñas estaciones robóticas dedicadas a realizar procesos independientes como manejar líquidos, tomar medidas y cortar los tejidos.

Como primer paso, en el Servicio de Electrónica de la Universidad de La Laguna ya se está trabajando en un sistema robótico para el manejo automático de líquidos (Fig. 110). En términos generales, el sistema consiste en un brazo robótico con un cabezal similar a una multi-pipeta (Fig. 110 ítem 5) y que responde a las órdenes que envía un *software* desde un ordenador. Este sistema podrá generar una secuencia de operaciones que el usuario ha de configurar previamente para indicar el volumen de las dosis y el momento en que deben inyectarse, entre otras cosas.



**Figura 110 | Prototipo del sistema de inyección automática de líquidos. A) Vista general del estado del prototipo (1) Placa electrónica de control. (2) Placa multipocillos. (3) Soporte para la sujeción de jeringas. (4) Brazo robótico. (5) Cabezal de inyección. B) Vista superior del cabezal de inyección: se observa el cabezal desmontado así como el motor de movimiento vertical. C) Vista lateral del cabezal de inyección; en este otro caso, el cabezal tiene instalados los conductos para la inyección de líquidos y las mangueras que conectan directamente con las jeringas.**

Al mismo tiempo, también se está trabajando en una estufa calefactora donde trabajen conjuntamente el sistema de medida MuWOB y este brazo robótico, de momento bautizado como el "MuROB" (Fig. 111). La idea de incluir todo dentro de la estufa permitirá mantener controlada y homogénea la temperatura de los tejidos y de los líquidos a administrar sin necesidad de utilizar un circuito de agua templada y la placa calefactora que se usa actualmente en el sistema MuWOB.

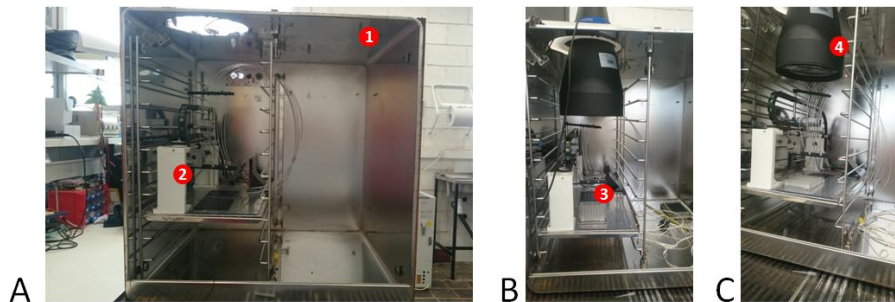
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

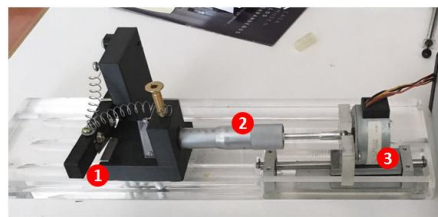
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Además, al operar en ambiente de saturación de humedad, se soslaya el problema de la evaporación detectado en experimentos largos con el MuWOB descrito.



**Figura 111 | Integración del sistema MuWOB y el brazo robótico MuROB en una estufa calefactora.** A) Integración del robot. (1) Estufa. (2) Brazo robótico. B y C) Integración del sistema MuWOB (3B) Placa multipocillos. (4C) Objeto bi-telecéntrico.

Paralelamente, se está construyendo una herramienta de corte que automatiza el trabajo de cortar las arterias y otros conductos orgánicos en pequeños anillos (Fig. 112). Hoy, esta labor se realiza manualmente con tijeras de precisión bajo un microscopio, lo cual es muy tedioso e implica un alto consumo de tiempo. Además, es una práctica que requiere mucha precisión y las muestras se dañan con mucha frecuencia.



**Figura 112 | Herramienta de corte.** (1) Cizalla. (2) Micrómetro. (3) Motor paso a paso.

En cuanto al proyecto CANStim-8, a corto plazo, se pretende sustituir la fuente de alimentación de 60 voltios por una de 120 voltios. Esto permitirá al equipo generar señales con mayor potencia para estimular preparaciones biológicas con mayor impedancia. En este caso, no será necesario realizar ningún cambio en la implementación *hardware*, pues como se ha comentado, las Unidades de Potencia del equipo fueron diseñadas para operar con valores de potencia eléctrica muy superiores a los que actualmente ofrece el estimulador.

Simplemente bastará con cambiar una fuente de alimentación por otra. También a corto plazo, se ha pensado en incorporar una pequeña ventana tipo osciloscopio para visualizar la señal de salida de los canales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



### Perspectivas de futuro

A medio plazo, se ha pensado en incorporar una conexión inalámbrica de corta distancia para comunicar el equipo con un *smartphone* o una *tablet* mediante una aplicación *software* para dispositivos móviles. Con ello, se pretende que el investigador pueda configurar el equipo y controlar la estimulación de los diferentes canales desde cualquier parte del laboratorio.

Finalmente, a largo plazo, la idea es implementar una función de diagnóstico y actualización remota del equipo vía Internet. De esta manera, si en un futuro se logra comercializar el CANStim-8, será posible llevar a cabo reparaciones y actualizaciones de *software* a distancia. Por ejemplo, si un supuesto cliente necesita una señal de estimulación muy concreta, se podría actualizar el *software* con las nuevas funciones y luego descargarlo en el equipo a través de Internet. También podría darse el caso de que el posible cliente quiera encargar la construcción un canal compatible con las conexiones del equipo pero que implemente funciones distintas. En este caso, el módulo se diseñaría según las especificaciones, se le enviaría por correo, y luego se actualizaría el *software* de su CANStim-8 para que lo reconociera y pueda operar con él.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Conclusiones

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

1. De acuerdo con la escala de madurez tecnológica *Technology Readiness Level*, los prototipos MuWOB y CANStim-8, cumplen con un nivel TRL-6 por haberse demostrado su funcionamiento en un entorno relevante; en el Laboratorio de Farmacología del IUBO-AG de la Universidad de La Laguna y con experimentos farmacológicos reales.
2. El MuWOB supone un nuevo instrumento para llevar a cabo estudios farmacológicos sobre actividad contráctil en anillos de tejido, como secciones de vasos sanguíneos y tráquea, obteniendo resultados comparables a los conseguidos por los sistemas tradicionales basados en transductores electrónicos.
3. La capacidad de análisis del MuWOB es muy superior a la de los sistemas tradicionales y permite el estudio simultáneo de 96 preparaciones de manera rápida y con equipamiento relativamente barato.
4. Para un mismo ensayo farmacológico, el MuWOB reduce el consumo de animales y sustancias en comparación con el baño de órganos convencional.
5. El MuWOB permite emplear la técnica de baño de órganos en estudios farmacológicos de cribado a gran escala.
6. El CANStim-8 supone un nuevo equipo de electroestimulación para llevar a cabo estudios farmacológicos sobre actividad contráctil mediante la estimulación eléctrica de preparaciones biológicas de baja impedancia.
7. El CANStim-8 permite estimular 8 preparaciones biológicas al mismo tiempo y de forma totalmente independiente, cumpliendo con todas las especificaciones de diseño y funcionamiento que especificaron los investigadores del Grupo de Investigación Neurosecreción y Exocitosis de la Universidad de la Laguna.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Reflexión personal

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

He de confesar que la culminación de esta Tesis Doctoral me ha supuesto una enorme satisfacción personal, no solo por haber terminado una etapa de mis estudios, sino también por haber sido participe en un proyecto enmarcado en un contexto de la ingeniería que, hoy en día, se posiciona como punta de lanza de las innovaciones más inmediatas y que a mí, particularmente, me fascina. La tecnología médica, ya sea para su uso clínico o investigador, es una disciplina que brinda a los ingenieros electrónicos, informáticos, mecánicos, etc., la oportunidad de contribuir con una causa tan justificada como es preservar y mejorar la calidad de vida de los demás y la de nosotros mismos. Gracias a esta Tesis, creo que he podido aportar mi granito de arena.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Bibliografía

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

- Aboud, R., Shafii, M. y J.R. Docherty. (1993). Investigation of the subtypes of alpha 1-adrenoceptor mediating contractions of rat aorta, vas deferens and spleen. *Brit J Pharmacol.* 190. 80.
- Adeabo, A.S. y C.R. Triggle. (1993). Interactions of nitric oxide synthase inhibitors and dexamethasone with alpha-adrenoceptor-mediated responses in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 109(2). 495.
- Auguet, M., DeFeudis, F.V. y F. Clostre, (1982). Effects of *Ginkgo biloba* on arterial smooth muscle responses to vasoactive stimuli. *Gen Pharmacol.* 13(2). 169.
- Blattner, R.; Classen, H.G.; Dehnert, H.; H.J. Döring. (1978). Experiment on isolated smooth muscle preparations. *Biological Mesasuring Techniques.* 4-12.
- Bolli, P., Wood, A.J., Phelan, E.L., D.R. y F.O. Simpson (1975). Prazosin: preliminary clinical and pharmacological observations. *Clin Sci Med Suppl.* 2. 177s
- Borges, R., Díaz-Martín, D., Hernández-Jiménez, J.G., Rodríguez-Valido y M., Beltrán, B. (2016). Analyzing isolated blood vessel contraction in multi-well plates. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 389(5).
- Buus, N.H., VanBavel, E. y M.J. Mulvany, (1994). Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations. *Br Pharmacol.* 112. 579.
- Díaz-Martín, D., Hernández-Jiménez, J.G.; Rodríguez-Valido, Manuel y Borges, R., (2015). Measuring the Contractile Response of Isolated Tissue Using an Image Sensor. *Sensors. Especial edition Novel Biomaterials and Sensor for Tissue Engineering.* 15(4). 9179-9188.
- Domínguez Lavín, A., (2011). Distorsión de lente vs distorsión de perspectiva. Recuperado de <https://www.xatakafoto.com/guias/distorsion-de-vs-distorsion-de-la-perspectiva>.
- Edmund Optics. Advantages of Telecentricity. Edmund Optics webside. Recuperado de <https://www.edmundoptics.com/resourse/aplicacion-nottes-imaging-advantages-of-telecentricity>.
- European Commission, G. Technology readiness levels (TRL), HORIZON 2020 – WORK PROGRAMME 2014-2015. General Annexes, Extract from Part 19 - Commission Decision C(2014)4995.
- Exton, J.H. (1985). Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am J Physiol.* 248(6 Pt 1). E633.
- Galois Cagua, G., (2015). Breve historia de la perspectiva. Recuperado de <http://dibujoenperspectivaleccion.blogspot.com.es/2015/02/como-dibujar-en-perspectiva.html>.
- Haralick, R.M. y Shapiro, L.G., (1991). *Computer and Robot Vision. Vol. I.* Massachusetts, EEUU. Addison-Wesley Longman Publishing CO.
- Hernández Jiménez, J.G., (2015). *Nuevas herramientas para la investigación en Farmacología.* Tesis Doctoral. Departamento de Medicina Física y Farmacología Facultad de Medicina. Santa Cruz de Tenerife. Universidad de La Laguna.
- Hieble, J.P., Kolpak, D.C., McCafferty, G.P., Ruffolo, R.R. Jr, Testa, R y A. Leonardi. (1999). Effects of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonists on agonist and tilt-induced changes in blood pressure: relationships to uroselectivity. *Eur J Pharmacol.* 373(1). 51
- Holck, M.I. (1988). Alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor reserve and effects of a Ca<sup>2+</sup> entry blocker (Ro 18-3981) on aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 148(1). 9.
- Kurz, T., Scheneider, I., Tölg, R. y G. Richardt. (1999). Alpha 1-adrenergic receptor-mediated increase in the mass of phosphatidic acid and 1,2 diacylglycerol in ischemic rat heart. *Cardiovasc Res.* 42(1). 48.
- Macia, R.A., Matthews, W.D., Lafferty, J. y R.M. DeMarinis. (1984). Assessment of alpha-adrenergic receptor subtypes in isolated rat aortic segments. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 325(4). 306.
- Mikroelektronika Ltd. (2015) MikroC PRO for PIC libraries. *Mikroelektronika web side.* Recuperado de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## Bibliografía

[https://download.mikroc.com/documents/compilers/mikroc/pic/help/mikroc\\_pro\\_libraries.htm](https://download.mikroc.com/documents/compilers/mikroc/pic/help/mikroc_pro_libraries.htm)

Nunes, J.P. y S. Guimaraes, (1999). The influence of the wall tension on the contractile responses of arteries. *Fundam Clin Pharmacol.* 13(2). 193

Opto-Engineering, (2015). Introducción a la óptica telecéntrica. Información básica y principios de funcionamiento. *Opto-Engineering webside*. Recuperado de [www.opto-engineering.es/resour-telecentrica-lenses-tutorial](http://www.opto-engineering.es/resour-telecentrica-lenses-tutorial).

Otsu, N., (1975). A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica.* 11. 23–27.

Rashid, M. (2002). *Circuitos Microelectronicos. Análisis y Diseño*. Thomson Publishing.

Robert B. Reese, J.W. Bruce, Bryan A. Jones, (2009). *Microcontrollers: From Assembly Language to C Using the IC24 Family*. Course Technology.

Scarborough, N.L. y G.O. Carrier, (1994). Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. I. Role of extracellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction. *J Pharmacol Exp Ther.* 231. 597.

The Mathworks Inc. (2011). Matlab (R2011b). [CD-ROM]. Natick, MA, USA.

The Mathworks Inc., (2015a). Image Acquisition Toolbox. *The Mathworks Inc. webside*. Recuperado de <http://es.mathworks.com/products/imaq/>

The Mathworks Inc., (2015b). Image Processing Toolbox. *The Mathworks Inc. webside*. Recuperado de <http://es.mathworks.com/products/image/>

The Mathworks Inc., (2015c) Gui de MATLAB. *The Mathworks Inc. webside*. Recuperado de <http://es.mathworks.com/discovery/matlab-gui.html>

Universidad de La Laguna. Patente. *Procedimiento y dispositivo para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas mediante métodos ópticos*. Borges, R., Rodríguez-Valido, M., Machado, J.D., Beltrán, B., Suarez-Montesinos, M., Díaz-Martín, D. y González-Morales, Y. ES. Int. CI: G01N 33/483, no. 2006.31. 31 enero de 2014.

Venturini, C.M., Palmer, R.M. y S. Moncada. (1993). Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 266. 1497.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



# Apéndices

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Apéndice I

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## Guía de Usuario MuWOB Software

### PASO 1: INSTALACIÓN DEL PROGRAMA.

Antes de comenzar a utilizar *MuWOB Software* primero debe instalar *Matlab Compiler Runtime* (MCR) en su PC. Esto le permitirá ejecutar el programa sin tener instalado Matlab® en su ordenador. Para ello, primero haga una copia del *directorio MuWOB Software* que contiene el CD y guárdelo en su PC (Fig.1). A continuación, siga las siguientes instrucciones.

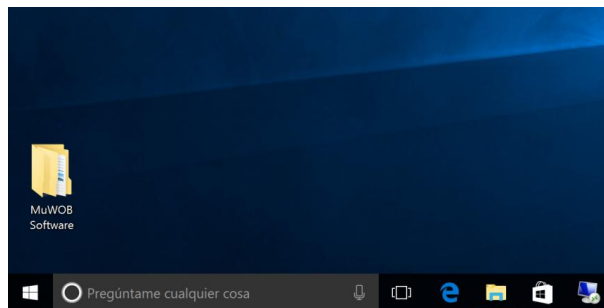


Figura 1 | Copia de los archivos de instalación de *MuWOB software*.

- 1 Dentro del directorio *MuWOB Software*, sitúese en *MuWOB* → *distrib* (Fig. 2). A continuación, haga doble clic sobre el fichero *MuWOB\_pkg* para iniciar la instalación de *Matlab Compiler Runtime*.

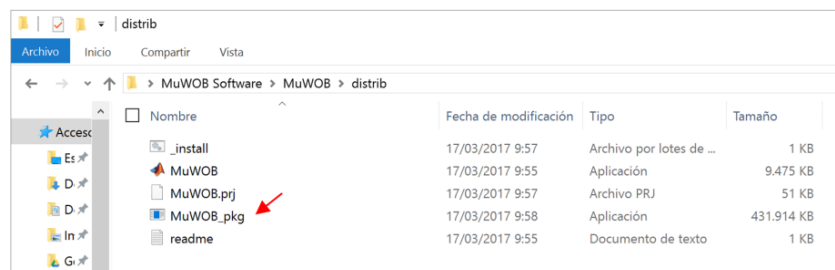


Figura 2 | Contenido del directorio *distrib*.

- 2 En la ventana que aparece en la figura 3, responda con una *n* a las tres preguntas que le hace el asistente de instalación.

2

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

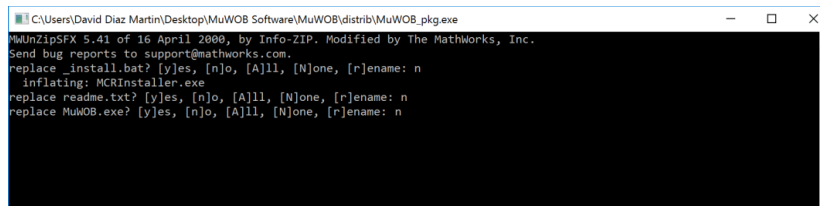


Figura 3 | Asistente de instalación.

Tras la última pregunta, comenzará la descompresión de los archivos necesarios (Fig. 4). Espere a que termine el proceso.

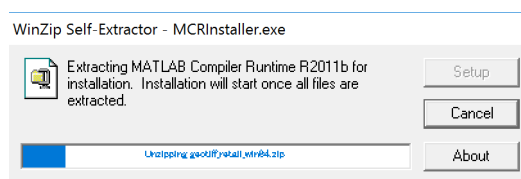


Figura 4 | Proceso de descompresión de archivos.

- Una vez finalizado, aparecerá una ventana que contiene una descripción sobre la política de uso y privacidad de la aplicación *Microsoft C++ 2005 Redistributable* (Fig. 5). Esta aplicación es necesaria para luego ejecutar el asistente gráfico del instalador de *Matlab Compiler Runtime*. Para continuar con la instalación, simplemente haga clic en el botón Yes.

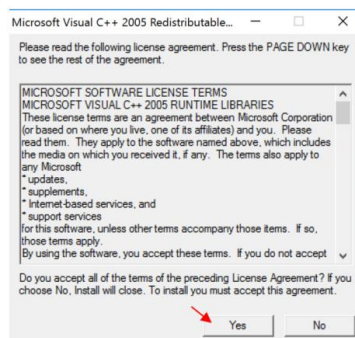


Figura 5 | Política de uso y privacidad de la aplicación.

Inmediatamente comenzará la instalación de *Microsoft Visual C++ 2005 Redistributable*. Espere a que finalice el proceso.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

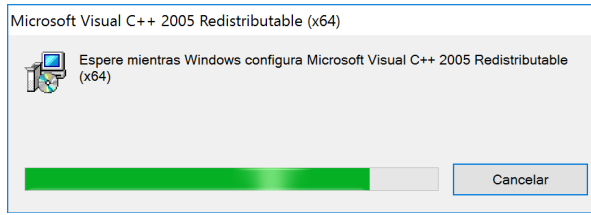


Figura 6 | Instalación de *Microsoft Visual C++ 2005 Redistributable*.

Tras completarse la barra de estado de la figura 6, se inicia automáticamente el asistente gráfico del instalador *Matlab Compiler Runtime* (Fig. 7).

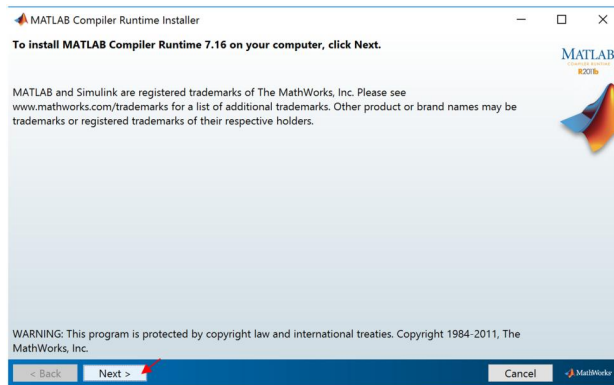


Figura 7 | Asistente gráfico para la instalación de *Matlab Compiler Runtime*.

- ④ Haga clic en el botón *Next* para continuar la instalación. En la siguiente ventana (Fig. 8) especifique el directorio donde desea instalar *Matlab Compiler Runtime* y haga clic nuevamente en el botón *Next*.

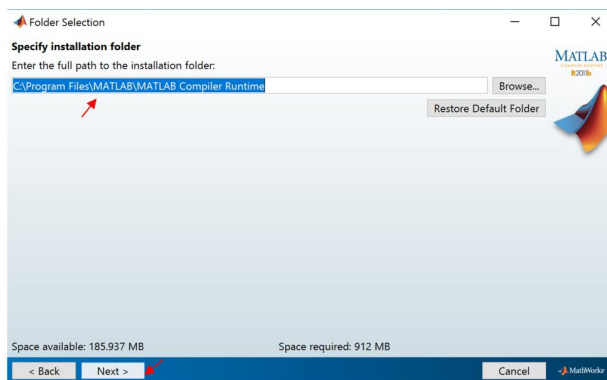


Figura 8 | Directorio para la instalación de *Matlab Compiler Runtime*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25	
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34	
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59	

Si el directorio que ha especificado no existe, aparecerá un cuadro de diálogo (Fig. 9) preguntándole si desea crearlo. Si es así, haga clic en el botón *Yes* para continuar. En caso contrario, seleccione *No* y especifique otro directorio.

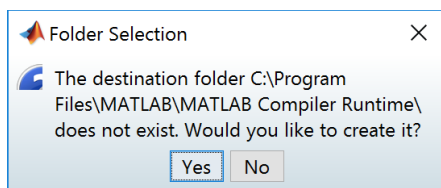


Figura 9 | Cuadro de diálogo para crear el directorio de instalación.

- ➊ A continuación, el asistente mostrará un resumen con las características de su instalación (Fig. 10). Si esta conforme, haga clic en el botón *Install* para iniciar la instalación de *Matlab Compiler Runtime*.

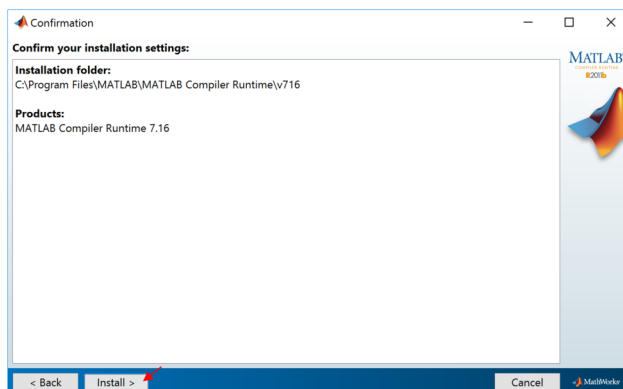


Figura 10 | Resumen de la instalación.

Inmediatamente se iniciará el proceso de instalación (Fig. 11). Espere a que finalice. Esto puede tardar varios minutos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

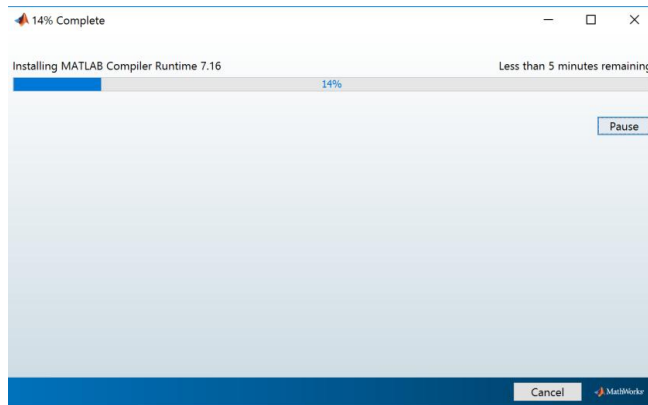


Figura 11 | Instalando *Matlab Compiler Runtime*.

- ⑥ Una vez completado el proceso, haga clic en *Finish* para salir del asistente (Fig. 12). En este momento, ya puede comenzar a utilizar *MuWOB Software*.

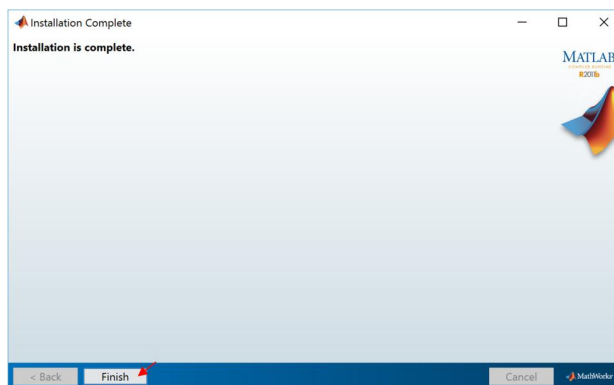


Figura 12 | Instalación de *Matlab Compiler Runtime* completa.

**PASO 2: INICIAR *MuWOB SOFTWARE***

Antes de iniciar *MuWOB Software* es recomendable tener preparado el baño de órganos multipocillos sobre la plataforma de observación con el sistema de iluminación encendido. Siga las instrucciones que se indican a continuación para iniciar correctamente el programa.

- ① Encienda la videocámara y asegúrese de que está conectada al ordenador. Si inicia *MuWOB Software* antes de encender y conectar la videocámara, el programa no la reconocerá.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

- 2 Sitúese en el directorio MuWOB Software → MuWOB → distrib e inicie el programa haciendo doble clic en el fichero MuWOB.exe (Fig. 13). Si lo desea, también puede crear un acceso directo a este fichero en el escritorio de su ordenador para disponer del programa de forma inmediata.

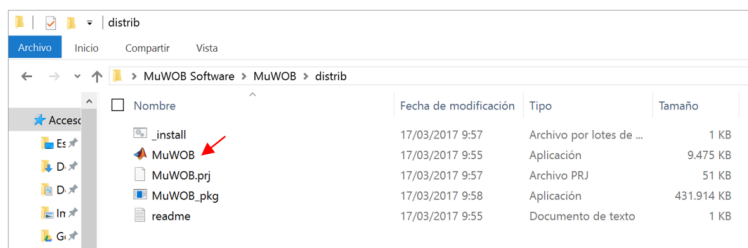


Figura 13 | Ejecutar MuWOB Software.

Tras unos segundos, el programa despliega la ventana principal (Fig. 14). Comprobará que carece de acceso a muchas de las opciones que se muestran. En adelante, estas opciones se irán activando a medida que complete más pasos. En general, el aspecto visual del programa es muy sencillo y además, le resultará muy fácil e intuitivo de manejar.



Figura 14 | Ventana principal de MuWOB Software.

### PASO 3: SELECCIONAR Y AJUSTAR LA VIDEOCÁMARA

Para medir correctamente las contracciones, es importante que las fotografías se tomen en las mejores condiciones posibles. Por tanto, debe ajustar el objetivo de la videocámara para que las imágenes queden perfectamente enfocadas. También, ha de procurar que la respuesta de los tejidos quede registrada con la mayor cantidad de píxeles posible, con lo que, dependiendo de la cantidad de pocillos que utilice, deberá manipular el zoom y la distancia vertical de la videocámara.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Para garantizar unas fotografías en las mejores condiciones, *MuWOB Software* le permite previsualizar la vista de la videocámara para ajustar el enfoque y encuadrar los pocillos dentro del campo de visión antes de comenzar un experimento. Siga las instrucciones que se indican a continuación para ajustar la videocámara.

- 1 En el panel *Camera Select* aparece una lista con las videocámaras disponibles en su ordenador (Fig. 15). Seleccione la que vaya a utilizar haciendo clic con el ratón sobre el nombre. A continuación haga clic en el botón *Preview*. En el panel *Camera View* aparecerá la vista de la videocámara.

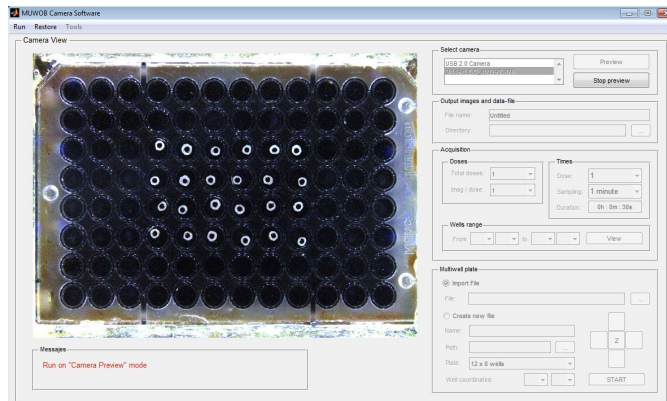


Figura 15 | Selección y ajuste de la videocámara.

- 2 Ajuste el objetivo de la videocámara manualmente hasta conseguir una imagen bien enfocada. Asegúrese de que todos los pocillos que contengan tejido queden dentro del campo de visión. Evidentemente, aquellos que queden fuera del alcance visual de la videocámara no serán analizados.
- 3 Una vez satisfecho con la imagen, detenga la previsualización de la videocámara haciendo clic sobre el botón *Stop preview*.

#### PASO 4: CONFIGURAR UNA PLACA MULTIPOCILLOS.

Antes de comenzar un experimento, debe asegurarse de que el programa conoce los parámetros físicos de la placa multipocillos que vaya a utilizar. Para ello, *MuWOB Software* ofrece un asistente que le permitirá configurar las características de las placas que use en sus experimentos. El propio asistente le irá indicando en el panel *Messages* las instrucciones que ha de seguir. Como resultado, el programa generará un fichero con extensión *.xls* donde almacena todos los cálculos y mediciones realizadas sobre la placa multipocillos. De esta manera, la información queda registrada para que la próxima vez que necesite utilizar la misma placa, solo tenga que seleccionar el fichero

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

correspondiente. Siga las instrucciones que se indican a continuación para configurar una placa multipocillos.

- 1 En el panel *Multiwell plate* seleccione la opción *Create new file*. Luego haga clic en el botón *Start* (Fig. 16).



Figura 16 | Iniciar el asistente de configuración de placas multipocillos.

- 2 Seleccione una videocámara en el panel *Select camera* y luego haga clic en el botón *Next* (Fig. 17).



Figura 17 | Seleccionar una videocámara para configurar una placa multipocillos.

- 3 Inmediatamente aparece la vista de la videocámara en el panel *Camera preview* (Fig. 18). Haga clic en el botón *Photo* para tomar una fotografía de la placa.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

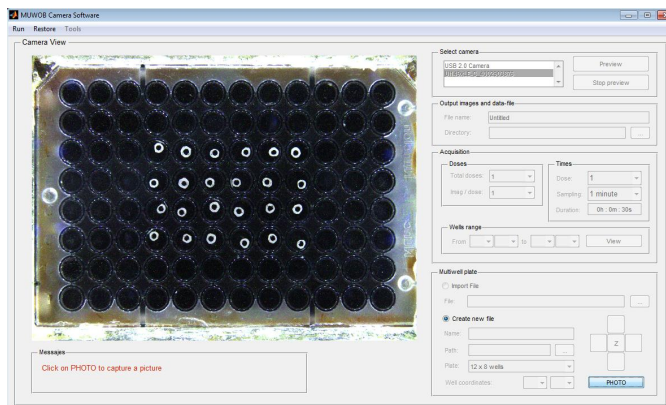


Figura 18 | Vista de la videocámara para configurar una placa multipocillos.

En este instante el programa detiene la vista de la videocámara y muestra la fotografía capturada en el panel *Camera view* (Fig. 19).

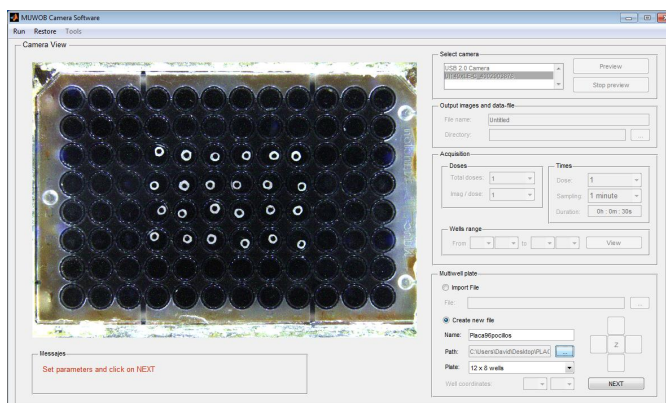


Figura 19 | Configuración del fichero donde se almacena la información de la placa multipocillos.

- ④ En el campo *Name* del panel *Multiwell plante* introduzca el nombre que desee asignar al fichero que almacenará los parámetros de su placa multipocillos. En el campo *Path*, indique el directorio donde se guardará el fichero. Por último, en el campo *Plate* seleccione el tipo de placa multipocillos que va a utilizar (en esta primera versión, el *software* solo admite placas de 96 pocillos distribuidos en 8 filas y 12 columnas). Luego haga clic en el botón *Next* para continuar (Fig. 19).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

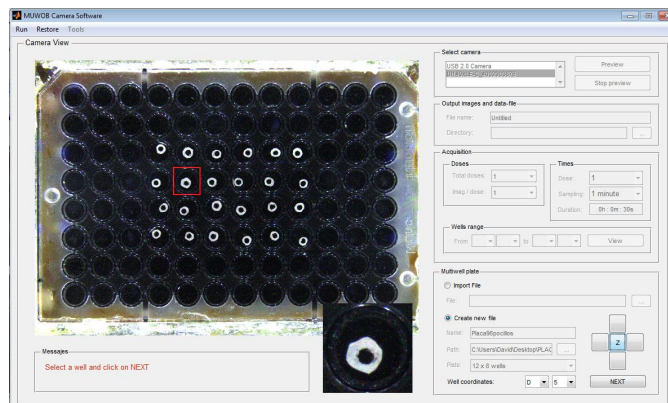


Figura 20 | Configuración del pocillo de referencia.

En la fotografía aparecerá un recuadro rojo (Fig. 20). Observe también que el área de la imagen delimitada por este recuadro aparece ampliada en una nueva vista situada en la esquina inferior derecha del panel *Camera view*.

- 5. Escoja un pocillo e indique sus coordenadas en la opción *Well coordinates* de panel *Multiwell plate* (Fig. 20). El asistente utilizará este pocillo como referencia para calcular los parámetros de la placa.
- 6. A continuación, desplace el recuadro rojo por la fotografía y acomode su tamaño hasta que el pocillo seleccionado quede perfectamente ajustado las dimensiones de la vista ampliada (Fig. 20).

Para desplazar el recuadro utilice los botones de desplazamiento vertical y horizontal del panel *Multiwell plate*. Para ajustar el tamaño del recuadro, haga clic sobre el botón Z (zoom). Observe que los botones de desplazamiento superior e inferior cambian su función por + y - respectivamente (Fig. 21). Para volver a la función desplazamiento haga clic nuevamente en el botón Z.

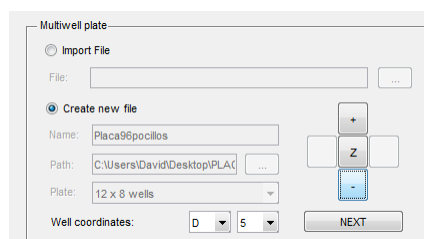


Figura 21 | Controles de la función zoom.

Una vez ajustado el pocillo de referencia, haga clic en el botón *Next*. Aparecerá un nuevo recuadro de color verde en la fotografía. (Fig. 22)

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

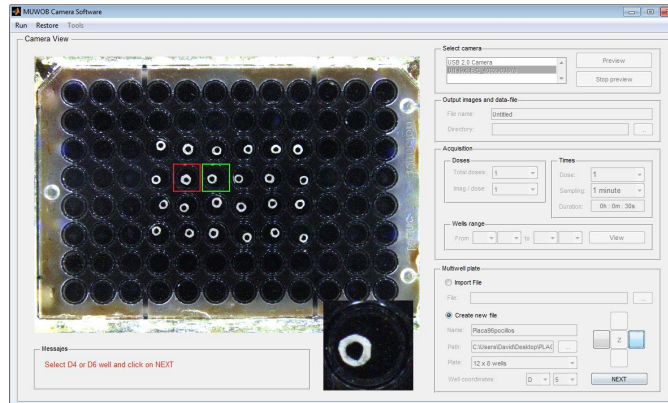


Figura 22 | Selección del pocillo contiguo al de referencia por la derecha.

- 7 Utilice solo los botones de desplazamiento horizontal y ajuste el recuadro verde a uno de los pocillos contiguos al de referencia. Puede escoger el pocillo de la izquierda o el de la derecha (Fig. 59). Luego haga clic sobre el botón Next. Aparecerá un último recuadro, esta vez de color azul (Fig. 23).

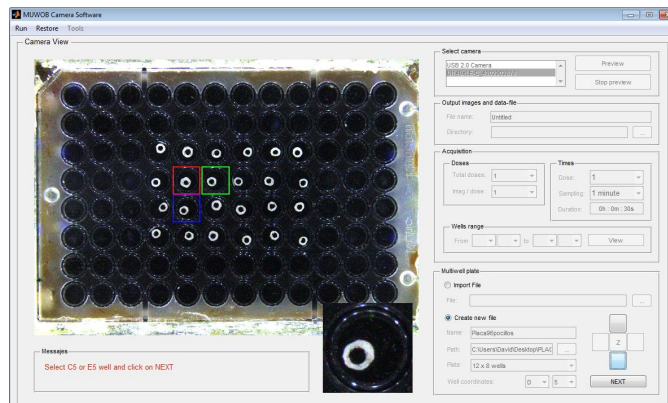


Figura 23 | Selección del pocillo contiguo al de referencia por debajo.

- 8 Utilice solo los botones de desplazamiento vertical y ajuste el recuadro azul a uno de los pocillos contiguos al de referencia. Puede escoger el pocillo por encima o por debajo (Fig. 23). Luego haga clic sobre el botón Next y a continuación en el botón Centers.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

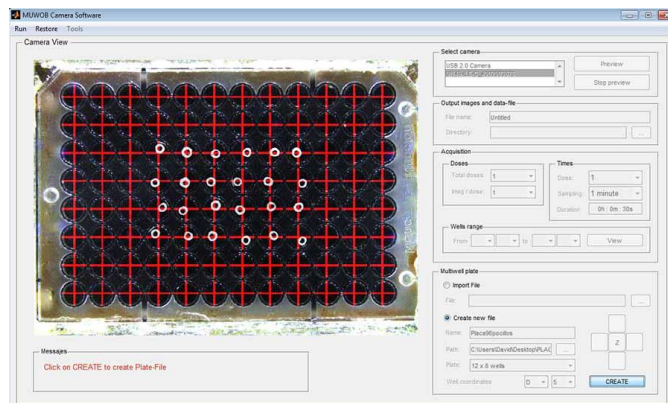


Figura 24 | Cálculo de los parámetros de la placa multipocillos.

Tras hacer clic en *Centers*, el asistente calcula el diámetro (en píxeles) y las coordenadas de los píxeles más próximos al centro de cada pocillo (Fig. 24).

- 9 Si el resultado es satisfactorio, haga clic en el botón *Create* para generar el fichero de la placa. El archivo se guarda con la extensión *\_PLC.xls*. Si el resultado no le conviene, vuelva a repetir los pasos anteriores y ajuste los pocillos con mayor precisión.
- 10 Finalice el asistente de configuración de placas seleccionando la opción *Import file* en el panel *Multiwell plate*.

**PASO 5: IMPORTAR UNA PLACA MULTIPOCILLOS.**

- 1 En el panel *Multiwell plate* seleccione la opción *Import file* y luego haga clic sobre el botón de búsqueda. Aparecerá la ventana *Select File to Open* (Fig. 25).

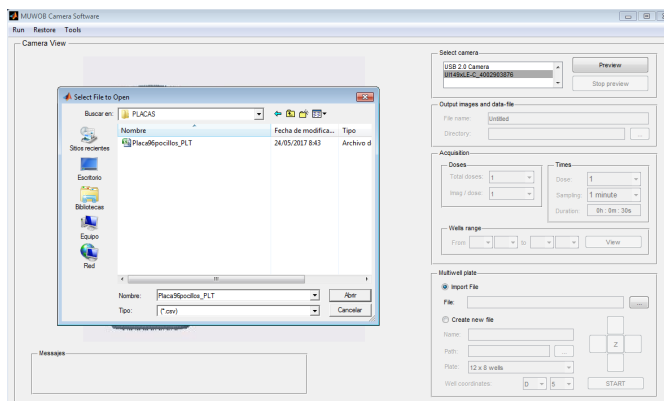


Figura 25 | Importar un archivo de placa multipocillos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Seleccione el archivo con extensión *\_PLC.xls* que contenga la configuración de la placa multipocillos que vaya a utilizar y luego haga clic sobre el botón *Abrir*. Automáticamente, la aplicación toma una fotografía de la placa multipocillos que está sobre la plataforma de observación y la muestra el panel *Camera view*. En la misma imagen, el programa dibuja una cruz roja en cada pocillo para indicar la ubicación de su centro según la información contenida en el archivo seleccionado (Fig. 26).

- En el cuadro de diálogo (Fig. 26), haga clic en el botón *Yes* si la ubicación de los centros es correcta. Si no lo es, haga clic en *No*. En este último caso, seleccione otro archivo o configure una nueva placa.

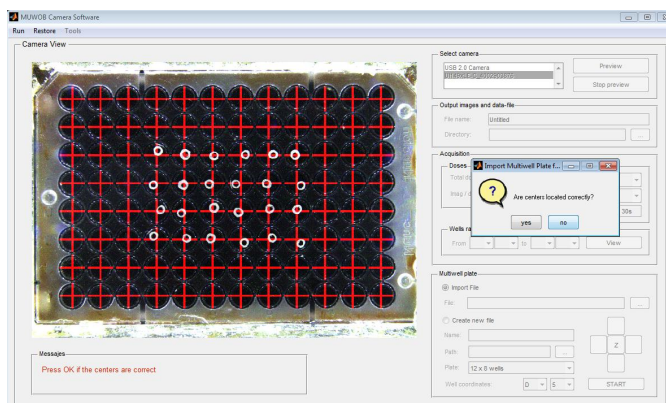


Figura 26 | Comprobación de la información contenida en un archivo de placa multipocillos.

Al confirmar el fichero, la aplicación activa las opciones de los paneles *Output images and data file*, *Acquisition* y *Wells range* (Fig. 27). Al mismo tiempo inhabilita la lista de videocámaras del panel *Select camera* para evitar, en adelante, seleccionar otra videocámara que no corresponda con la información del archivo.

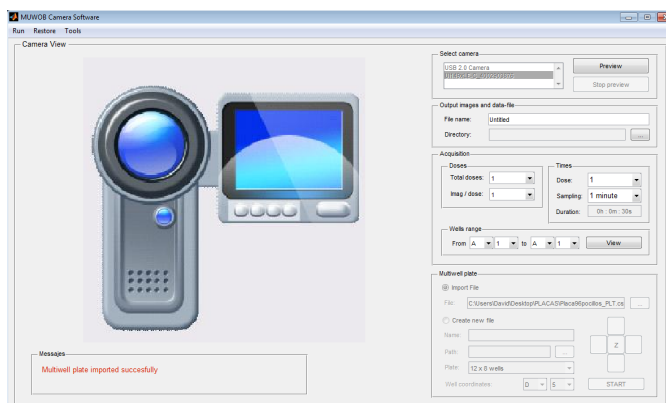


Figura 27 | Archivo de placa multipocillos importado correctamente.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59

**PASO 6: SELECCIONAR UN GRUPO DE POCILLOS**

A pesar de que el sistema *MuWOB* está pensado para analizar 96 muestras al mismo tiempo, no es necesario utilizar todos los pocillos siempre. En este sentido, *MuWOB Software* permite el análisis selectivo de un grupo de pocillos que especifique el investigador. En esta primera versión del programa no es posible seleccionar varios grupos o pocillos aislados. Además, la distribución de los pocillos seleccionados debe formar una matriz. Siga las instrucciones que se indican a continuación para seleccionar los pocillos que va a utilizar en su experimento.

- 1 En la opción *From* del panel *Wells range* indique las coordenadas del pocillo donde comienza la matriz que desea seleccionar. Luego, en la opción *To* seleccione las coordenadas del pocillo donde termina. En el ejemplo de la figura 28 se pretende seleccionar una matriz de 24 pocillos, empezando por el pocillo C4 y terminando en el F9.

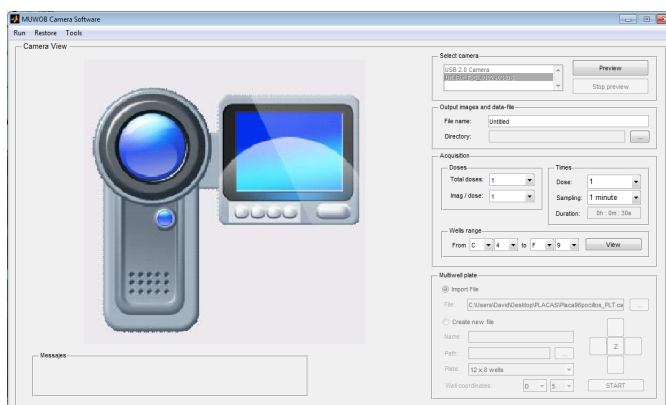


Figura 28 | Selección de un grupo de pocillos.

- 2 En el panel *Wells range* haga clic en el botón *View*. Automáticamente el programa toma una fotografía de la placa multipocillos y la muestra en el panel *Camera view*. Sobre esta imagen la aplicación dibuja una cruz roja sobre los pocillos que resultaron seleccionados (Fig. 29).
- 3 Compruebe si los pocillos que indica el *software* coinciden con los pocillos de su experimento. Luego haga clic sobre el botón *OK* del cuadro de diálogo *Select Wells*. Si los pocillos no coinciden, corrija las coordenadas y repita los pasos 2 y 3.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



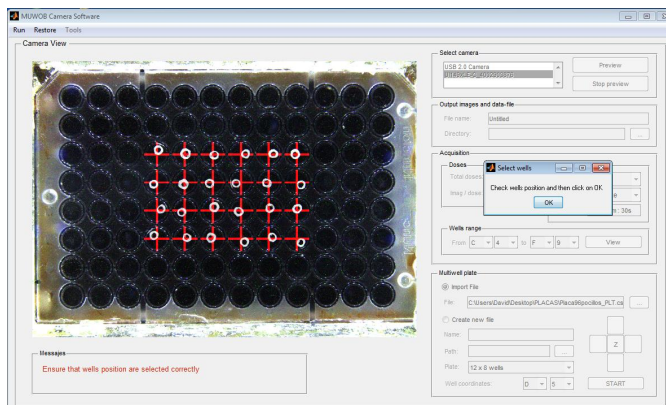


Figura 29 | Grupo de pocillos seleccionados.

**PASO 7: TEST DE RECONOCIMIENTO DE ANILLOS**

Antes de iniciar el registro del experimento es recomendable comprobar que el programa identifica cada uno de los anillos de tejido. Si lo desea, puede omitir este paso y e ir directamente al siguiente. No obstante, el test de reconocimiento resulta muy útil para detectar anillos mal colocados o comprobar si la iluminación es muy intensa o insuficiente. Para ejecutar el test de reconocimiento, siga las instrucciones que se indican a continuación.

- ➊ Para iniciar el test de reconocimiento dirjase a la barra de menú y seleccione *Tools* → *Recognition Test* → *Start* (Fig. 28).

Automáticamente el *software* toma una fotografía de la placa multipocillos y comienza a analizar, uno a uno, los pocillos seleccionados. Si identifica un anillo de tejido, marcará el pocillo con una cruz verde. Si no lo identifica, lo marcará con una cruz roja. En la vista ampliada (esquina inferior derecha del panel *Camera view*) se muestra el área interior de los anillos identificados (Fig. 29).

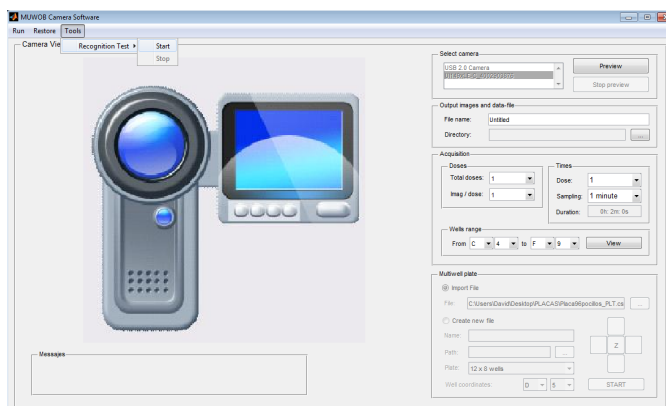


Figura 28 | Ejecutar test de reconocimiento de los anillos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59

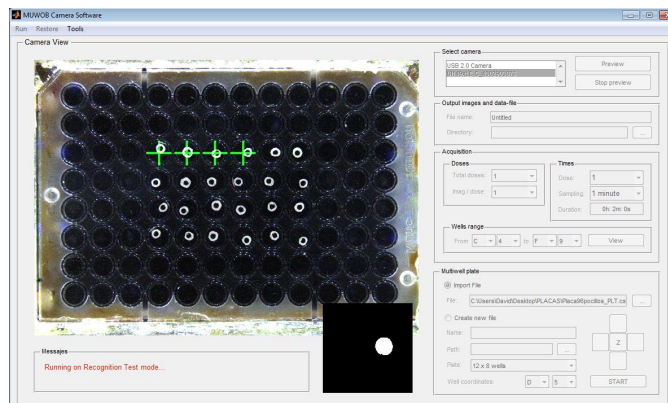


Figura 29 | Test de reconocimiento de los anillos de tejido en marcha.

- 2 Al terminar el test compruebe que todos los anillos se han identificado con éxito. Si es así haga clic en el botón *Yes* del cuadro de diálogo *Recognition test* (Fig. 30). En caso contrario, haga clic en el botón *No*.

Si uno o varios anillos no se identificaron compruebe si están colocados en la posición correcta. Revise también la intensidad del sistema de iluminación por si la luz fuera insuficiente. Luego repita el test.

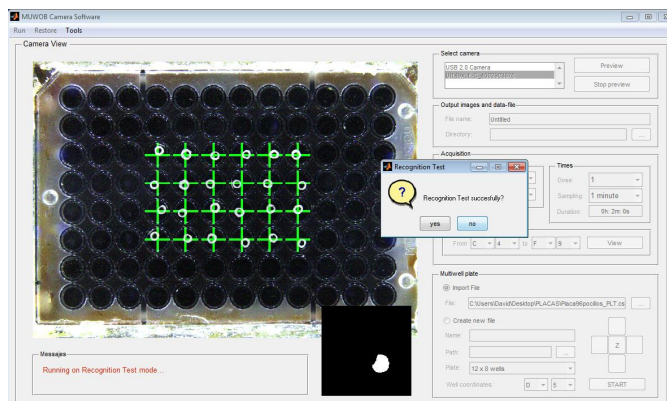


Figura 30 | Test de reconocimiento finalizado.

**PASO 8: CONFIGURAR LA ADQUISICIÓN DE FOTOGRAFÍAS**

Para registrar la medida de los anillos, el programa debe conocer cuántas dosis se van a administrar, cuántas imágenes debe tomar tras la inyección de una dosis y cuánto tiempo debe

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>		
Identificador del documento: 969032		Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59

esperar entre la captura de una fotografía y la siguiente. Para configurar todos estos parámetros, siga los pasos que se indican a continuación.

- ❶ En la opción *Total doses* del panel *Acquisition*, indique el número de dosis de fármaco que va a inyectar en su experimento. Esta versión del programa permite registrar un máximo de 10 dosis.
- ❷ Luego, en el campo *imag/dose* indique el número de imágenes que debe tomar el *software* tras la inyección de una dosis. Esta versión del programa permite capturar hasta 20 imágenes en cada dosis.

En el ejemplo de la figura 31 se ha configurado un total de 3 dosis y tras cada inyección, el programa tomará 5 fotografías. Por tanto, la respuesta de los anillos quedará registrada en un total de 15 fotografías.

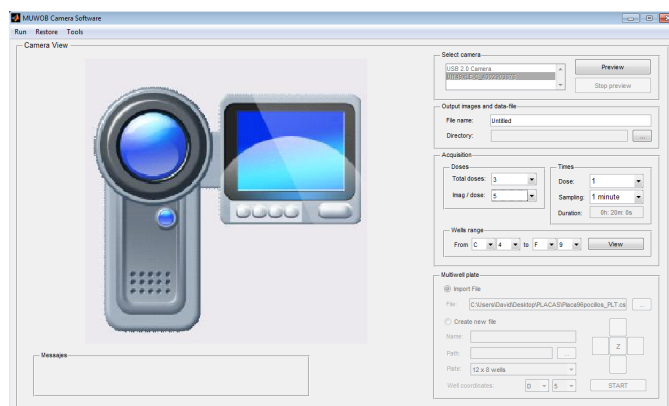


Figura 31 | Configuración del número de dosis, el número de imágenes por dosis y el tiempo de muestreo para la primera dosis.

Para cada dosis, el *software* permite configurar diferentes tiempos de muestreo (tiempo de espera entre una fotografía y la siguiente). Así, el programa podría configurarse para que tras la primera inyección tome imágenes cada minuto; tras la segunda, las tome cada 2 minutos; y tras la tercera, cada minuto nuevamente, por ejemplo. Esto resulta muy útil cuando el investigador conoce de antemano si una dosis concreta provocará una respuesta de los anillos rápida o lenta.

- ❸ En el panel *Times* despliegue la lista *Doses* y seleccione una dosis. Luego, en el campo *Sampling* especifique el tiempo de muestreo. Esta versión del programa permite un tiempo mínimo de 1 minuto entre la captura de una fotografía y la siguiente y un máximo de 30 minutos.
- ❹ Repita el paso 3 para todas las dosis de la lista *Dose*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

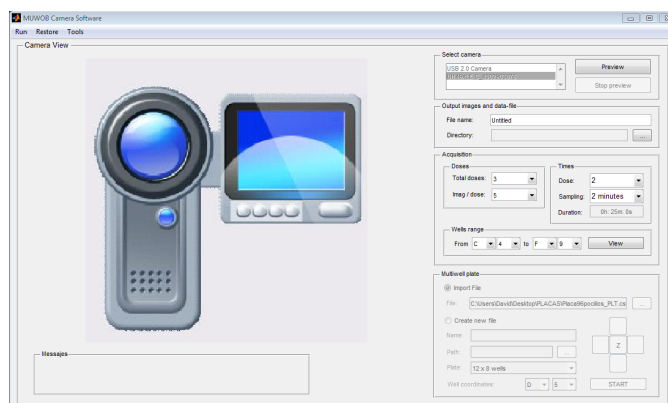


Figura 32 | Configuración del tiempo de muestreo para una segunda dosis.

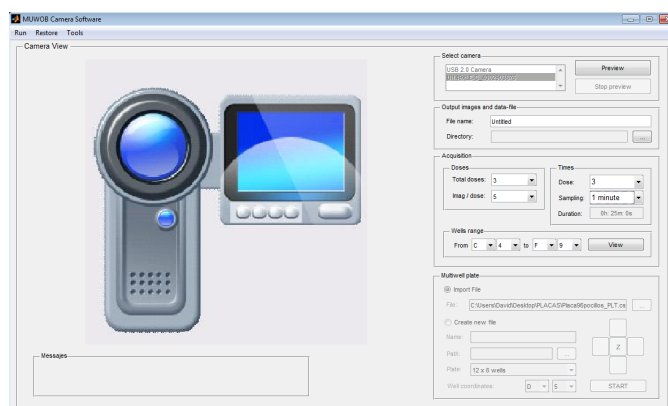


Figura 33 | Configuración del tiempo de muestreo para una tercera dosis.

El campo *Duration* muestra una estimación del tiempo que durará el experimento. Este tiempo se calcula teniendo en cuenta la cantidad de dosis, el número de imágenes por dosis y los tiempos de muestreo configurados.

#### PASO 9: CONFIGURAR EL ARCHIVO DE RESULTADOS

- ❶ En el campo *File name* del panel *Output images and data-file* indique un nombre para el archivo donde se almacenarán las medidas de los anillos. Los archivos generados por el programa tienen la extensión *\_DAT.xls*. En el ejemplo de la figura 34 se ha configurado el nombre *Fenilefrina*, por lo que el nombre del archivo será *Fenilefrina\_DAT.xls*.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

- 2 En el campo *Directory* indique el directorio donde se desea guardar el archivo con las medidas de los anillos. En este directorio también se almacenan las todas las fotografías que captura el *software*. En el ejemplo de la figura 34 se ha especificado el directorio *EXPERIMENTOS*.

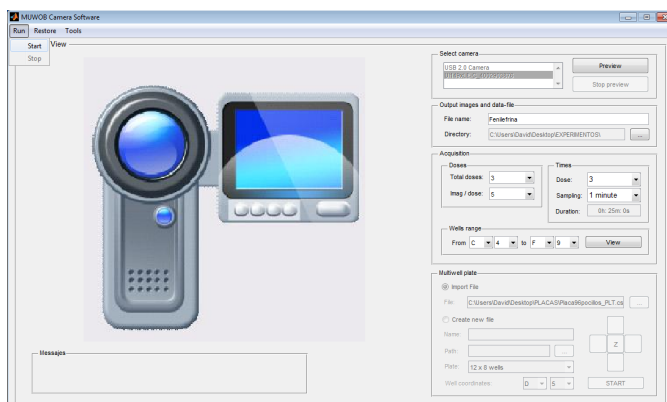


Figura 34 | Configuración del archivo y el directorio donde se almacenan los datos del experimento.

PASO 10: COMENZAR EL EXPERIMENTO.

- 1 Dirijase a la barra de menú y haga clic en *Run* → *Start* (Fig. 35).

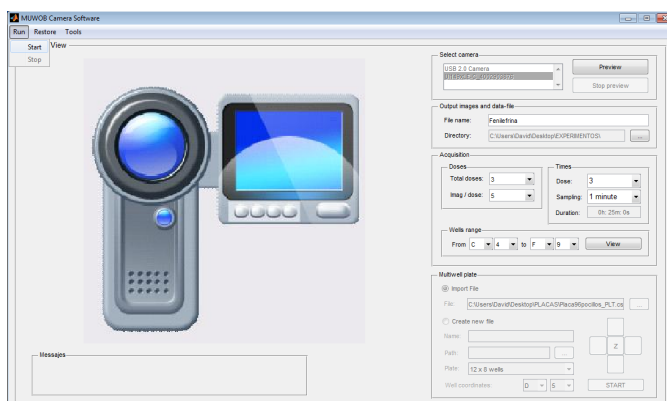


Figura 35 | Comenzar el registro de los anillos de tejido.

Tras unos segundos, el programa muestra la vista de la videocámara en el panel *Camera View* (Fig. 36).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

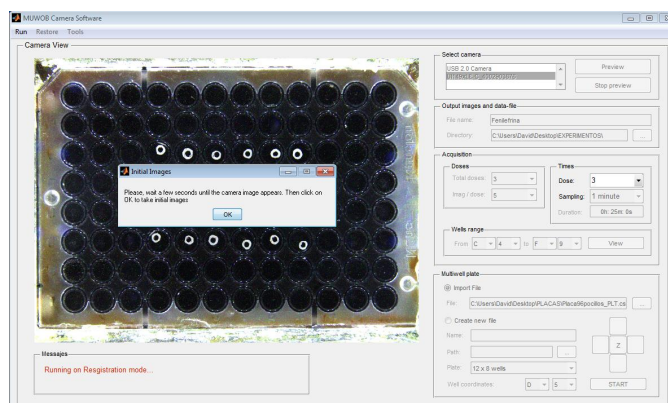


Figura 36 | Inicialización de la videocámara.

- 2 Para continuar, haga clic en el botón *OK* del cuadro de diálogo *Initial Images*.

En este instante, el *software* inicia automáticamente un primer registro de la medida de los anillos (Fig. 37). Como los tejidos no están bajo los efectos de ningún fármaco, estas primeras medidas servirán de referencia para comparar con los resultados del experimento. En este registro, el programa captura el mismo número de fotografías que con el resto de dosis y el tiempo de muestreo es el mismo que el configurado para la dosis 1.

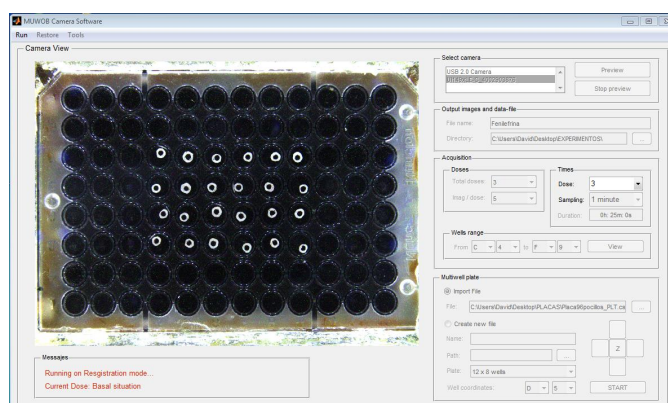


Figura 37 | Registro de los anillos en reposo. Esperando para la captura de una nueva fotografía.

Tras capturar una nueva fotografía, el programa inmediatamente procesa la imagen, calcula la medida de los anillos, almacena los resultados en el archivo de datos y guarda la fotografía (Fig. 38).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

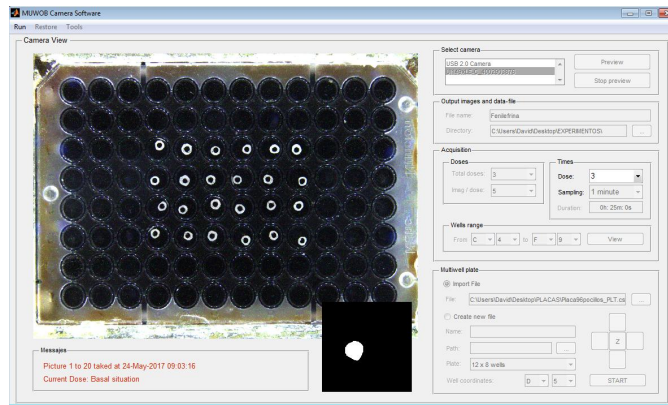


Figura 38 | Registro de los anillos en reposo. Procesando una fotografía.

Al terminar de medir los anillos en reposo, el programa detiene momentáneamente el registro y comunica que debe inyectarse la primera dosis de fármaco para continuar (Fig. 39).

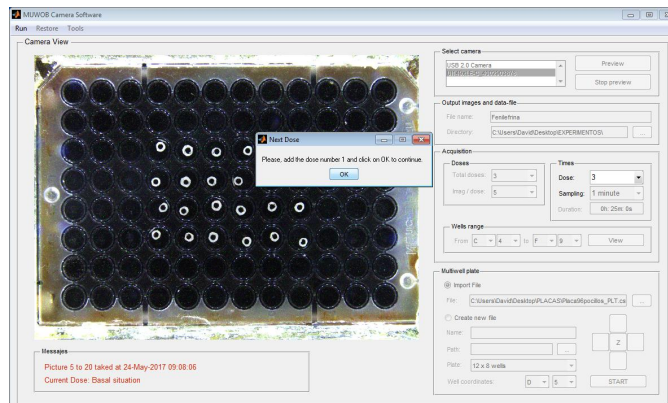


Figura 39 | Aviso para inyectar la primera dosis.

- ➊ Inyecte la dosis correspondiente. Luego haga clic sobre el botón *OK* del cuadro de diálogo *Next Dose* para reanudar el registro (Fig. 40).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

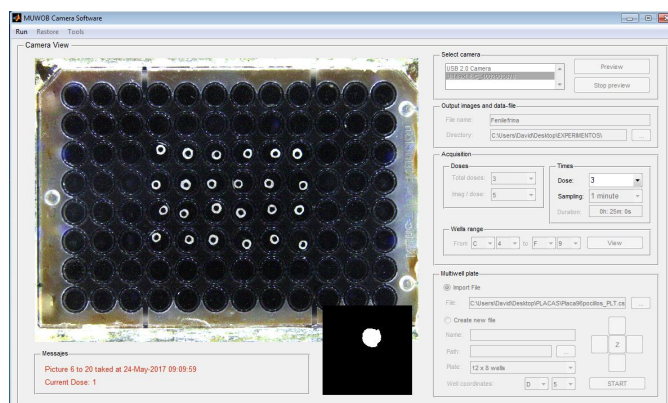


Figura 40 | Registro de los anillos tras la primera dosis. Procesando una fotografía.

Al terminar de medir los anillos tras la primera dosis, el programa detiene nuevamente el registro y comunica que debe inyectarse la siguiente dosis para continuar (Fig. 41).

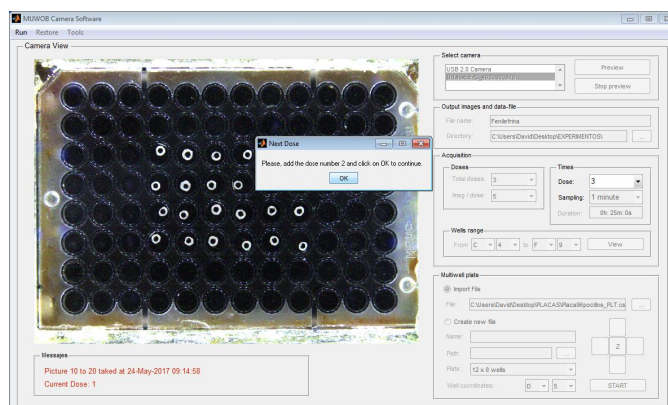


Figura 41 | Aviso para inyectar una segunda dosis.

Este ciclo se repetirá una y otra vez hasta completar el experimento. Tras la última dosis, el programa detiene automáticamente el registro. Si por cualquier motivo necesita detener el registro, diríjase a la barra de menús y haga clic en *Run* → *Stop*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



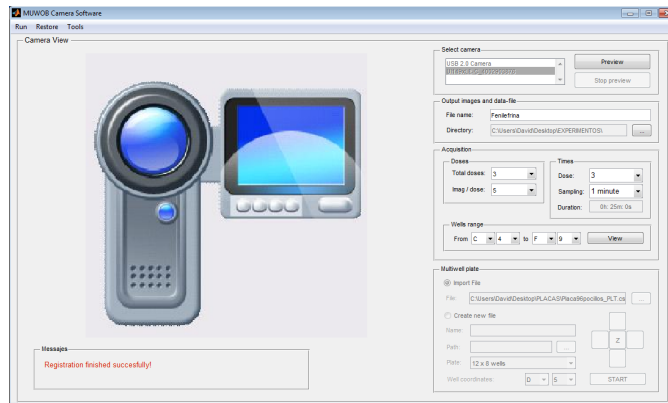


Figura 42 | Finalización del registro de los anillos.

**PASO 11: CONTENIDO DEL ARCHIVO DE RESULTADOS.**

- 1 Para ver los archivos que generó el programa durante su experimento, diríjase al directorio que especificó en el Paso 8 (Fig. 43).

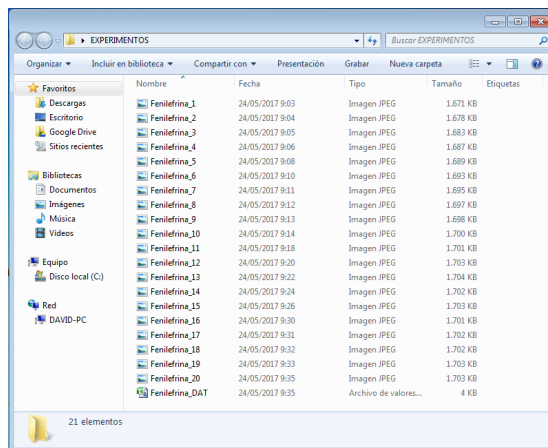


Figura 43 | Directorio de resultados.

Como puede observar, *MuWOB Software* ha guardado todas las imágenes que capturó durante el experimento. Las fotografías se almacenan con formato *.jpeg* y se les ha asignado el mismo nombre que al archivo de datos. Además, para conocer la secuencia en que fueron tomadas, el programa añade en el nombre una numeración. La fotografía número 1 fue la primera en capturarse.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

- Abra el archivo de resultados (extensión *\_.DAT.xls*). Para ello puede utilizar un programa de hojas de cálculo como *Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE.UU.)*.

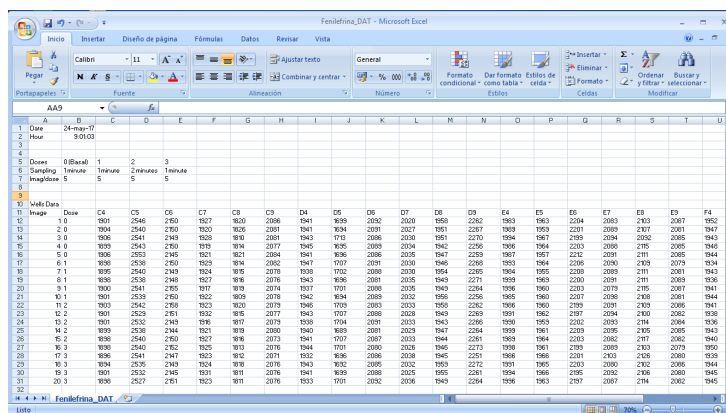


Figura 44 | Contenido del archivo de resultados.

El contenido del archivo se ha organizado en dos partes. Una cabecera con los parámetros del experimento y una tabla con las medidas de los anillos. La cabecera contiene la fecha y la hora a la que comenzó el experimento. También especifica el tiempo de muestreo y el número de fotografías que se tomaron en cada dosis.

Por otro lado la tabla contiene la medida (en píxeles) del área interior de todos los anillos que calculó el programa en cada fotografía. A partir de los datos de esta tabla, los investigadores pueden trazar una curva concentración-respuesta para evaluar el efecto contráctil de los fármacos. Un buen ejemplo es el experimento publicado en el artículo Díaz-Martín, D. et al., 2015, el cual puede consultarse en el apéndice VII.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Apéndice II

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## Guía de Usuario CANStim-8

### PASO 1: PONER EN MARCHA EL ESTIMULADOR:

- ❶ Encienda el electroestimulador llevando el interruptor de alimentación (ubicado en el panel trasero del equipo) a su posición *ON*. Inmediatamente aparecerá en la pantalla la *Ventana de Bienvenida* que muestra la figura 1.



Figura 1 | Ventana de bienvenida del estimulador CANStim-8

- ❷ Tras completarse la barra de estado, presione sobre cualquier zona de la pantalla para continuar (Fig. 2).



Figura 2 | Ventana de Bienvenida en espera.

Aparecerá la *Ventana Principal* de la aplicación (Fig. 3). En este instante, se inicializan todas las variables que utiliza la aplicación y se ponen en marcha los módulos de comunicación UART y SPI.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

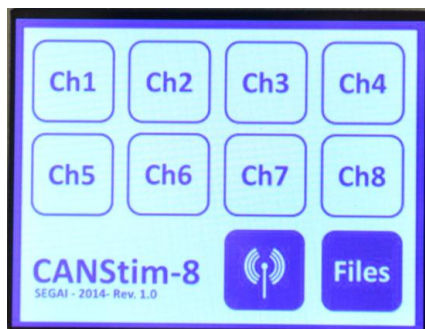


Figura 3 | Ventana de principal del estimulador CANStim-8.

Como se puede ver, la *Ventana Principal* de la aplicación ofrece diez opciones. Al presionar sobre uno de los ocho primeros botones, etiquetados de *Ch1* hasta *Ch8*, se accede al menú de configuración del canal correspondiente. Por otro lado, en la esquina inferior derecha se encuentra el botón *Files*. Si se presiona sobre este botón, la aplicación inicia un asistente para configurar los archivos que almacenan los parámetros que definen las señales de estímulo. Por último, a la izquierda del botón *Files* se encuentra el botón *Wireless*. La función de este botón no está desarrollada en esta primera versión de la aplicación, pero servirá en el futuro para implementar una nueva herramienta que permita comunicar el equipo inalámbricamente con un dispositivo remoto y desde el cual el usuario pueda configurar y controlar el electroestimulador a distancia. Por lo tanto, este botón está inhabilitado.

## PASO 2: CONFIGURAR UNA SEÑAL DE ESTIMULACIÓN.

- 1 Inicie el asistente de configuración de archivos. Para ello presione el botón *Files*. Inmediatamente aparece la *Ventana Select File* (Fig. 4), que dispone de dos campos configurables: *System Files* y *File Name*.

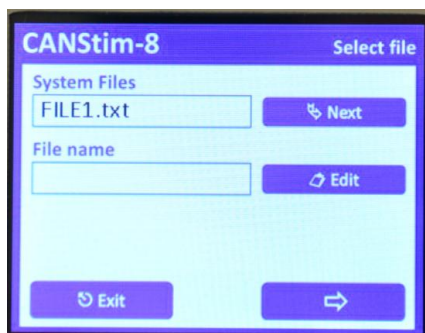


Figura 4 | Ventana Select File

El campo *System Files* muestra los archivos disponibles en el equipo para almacenar la configuración de distintas señales de estímulo. Estos archivos están predefinidos en la tarjeta de memoria MicroSD y se han implementado un total de diez. Por tanto, el equipo permite almacenar hasta diez señales de estímulo diferentes. Cada uno de estos archivos se identifica por la etiqueta FILE0.txt, FILE1.txt y así hasta FILE9.tx. Es importante resaltar que estas etiquetas se utilizan para la gestión interna de los archivos y no son editables por el usuario. Por otro lado, el campo *File Name* permite asignar un nombre personalizado al archivo.

- ② Seleccione el archivo donde se almacenará la configuración de la señal de estimulación. Para ello, presione el botón *Next* las veces necesarias hasta que en el campo *System File* aparezca la etiqueta del archivo que desee. Por ejemplo *FILE1.txt*
- ③ Asigne un nombre personalizado al archivo presionando sobre el botón *Edit*. Inmediatamente aparecerá una nueva ventana con un teclado alfanumérico como el que muestra la figura 5.

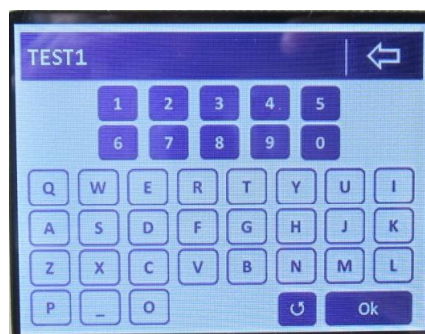


Figura 5 | Teclado alfanumérico.

Teclee el nombre que desee; por ejemplo *TEST1*. Luego presione sobre el botón *OK*. Aparecerá nuevamente la ventana *Select File* con el nombre que ha escrito dentro del campo *File Name* (Fig. 6).

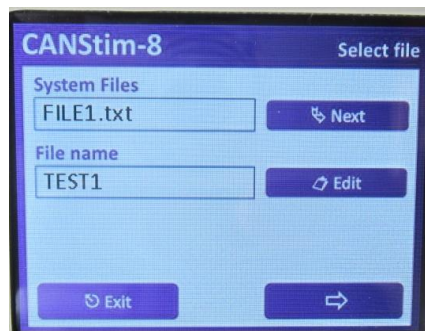


Figura 6 | Edición del nombre de archivo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

- 4 Para continuar, presione el botón de la flecha que señala a la derecha (esquina inferior derecha de la pantalla). Aparecerá la Ventana *Parameters* que se muestra en la figura 7. En cualquier momento, es posible cancelar la configuración de la señal y volver directamente a la *Ventana Principal* con solo presionar sobre el botón *Exit*.



Figura 7 | Ventana *Parameters*.

En esta otra ventana se configuran los parámetros que definen la forma de onda de la señal de estímulo. En este caso, los campos configurables son: *Function Mode*, *Parameters* y *Value*. Con el campo *Function Mode* se escoge el tipo de señal con el que se desea estimular la preparación biológica, pudiendo elegir entre *Pulses* (señal de pulsos) o *Train pulses* (señal de trenes de pulsos). Por otro lado, el campo *Parameters* muestra los distintos parámetros a configurar según el tipo de señal que se haya seleccionado. Finalmente, el campo *Value* contiene el valor asignado a esos parámetros. La tabla 1 muestra qué parámetros se pueden configurar según el tipo de señal y cuál es el rango de valores que puede tomar cada uno.

- 5 En el campo *Function Mode*, presione el botón *Next* las veces necesarias hasta que aparezca la opción *Pulses* o *Train of pulses*, según se quiera estimular con un tipo de señal u otra.
- 6 En el campo *Parameters*, presione sobre el botón *Next* las veces necesarias hasta que aparezca el parámetro que desea configurar, por ejemplo *Voltage*. Cada pulsación en el botón muestra un parámetro nuevo.
- 7 En el campo *Value*, asigne un valor al parámetro seleccionado presionando directamente sobre el botón *Edit*. Aparecerá un teclado numérico como el que muestra la figura 8.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

**Modo Pulses**

Parámetro	Rango	Valores	Paso
Voltage	Milivoltios	1 a 60000	1mV
	Voltios	1 a 60	1V
Current Limit	Miliamperios	10 a 2000	10mA
	Amperios	1 a 2	1A
Delay	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min
Time ON	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min
Time OFF	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min
Num. of pulses	Pulses	1 a 999999	Pulses

**Modo Train Pulses**

Parámetro	Rango	Valores	Paso
Voltage	Milivoltios	1 a 60000	1mV
	Voltios	1 a 60	1V
Current Limit	Miliamperios	10 a 2000	10mA
	Amperios	1 a 2	A
Delay	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min
Time ON	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min
Time OFF	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min
Num. of pulses	Pulses	1 a 999999	Pulses
Num. Of trains	Trains	1 a 999999	Trains
Train distance	Milisegundos	1 a 600000	1ms
	Segundos	1 a 600	1s
	Minutos	1 a 10	1min

Tabla 1 | Parámetros y valores configurables desde la interfaz gráfica del CANStim8.

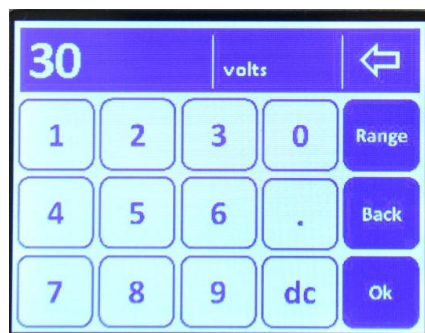


Figura 8 | Teclado numérico.

- 3 Ajuste el rango de la unidad de medida presionando sobre el botón *Range* tantas veces como sea necesario hasta que aparezca el rango deseado. Por ejemplo, *volts* (voltios). A continuación, teclee el valor que desee asignar al parámetro (30 en el ejemplo) y presione el botón *OK* para confirmar. Si por error se introduce un valor incorrecto, el equipo mostrará un cuadro de diálogo como el que muestra la figura 9 para notificar el error al usuario.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



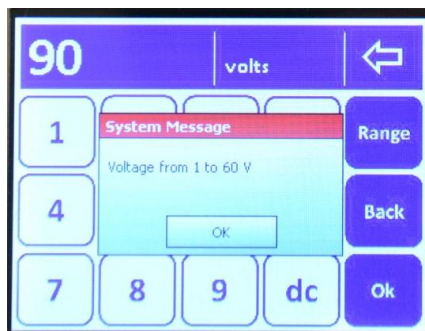


Figura 9 | Cuadro de diálogo. Error en teclado numérico.

Inmediatamente la aplicación vuelve a la ventana *Parameters*. Como podrá comprobar, en el campo *Value* aparece ahora el valor introducido junto con la unidad de medida seleccionada (Fig. 10).

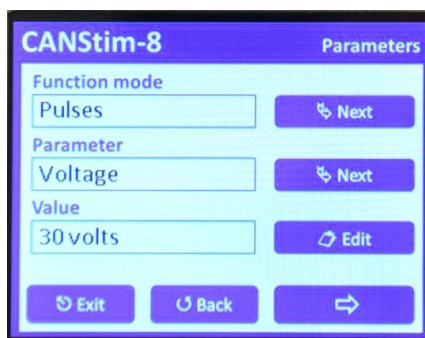


Figura 10 | Configuración del parámetro *Voltage*.

- Repita los pasos 6, 7 y 8 hasta haber configurado todos los parámetros de la señal. Una vez haya finalizado, presione sobre el botón con la flecha que señala a la derecha (esquina inferior derecha) para continuar. Inmediatamente aparecerá la ventana *Revision* (Fig. 11), la cual muestra un resumen de los datos que se han configurado.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

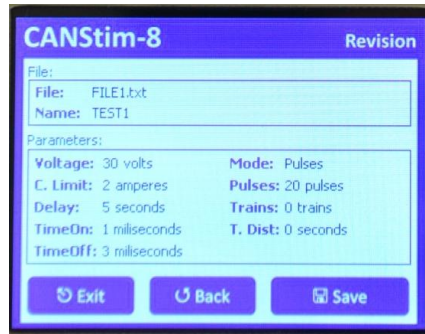


Figura 11 | Ventana *Revision*.

- ⑩ Presione sobre el botón *Save* para guardar los datos en la memoria MicroSD. Si todo es correcto, el equipo muestra un cuadro de diálogo indicando que el archivo se ha almacenado correctamente (Fig. 12). Para terminar, presione sobre el botón *OK* en el cuadro de diálogo y luego pulse en *Exit* para volver a la *Ventana Principal*.



Figura 12 | Cuadro de diálogo. Ventana *Revision*.

### PASO 3: CONFIGURAR UN CANAL.

- ① Acceda al menú de configuración de un canal. Para ello, presione sobre el botón *Ch1, Ch2,...Ch8* según corresponda. Por ejemplo, al presionar sobre *Ch1* aparecerá la ventana *Channel 1* (Fig. 13). Desde esta ventana se seleccionan los archivos con las señales que debe reproducir el canal.

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Figura 13 | Ventana de configuración para el canal 1.

En el campo *File Name* se muestran los distintos archivos almacenados en la memoria del equipo. Pulsando en *Next*, se pasa de un archivo al siguiente, mostrando el nombre personalizado que se le asignó al archivo cuando se configuró la señal. En el caso del ejemplo de la figura 13 se muestra el archivo TEST1. Si por el contrario el archivo está vacío, aparece *FILE.txt no exist!*, tal y como se puede ver en la figura 14. Por otro lado, el campo *Channel Files* contiene la lista de archivos que va a reproducir el canal.



Figura 14 | Ventana de configuración para el canal 1. Archivo vacío.

- ➊ Presione el botón *Next* tantas veces como sea necesario hasta que aparezca el nombre del archivo que desea que el canal reproduzca.
- ➋ A continuación, presione el botón *Add* para añadirlo a lista de archivos. Podrá comprobar que el nombre del archivo aparece ahora en el campo *Channel Files* (Fig. 15).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Figura 15 | Ventana de configuración para el canal 1. Añadir un archivo.

Cada canal puede recibir una lista de hasta cuatro archivos, pudiendo ser todos diferentes o incluso repetidos. Cuando el canal recibe más de un archivo, reproduce las diferentes señales concatenándolas una detrás de otra en el orden en el que los respectivos archivos fueron añadidos a la lista. De esta manera se consiguen crear señales de estimulación mucho más complejas. Para añadir más archivos, simplemente repita los pasos 2 y 3.



Figura 16 | Ventana de configuración para el canal 1. Añadir varios archivos.

En el ejemplo de la figura 16, el canal reproduciría primero la señal almacenada en TEST1 y a continuación, la señal de TEST2.

- ④ Descargue los archivos en el canal presionando sobre el botón *Download*. Aparecerá un cuadro de diálogo con una barra que indica el estado del proceso de descarga (Fig. 17). Espere a que finalice.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Figura 17 | Ventana de configuración para el canal 1. Descargando archivos.

En este momento, el canal configurado puede considerarse un electro-estimulador por sí solo, ya que es totalmente independiente del funcionamiento de los otros canales. Por tanto, en cualquier momento, si detecta un pulso TTL por su entrada de sincronismo TRIGGER\_EXT o si el usuario presiona el botón *ON/OFF* situado en su panel frontal, comenzará a reproducir las señales. Incluso aunque el usuario se encuentre configurando otro canal. Esta es una de las grandes ventajas del estimulador CANStim8.

Mientras dure la estimulación, el led verde situado en el centro del pulsador *ON/OFF* se mantendrá encendido. En este estado, si fuera necesario detener la estimulación basta con pulsar el botón *ON/OFF*.

- 5 Para finalizar, presione sobre el botón *Exit* para volver a la *Ventana Principal*.

#### PASO 4: CONTROLAR LA AMPLITUD EN TIEMPO REAL. *Play mode*.

Una vez iniciada la estimulación en un canal, el estimulador ofrece una herramienta para aumentar o disminuir la amplitud de los pulsos que esta reproduciendo sobre la marcha. Esto puede resultar útil para ajustar la potencia eléctrica instantáneamente.

- 1 Acceda al menú de configuración de un canal. Para ello, presione sobre el botón *Ch1, Ch2,...Ch8* según corresponda. Por ejemplo, al presionar sobre *Ch1* aparecerá la ventana *Channel 1*.
- 2 Presione el botón *Play*. Inmediatamente aparecerá una ventana emergente como la que muestra la figura 18.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



Figura 18 | Ventana *Channel Play Mode*.

- ➊ Presione el botón *Inc* o *Dec* para aumentar o disminuir la amplitud de los pulsos en pasos de 0.5V.
- ➋ Tras ajustar la amplitud de los pulsos, presione sobre el botón *Back* para abandonar la ventana *Channel Play Mode*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Apéndice III

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## Presupuesto material del proyecto MuWOB

En este documento se recoge el coste material que supuso la construcción del prototipo MuWOB. El precio de los materiales puede variar dependiendo del distribuidor o incluso de la fecha de la compra. Por tanto, los cálculos que aquí se presentan son una aproximación del coste total del prototipo.

Componente	Proveedor	Ud.	Precio (€)
Videocámara digital serie USB uEYE LE, modelo 1490LE-HQ	Infaimon	1	635,00
Objetivo telecéntrico serie TC-Bi-telecentric lenses, modelo TC12120	Infaimon	1	2956,00
Leds de alta intensidad, 12V, luz fría y montaje adhesivo	Coelca	14	28,50
Transformador 100-240V <sub>AC</sub> , 50/60Hz a 12V <sub>DC</sub> -2000mA	Nalber TV	1	15,75
Plataforma de observación	--	1	30,05
COSTE MATERIAL TOTAL DEL PROTOTIPO MuWOB			<b>3665,30 €</b>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



# Apéndice IV

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## Presupuesto material del proyecto CANStim-8

En este documento se recoge el coste material que supuso la construcción del prototipo CANStim-8. El precio de los materiales puede variar dependiendo del distribuidor o incluso de la fecha de la compra. Por tanto, los cálculos que aquí se presentan son una aproximación del coste total del prototipo.

Componente	Proveedor	Ud.	Precio (€)
Resistor 470Ω, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	8	0,72
Resistor 4.7KΩ, 1%, 1/8W, SMD	RS	24	2,24
Resistor 100Ω, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	16	1,52
Resistor 10KΩ, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	48	4,48
Resistor 1MΩ, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	8	0,72
Resistor 1KΩ, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	16	1,52
Resistor 118KΩ, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	8	0,72
Resistor 100KΩ, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	8	0,72
Resistor 300Ω, 1%, 1/8W, SMD 0805	RS	24	2,24
Resistor 240Ω, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 6.8KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 27KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 7KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 200Ω, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 1.2KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	16	1,52
Resistor 50KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	16	1,52
Resistor 500KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	16	1,52
Resistor 500Ω, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 510KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 12KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 10KΩ, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 10Ω, 1%, 1/4W, THD axial	RS	8	0,72
Resistor 0.1Ω, 1%, 5W, THD axial	RS	16	35,52
Condensador cerámico 22pF, 50V, SMD 0805	RS	16	1,52
Condensador cerámico 10μF, 25V, SMD 0805	RS	40	15,20
Condensador cerámico 1μF, 25V, SMD 0805	RS	16	1,52
Condensador cerámico 100nF, 50V, SMD 0805	RS	176	16,56
Condensador cerámico 10nF, 50V, SMD 0805	RS	16	1,52
Condensador cerámico 20pF, 50V, SMD 0805	RS	16	1,52
Condensador cerámico 47pF, 25V, SMD 0805	RS	8	0,72
Condensador de mica 22pF, 500V, THD radial	RS	24	39,36
Condensador de poliéster, 100nF, 250V, radial, THD	RS	72	69,84
Condensador electrolítico de aluminio, 100μF, 200V, THD axial	RS	16	60,00

2

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

**Apéndice IV. Presupuesto material del proyecto CANStim-8**

Condensador electrolítico de aluminio, 220µF, 200V, THD axial	RS	8	25,52
Condensador electrolítico de aluminio, 470µF, 25V, THD radial	RS	16	7,36
Condensador electrolítico de aluminio, 100µF, 25V, THD radial	RS	16	4,80
Amplificador operacional OPA277U	RS	40	221,60
Amplificador de audio LME49830TB	RS	8	153,84
Amplificador de instrumentación INA111AP, THD	RS	8	79,20
Amplificador operacional LM358, SMD	RS	8	2,88
Transistor MOSFET IRFP240PBF	RS	8	15,68
Transistor MOSFET IRF9640PBF	RS	8	11,60
Transistor BJT BC547BG	RS	16	2,88
Transistor MOSTET IRF530PBF, THD	RS	16	14,40
Diodo 1N4148, SMD	RS	16	2,24
Led rojo, 3mm, THD	RS	8	1,04
Referencia de tensión REF01, SMD	RS	8	18,53
Regulador MC33269D-3.3G	RS	8	6,32
Interruptor SPST analógico ADG451BRZ	RS	8	28,24
Convertor digital/analógico DAC8811	RS	16	152,32
Microcontrolador PIC24HJ32GP302, SMD	RS	8	34,40
Oscilador FOX FQ7050B-8.000 (0.86)	RS	8	6,88
Relé V23105A5475A201	RS	16	28,16
Porta-LEDs de montaje en panel, 3mm.	RS	8	2,40
Porta-fusible de montaje en PCB, 5 x 20 mm, THD	RS	8	12,56
Pulsador miniature SPST, 50mA, 24V, SMD (0.43)	RS	8	3,44
Pulsador de acción momentánea, montaje en panel, iluminado, IP67	Mouser	8	54,16
Pulsador de acción momentánea, montaje en panel, IP67	Mouser	8	42,80
Conector hembra DIN41612 tipo B, serie Eurocard, 32 pines recto.	Mouser	9	34,11
Conector macho DIN41612 tipo B, serie Eurocard, 32 pines en ángulo.	Mouser	9	50,31
Conector BNC hembra, recto, de montaje en panel	RS	8	21,68
Conector DB25, hembra, recto, de montaje en panel	RS	1	1,69
Tira de 20 pines (1.08)	Mouser	8	8,72
Kit Mikromedia Board for PIC32	Mikroe	1	90,00
Fuente de alimentación conmutada VLT40-3200	RS	1	55,00
Fuente de alimentación conmutada SWS1000L-60	RS	1	565,00
Bastidor de montaje en rack propacPro 155x470x326mm	RS	1	147,72
Fabricación PCB Eurocard 3U x 32HP	LabCircuit	8	280,80
Fabricación PCB de panel de conexiones	SEGAI	1	60,10
Fabricación PCB Eurocard 3U x 32HP	SEGAI	1	30,50

COSTE MATERIAL TOTAL DEL PROTOTIPO CANStim8

**2544,00 €**

**3**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/06/2017 14:20:25

RICARDO BORGES JURADO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 14:34:34

MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 16:48:37

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:35:59

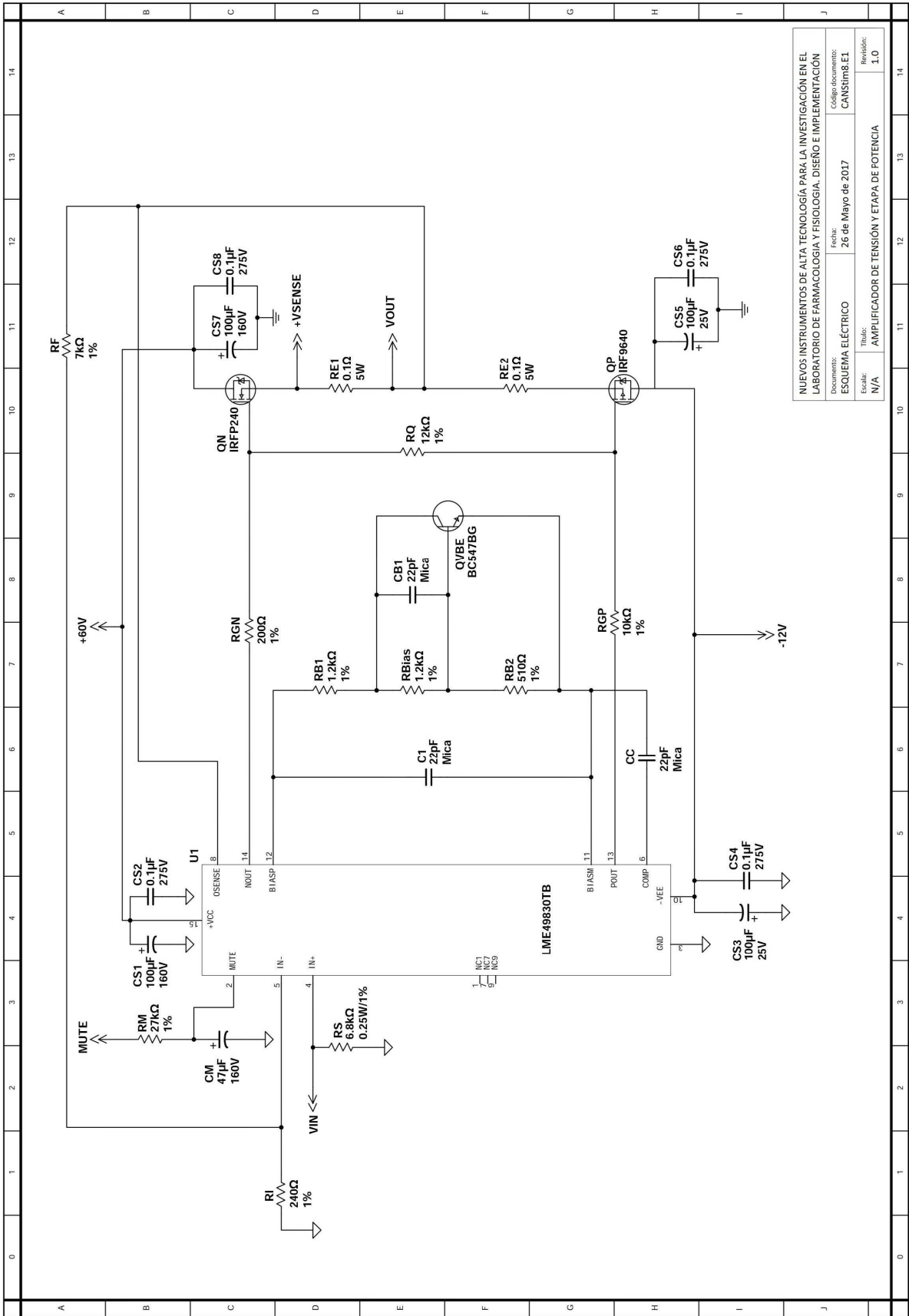
# Apéndice V

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



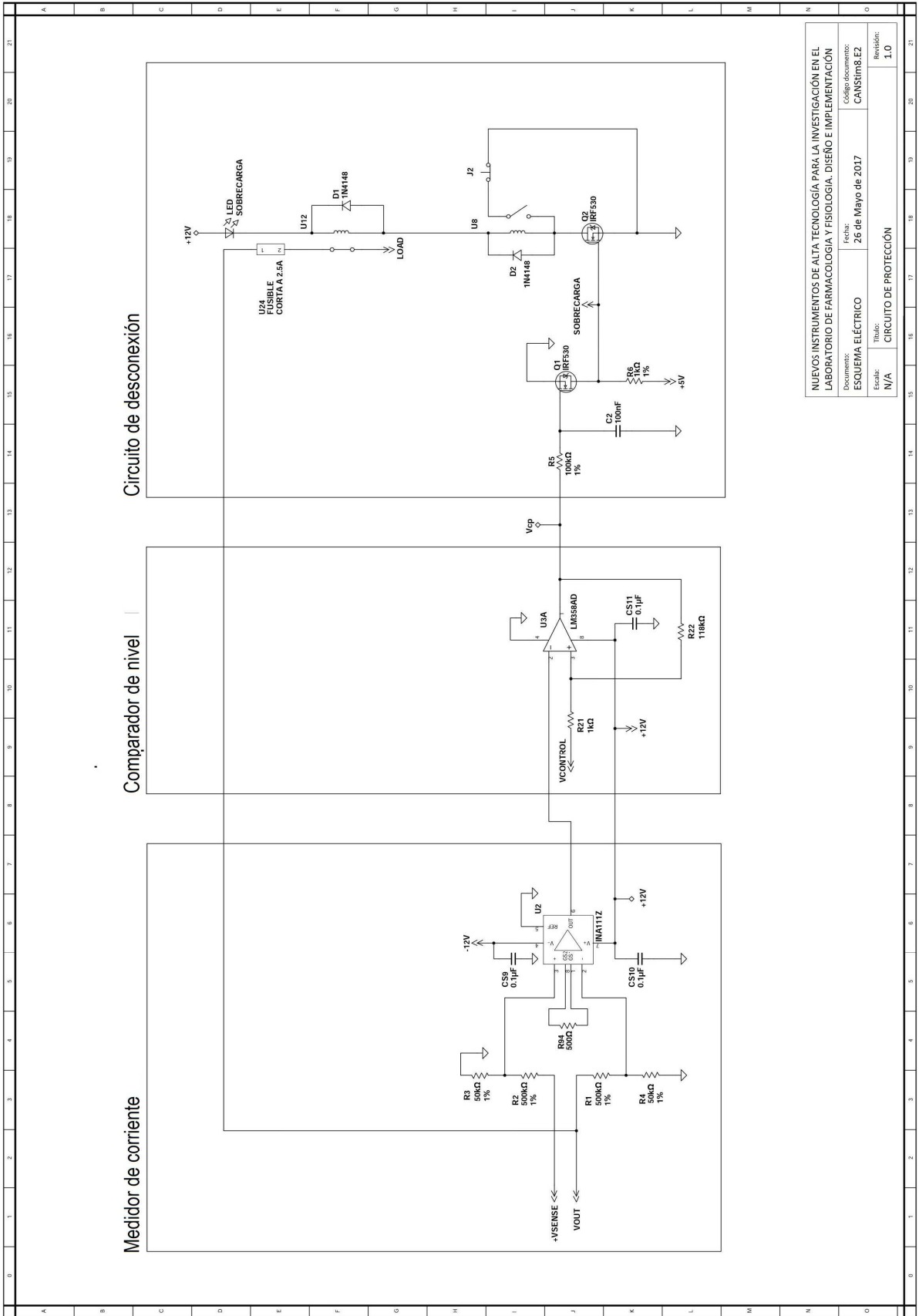
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CANStim8.E1
Escuela:	N/A
Título:	AMPLIFICADOR DE TENSIÓN Y ETAPA DE POTENCIA
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



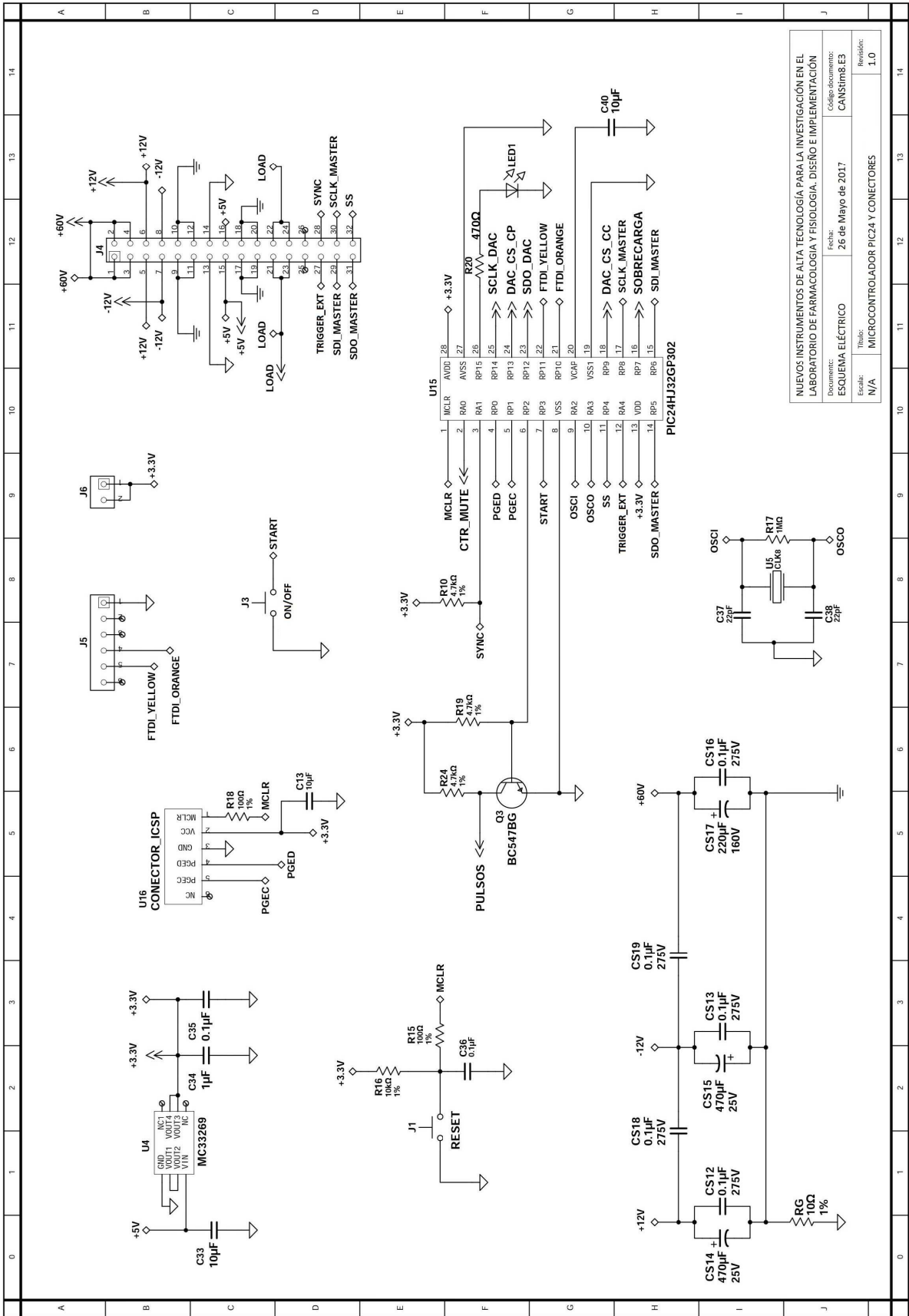
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN			
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO	Fecha:	26 de Mayo de 2017
Escala:	N/A	Título:	CIRCUITO DE PROTECCIÓN
		Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CAN5tim8.E3
Escalas:	N/A
Título:	MICROCONTROLADOR PIC24 Y CONECTORES
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/06/2017 14:20:25

RICARDO BORGES JURADO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

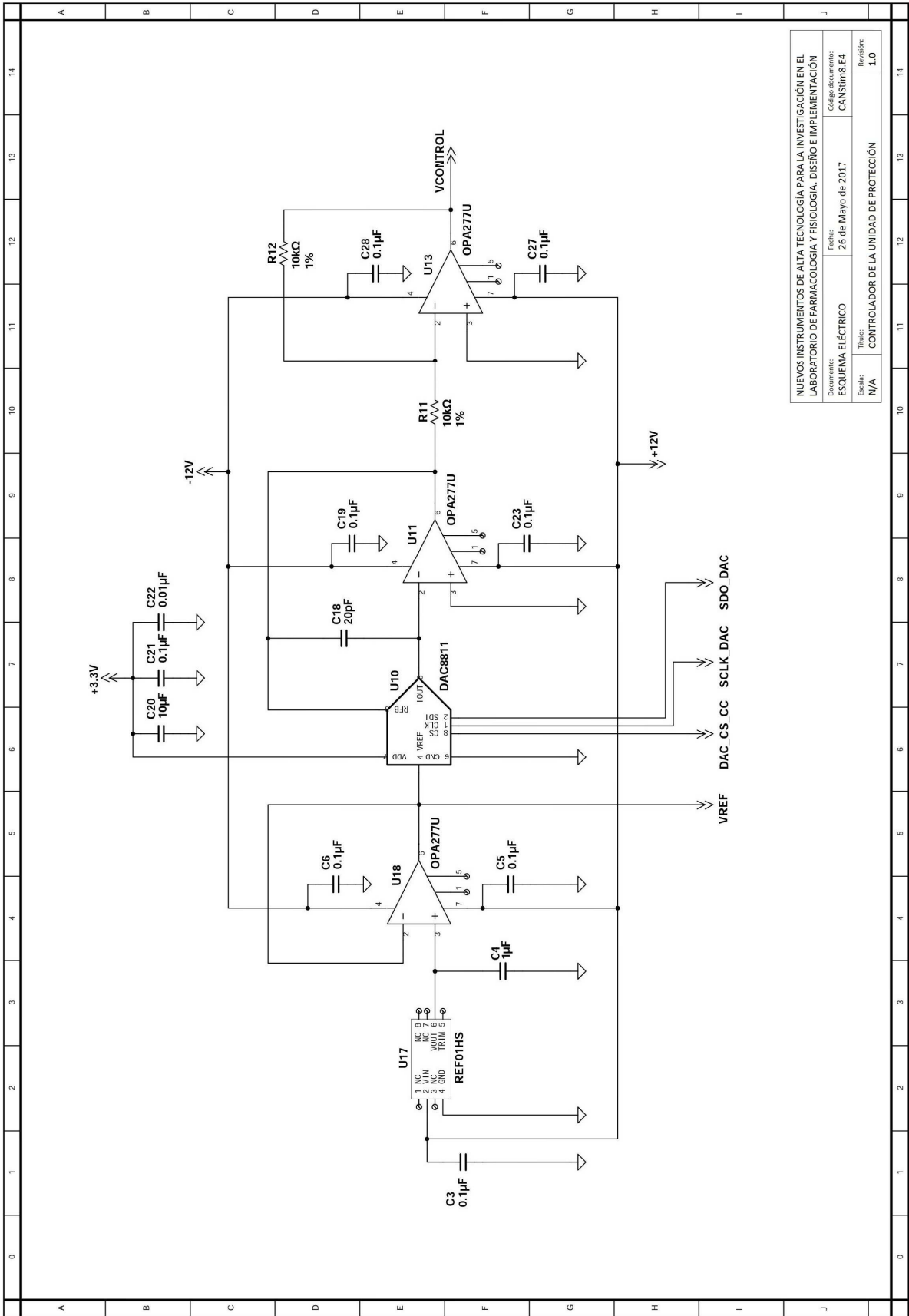
28/06/2017 14:34:34

MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 16:48:37

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CAN51m8.E4
Escala:	N/A
Título:	CONTROLADOR DE LA UNIDAD DE PROTECCIÓN
Revisión:	1.0

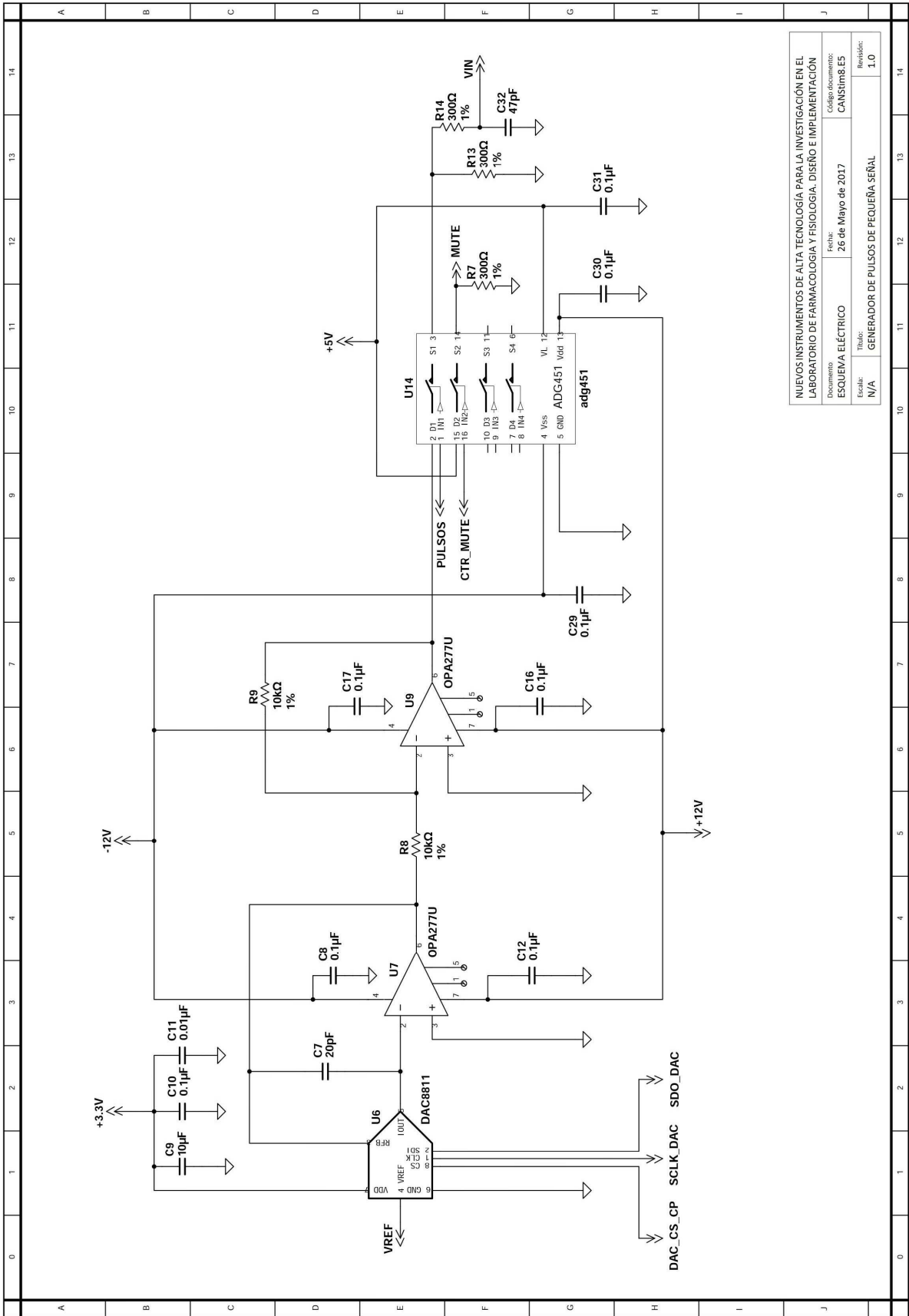
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59





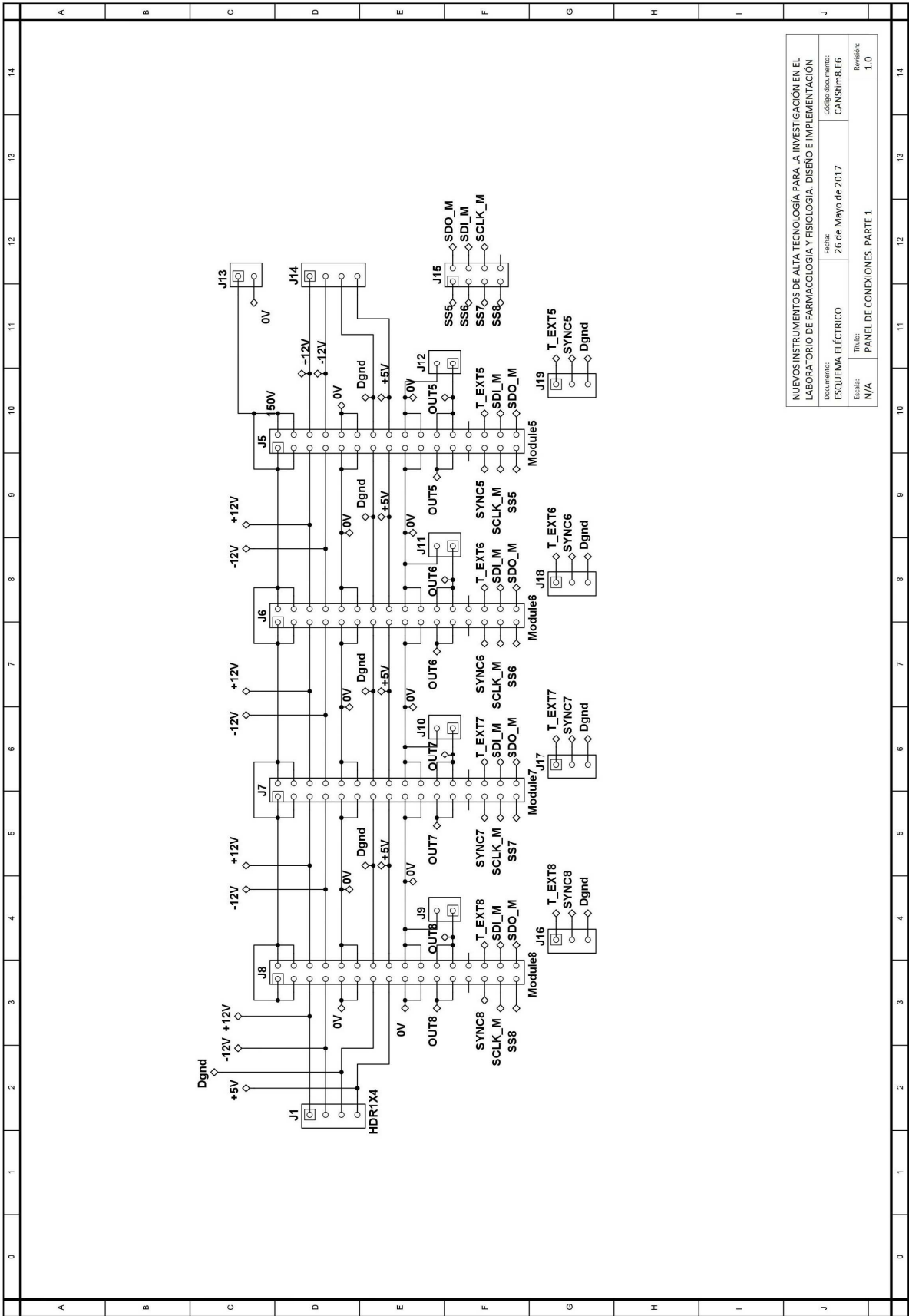
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CANStim8.E5
Escalón:	N/A
Título:	GENERADOR DE PULSOS DE PEQUEÑA SEÑAL
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



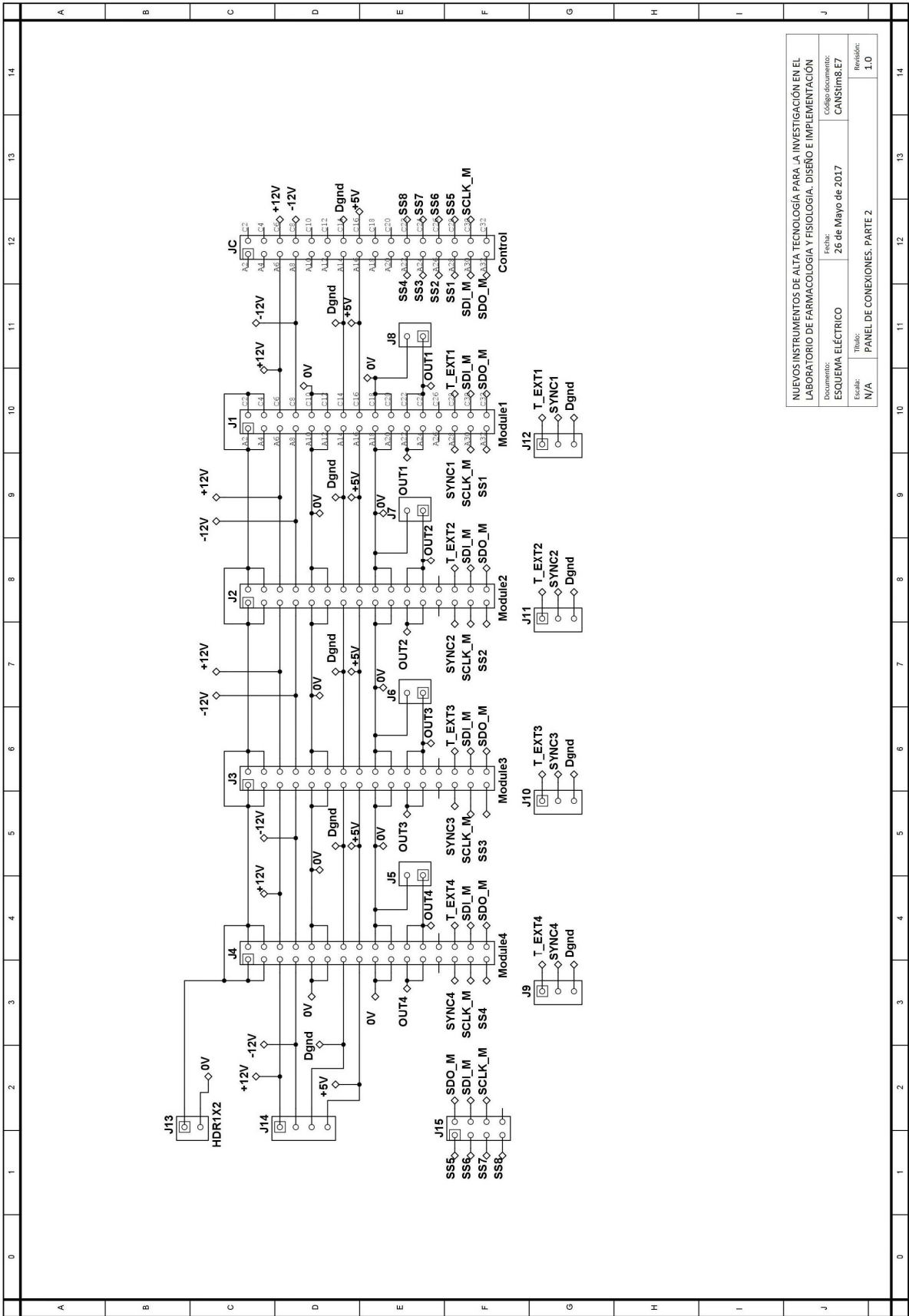
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CANSim8.E6
Escalé:	N/A
Título:	PANEL DE CONEXIONES: PARTE 1
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento: ESQUEMA ELÉCTRICO	Fecha: 26 de Mayo de 2017
Estad: N/A	Código documento: CANSim&E7
Revisión: 1.0	Título: PANEL DE CONEXIONES: PARTE 2

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

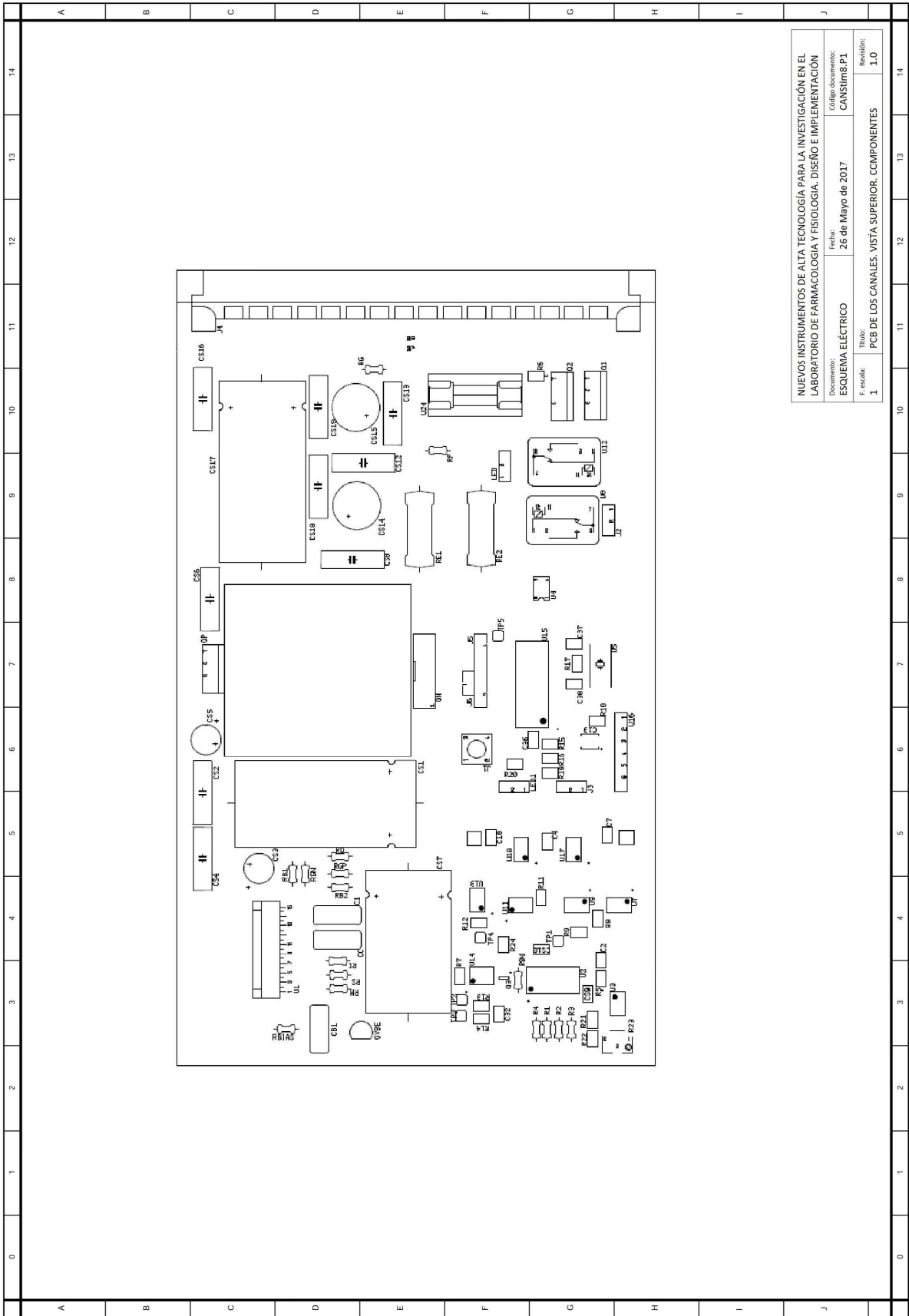
# Apéndice VI

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

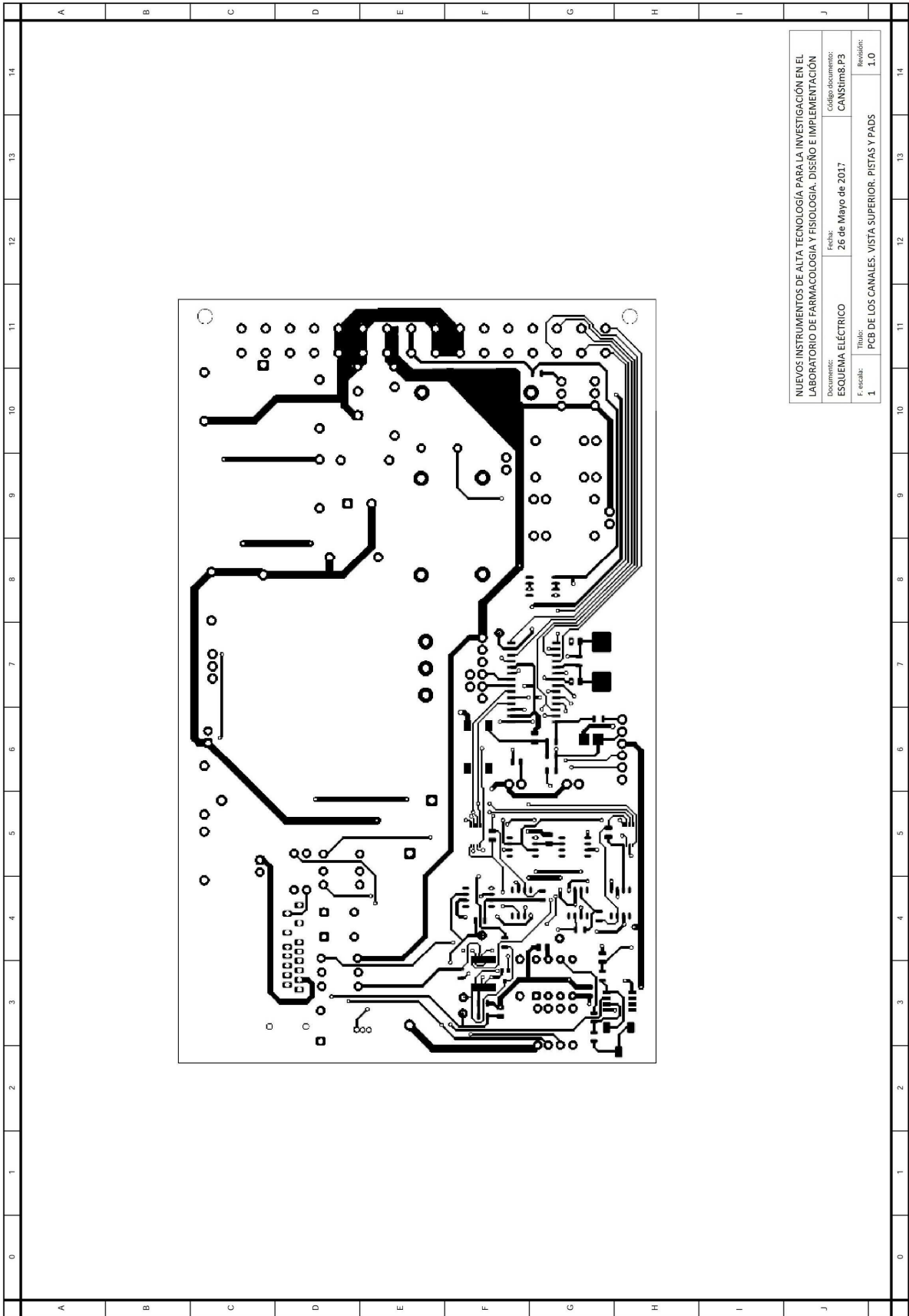
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN**  
 Documento: **ESQUEMA ELÉCTRICO** Código documento: **CANSim8.P1**  
 Fecha: **26 de Mayo de 2017**  
 Escala: **1** Título: **PCB DE LOS CANALES. VISTA SUPERIOR. COMPONENTES** Revisión: **1.0**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <a href="https://sede.ull.es/validacion/">https://sede.ull.es/validacion/</a>	
Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59





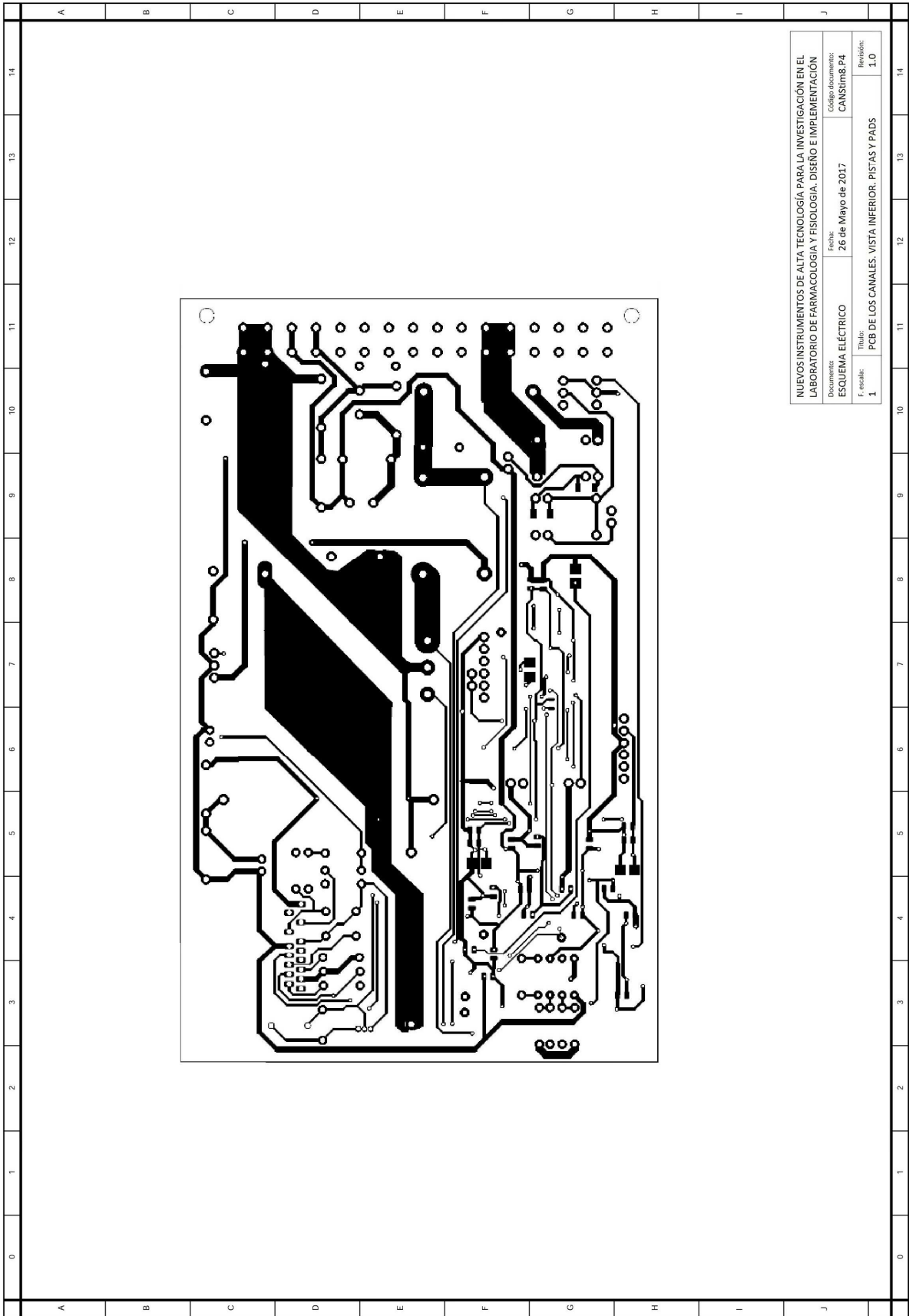
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CANStim8.IP3
Título:	PCB DE LOS CANALES. VISTA SUPERIOR. PISTAS Y PADS
F. result:	1
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha:	28/06/2017 14:20:25
	RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
	MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN			
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO	Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CANStm8.P4	Título:	PCB DE LOS CANALES. VISTA INFERIOR. PISTAS Y PADS
F. estado:	1	Revisión:	1.0

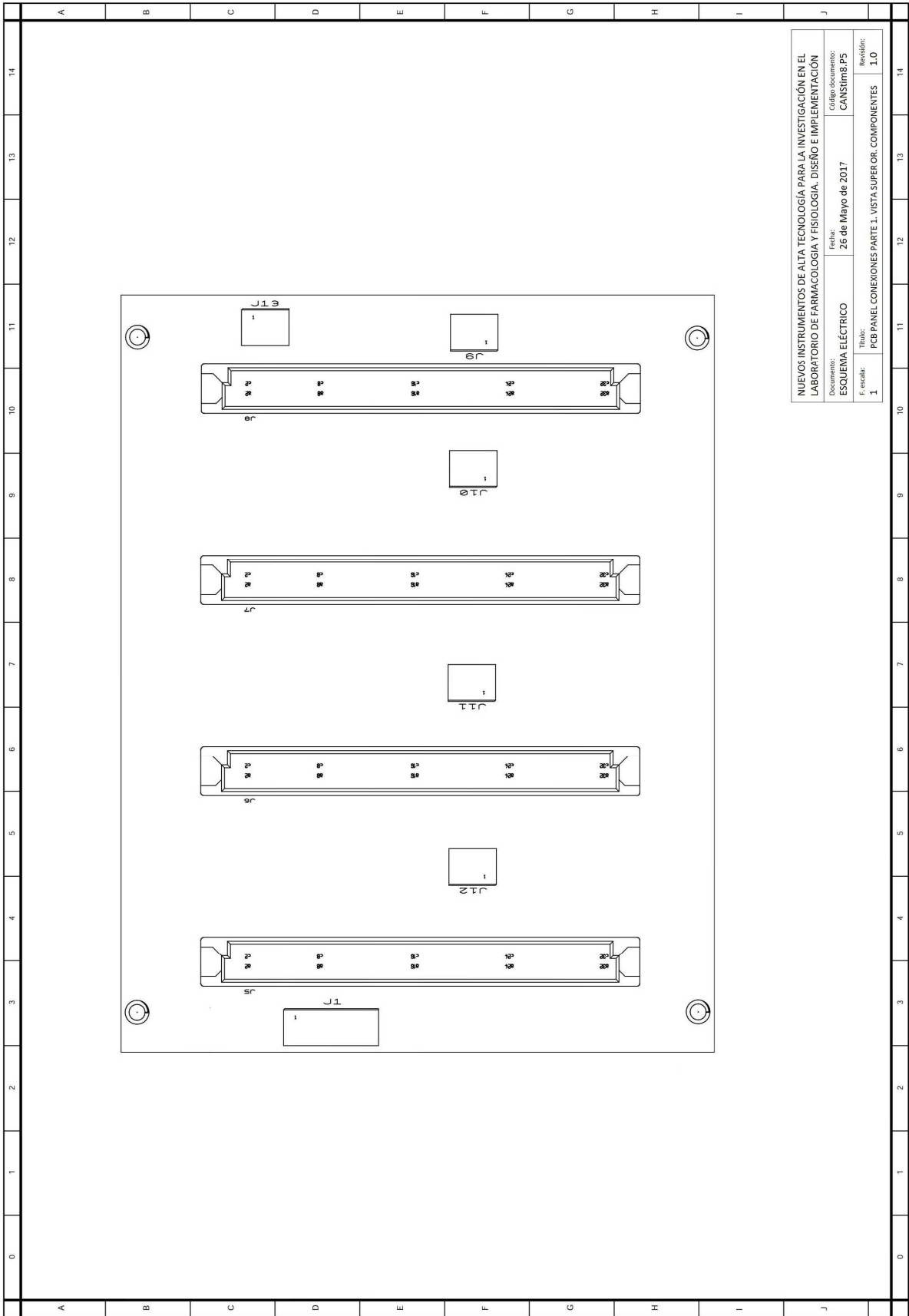
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha:	28/06/2017 14:20:25
	RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
	MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59





NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN

Documento: ESQUEMA ELÉCTRICO  
 Fecha: 26 de Mayo de 2017  
 Código documento: CANStim8.P5

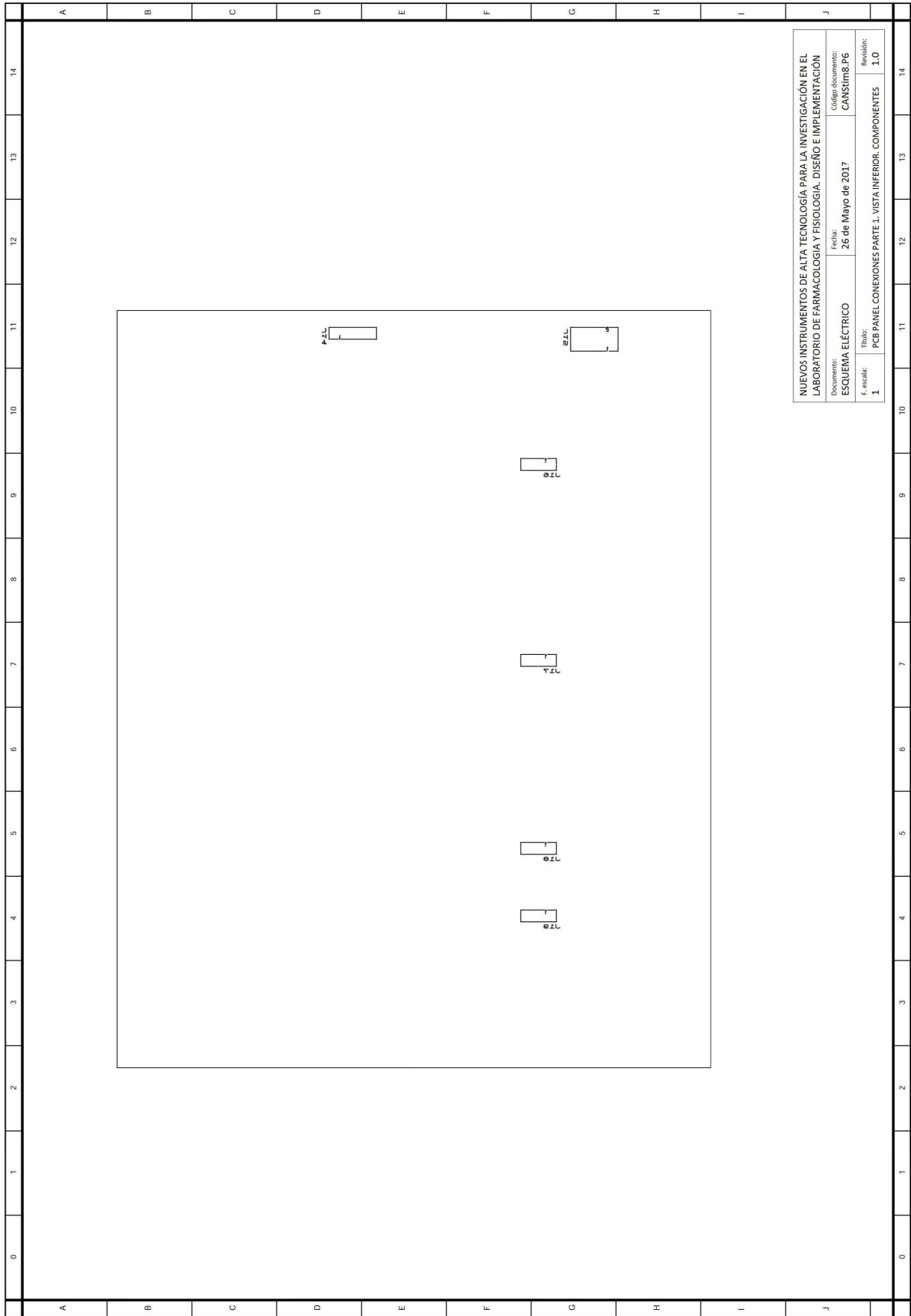
Revisión: 1.0  
 Título: PCB PANEL CONEXIONES PARTE 1. VISTA SUPERIOR. COMPONENTES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



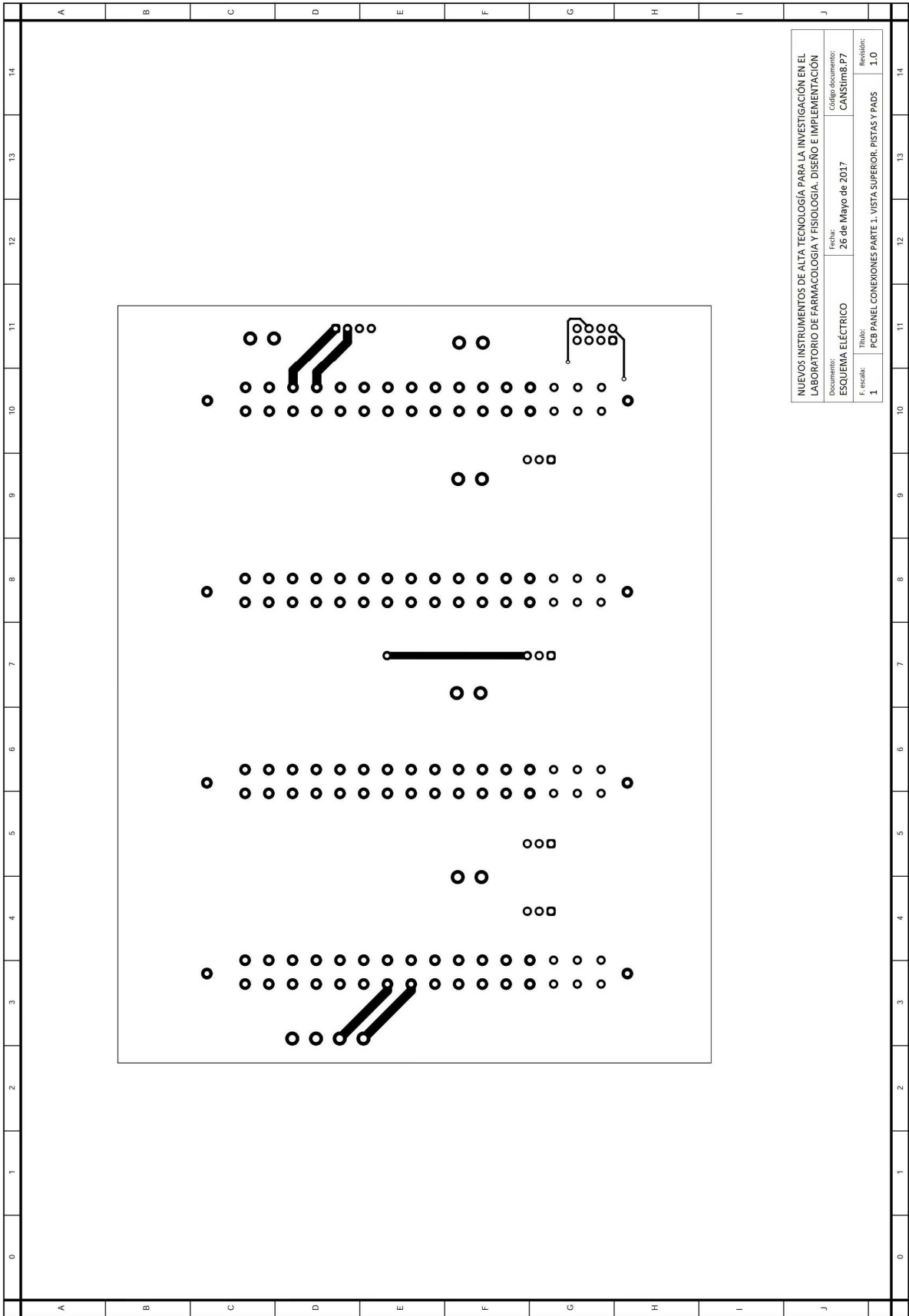
**NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN**  
 Documento: **ESQUEMA ELÉCTRICO** Fecha: **26 de Mayo de 2017** Código documento: **CANStm8.P6**  
 F. escala: **1** Título: **PCB PANEL CONEXIONES PARTE 1. VISTA INFERIOR. COMPONENTES** Revisión: **1.0**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

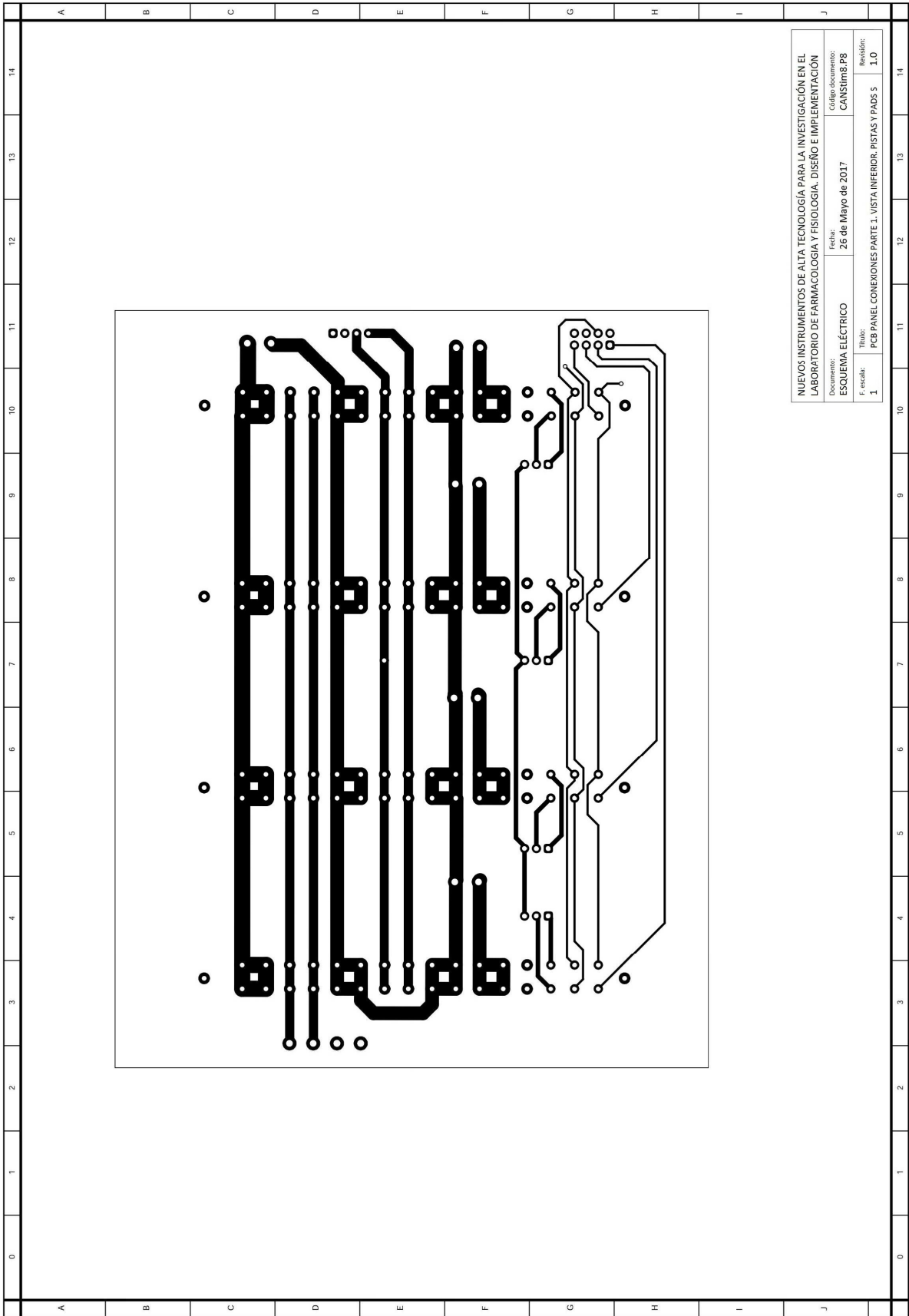
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL  
 LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN  
 Documento: ESQUEMA ELÉCTRICO Código documento: CANStm8.P7  
 Fecha: 26 de Mayo de 2017  
 Título: PCB PANEL CONEXIONES PARTE 1. VISTA SUPERIOR. PISTAS Y PADS Revisión: 1.0  
 Escala: 1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
969032	3HhmTPSD	28/06/2017 14:20:25
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59



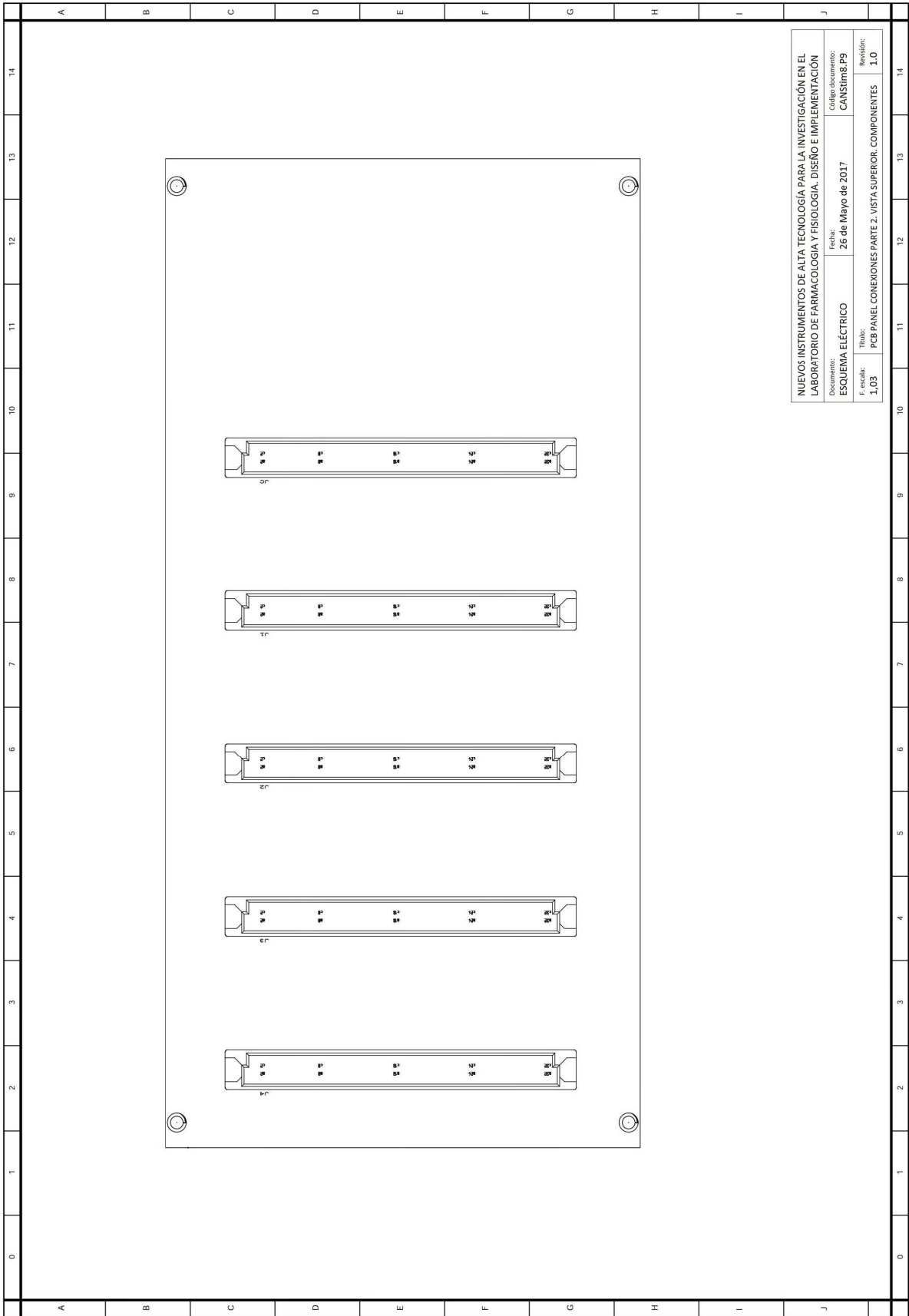
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	ESQUEMA ELÉCTRICO
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Código documento:	CANStm8.P8
F. escala:	1
Título:	PCB PANEL CONEXIONES PARTE 1. VISTA INFERIOR. PISTAS Y PADS \$
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha:	28/06/2017 14:20:25
	RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
	MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59

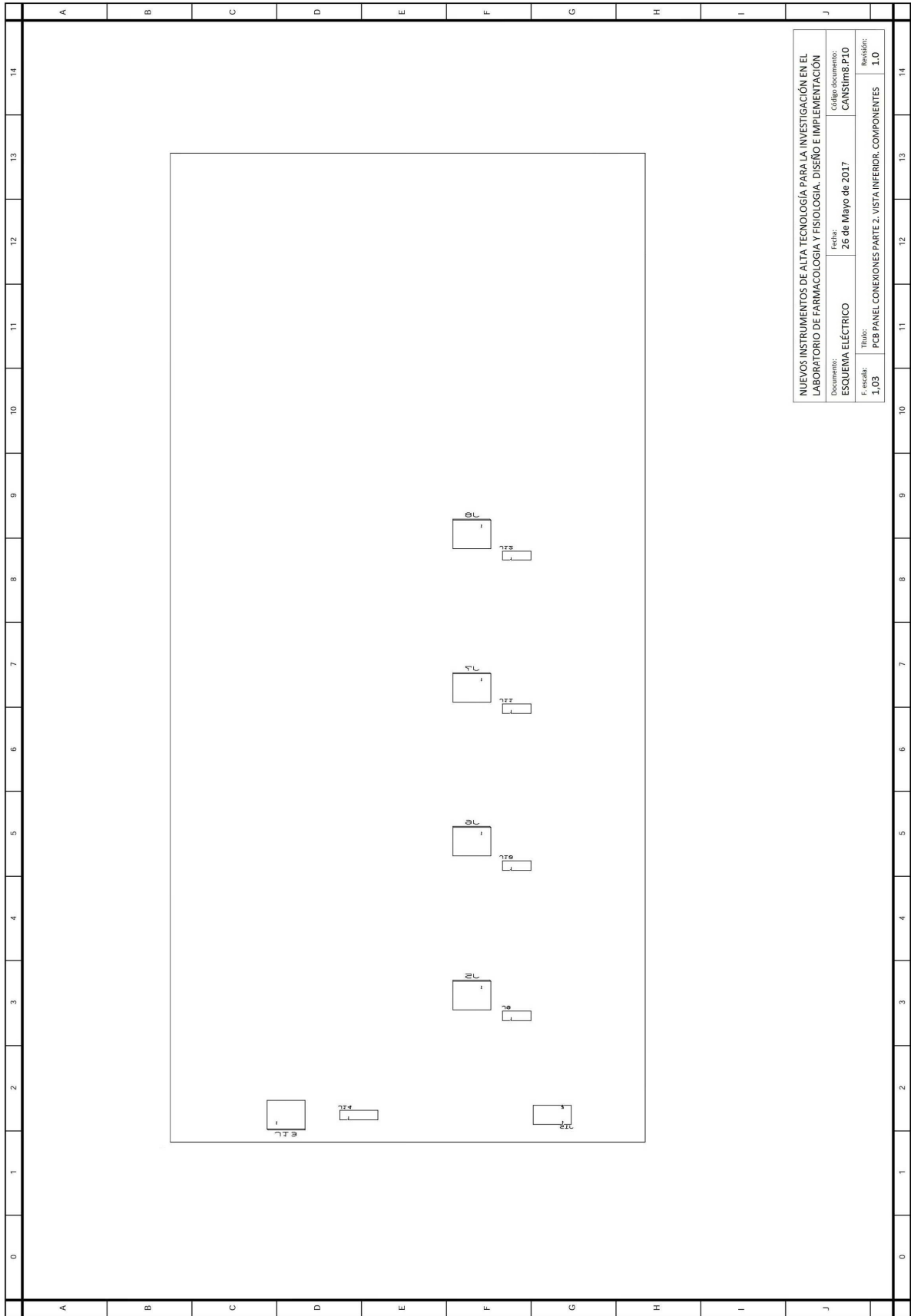


**NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN**  
 Documento: **ESQUEMA ELÉCTRICO** Fecha: **26 de Mayo de 2017** Código documento: **CANStim8.P9**  
 F. escala: **1,03** Título: **PCB PANEL CONEXIONES PARTE 2. VISTA SUPERIOR. COMPONENTES** Revisión: **1.0**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032 Código de verificación: 3HhmTPSD

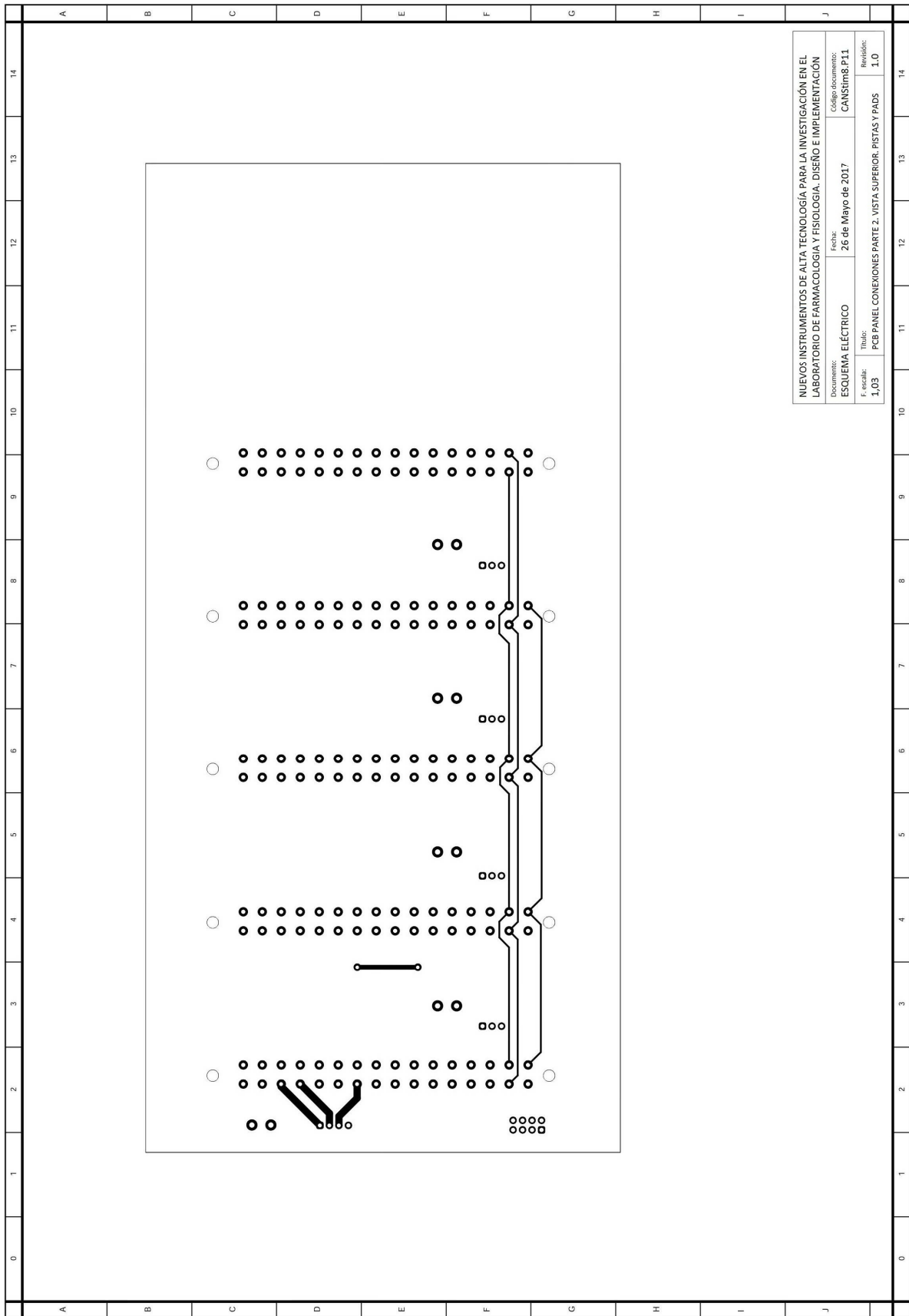
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN**  
 Documento: **ESQUEMA ELÉCTRICO** Fecha: **26 de Mayo de 2017** Código documento: **CANStim8.P10**  
 Revisión: **1.0**  
 Título: **PCB PANEL CONEXIONES PARTE 2. VISTA INFERIOR. COMPONENTES**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



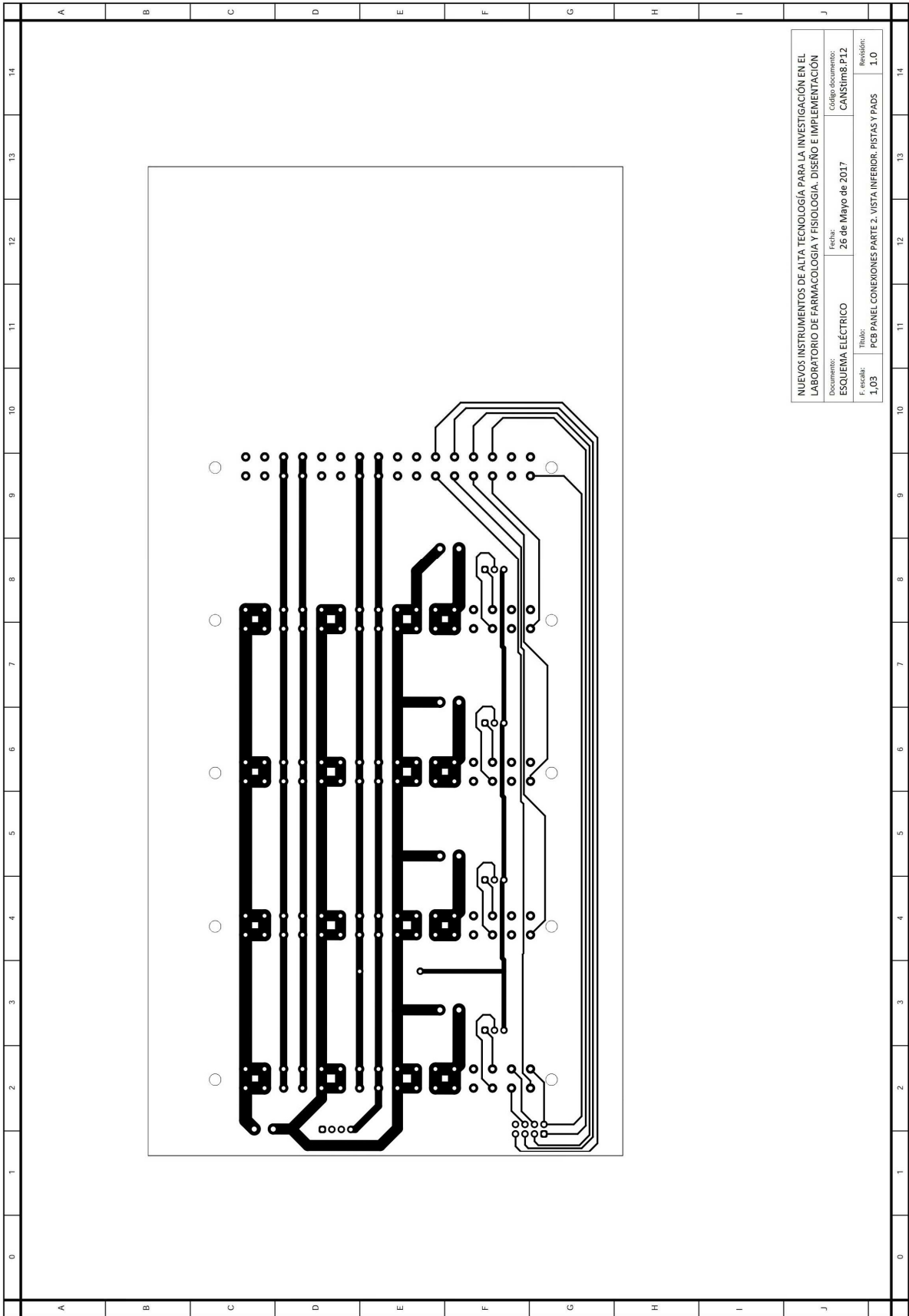
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	Código documento:
ESQUEMA ELÉCTRICO	CANStim8.P11
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Título:	PCB PANEL CONEXIONES PARTE 2. VISTA SUPERIOR. PISTAS Y PADS
Escalado:	1:03
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN			
Documento:	Fecha:	Código documento:	Revisión:
ESQUEMA ELÉCTRICO	26 de Mayo de 2017	CANStim8.P12	1.0
Título:	PCB PANEL CONEXIONES PARTE 2. VISTA INFERIOR. PISTAS Y PADS		
F. escala:	1,03		

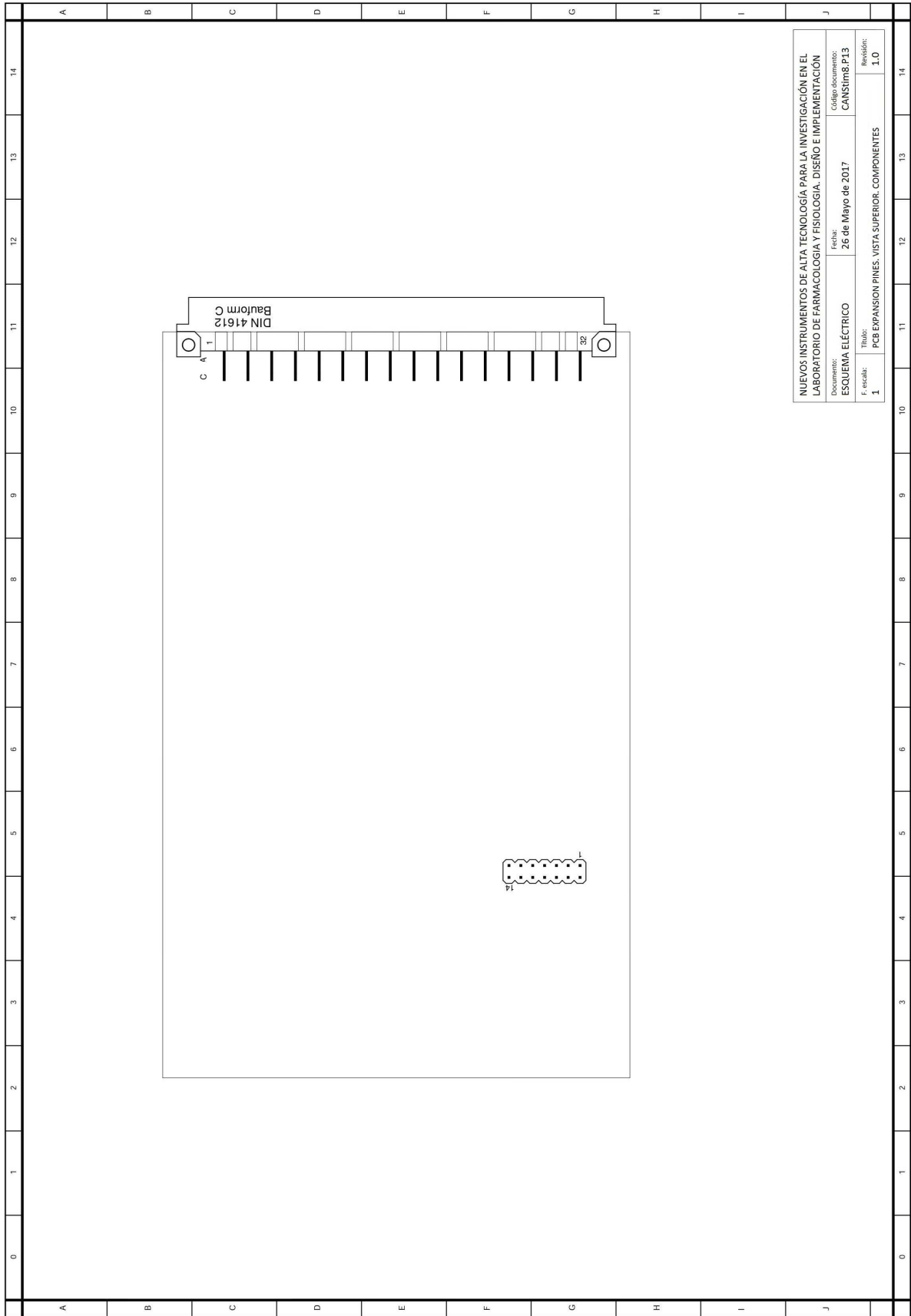
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha:	28/06/2017 14:20:25
	RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
	MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59





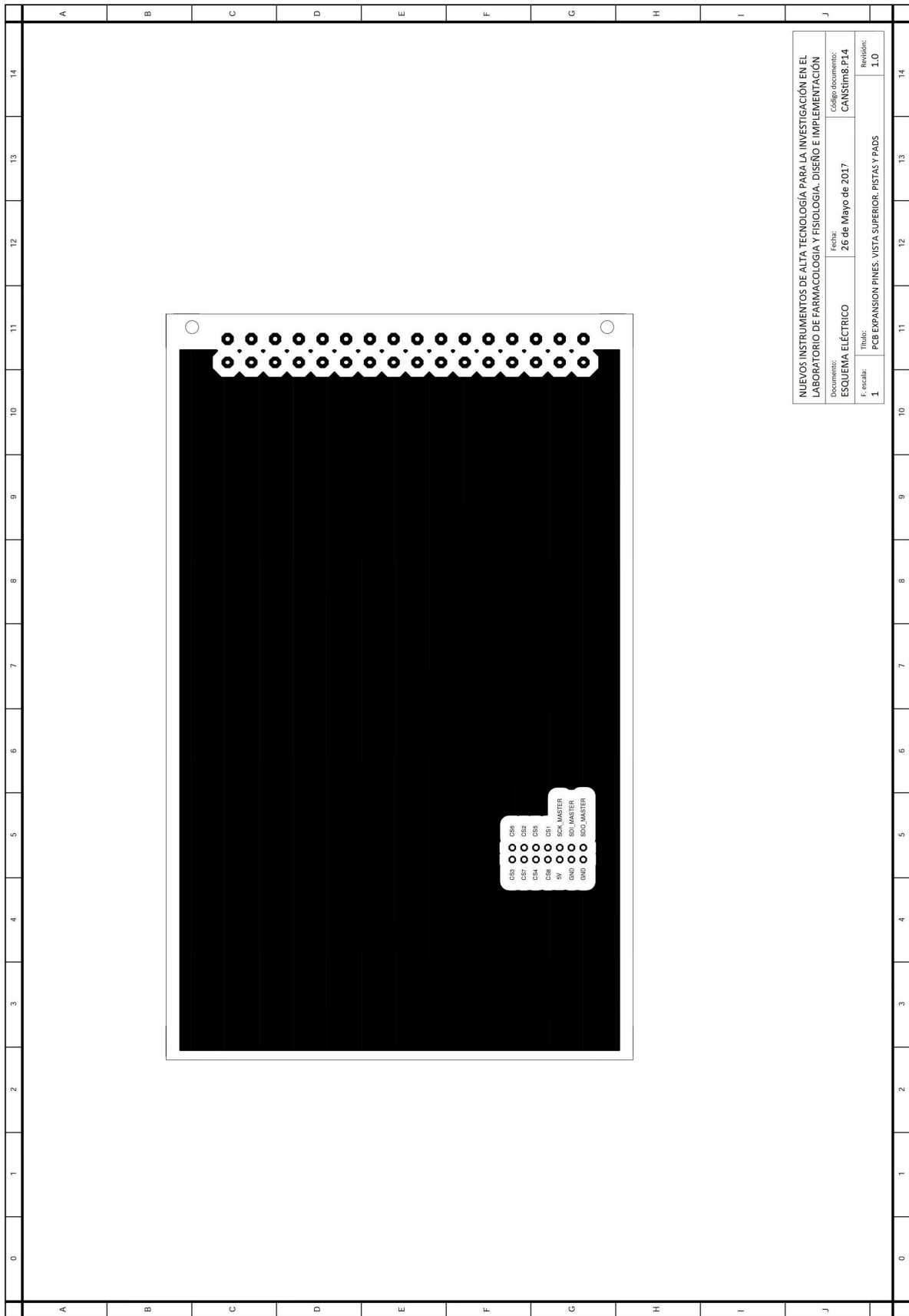
**NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN**  
 Documento: **ESQUEMA ELÉCTRICO** Código documento: **CANStm8.P13**  
 Fecha: **26 de Mayo de 2017**  
 Título: **PCB EXPANSION PINES. VISTA SUPERIOR. COMPONENTES** Revisión: **1.0**  
 F. escala: **1**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



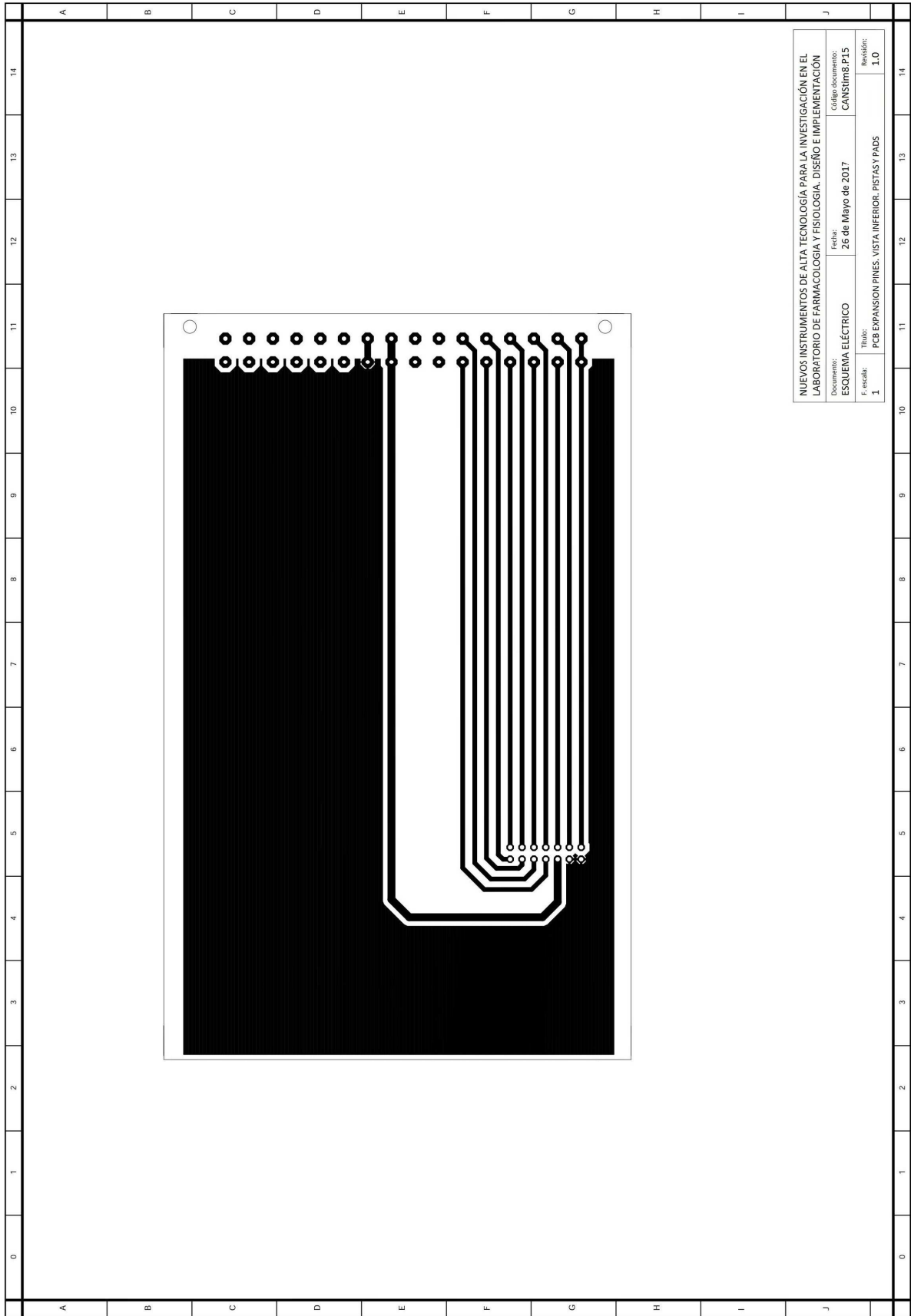
NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN

Documento: ESQUEMA ELÉCTRICO  
 Fecha: 26 de Mayo de 2017  
 Código documento: CANStim8.P14

F. escala: 1  
 Título: PCB EXPANSION PINES. VISTA SUPERIOR. PISTAS Y PADS  
 Revisión: 1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032	Código de verificación: 3HhmTPSD
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



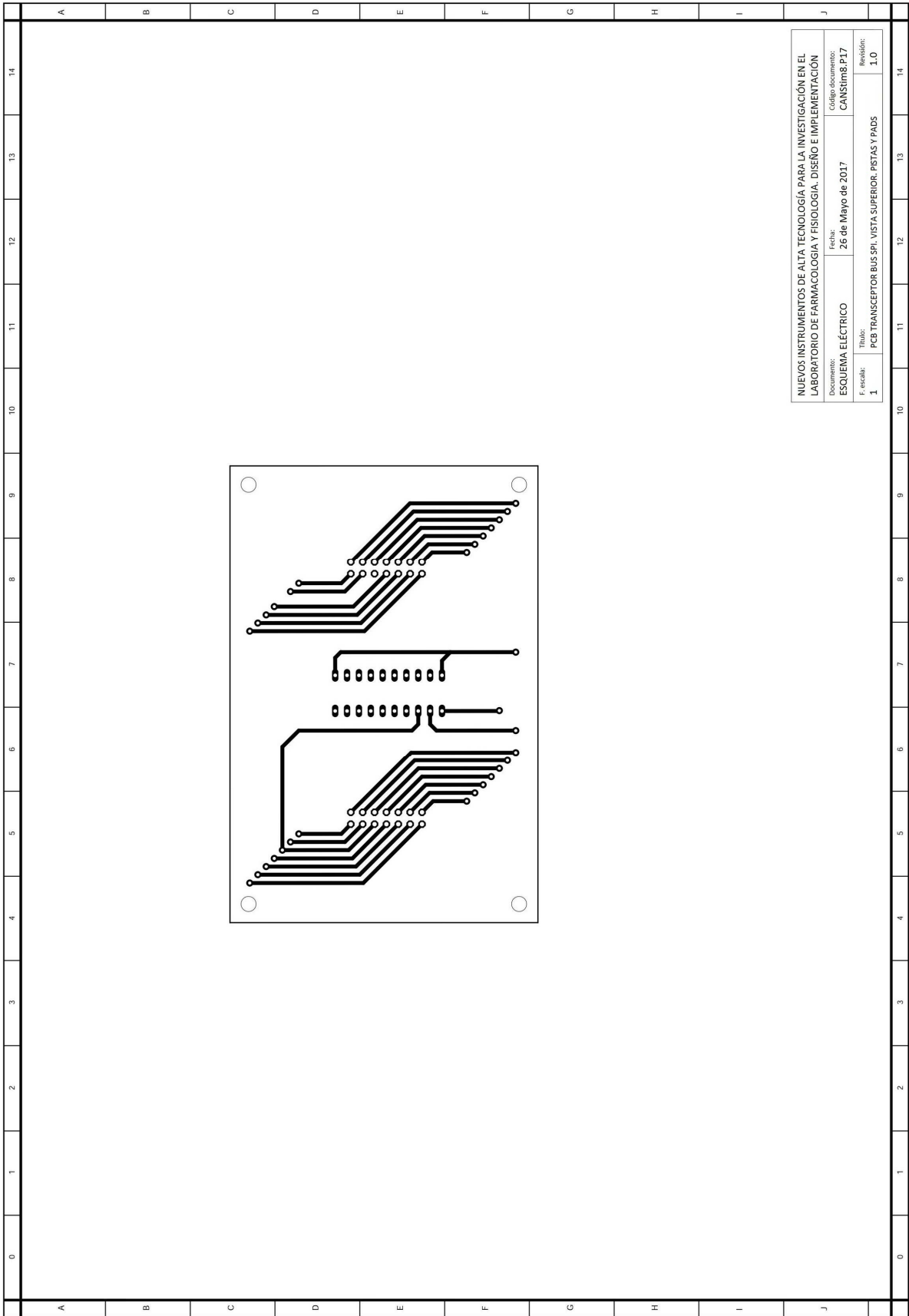
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59





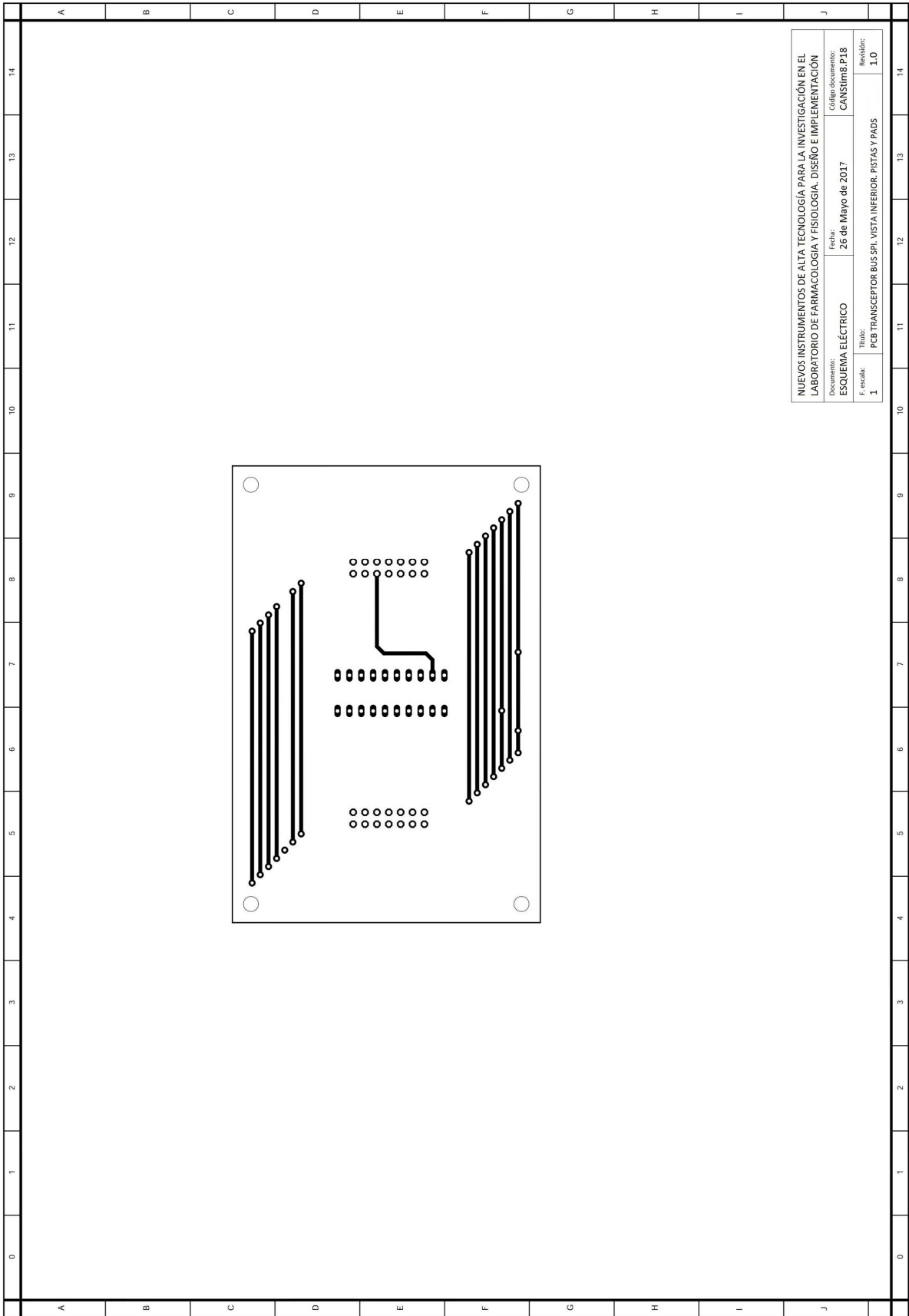
**NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN**  
 Documento: **ESQUEMA ELÉCTRICO** Código documento: **CANStim8.P17**  
 Fecha: **26 de Mayo de 2017**  
 Título: **PCB TRANSCÉPTOR BUS.SPI. VISTA SUPERIOR. PISTAS Y PADS** Revisión: **1.0**  
 Escala: **1**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



NUEVOS INSTRUMENTOS DE ALTA TECNOLOGÍA PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGIA. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN	
Documento:	Código documento:
ESQUEMA ELÉCTRICO	CANStim8.P18
Fecha:	26 de Mayo de 2017
Título:	PCB TRANSCÉPTOR BUS.SPI. VISTA INFERIOR. PISTAS Y PADOS
Escala:	1
Revisión:	1.0

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha:	28/06/2017 14:20:25
	RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 14:34:34
	MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 16:48:37
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		05/07/2017 16:35:59

# Apéndice VII

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Article

## Measuring the Contractile Response of Isolated Tissue Using an Image Sensor

David Díaz-Martín <sup>1,\*</sup>, José Gerardo Hernández-Jiménez <sup>2</sup>, Manuel Rodríguez-Valido <sup>1</sup>  
and Ricardo Borges <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Industrial Engineering Department, School of Physics, La Laguna University, Av. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, San Cristóbal de La Laguna, 38200 Santa Cruz de Tenerife, Spain; E-Mail: mrvalido@ull.edu.es

<sup>2</sup> Bioorganic University Institute “Antonio González”, La Laguna University, Av. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, San Cristóbal de La Laguna, 38200 Santa Cruz de Tenerife, Spain; E-Mails: jghdez@gmail.com (J.G.H.-J.); rborges@ull.es (R.B.)

<sup>3</sup> Pharmacology Unit, School of Medicine, La Laguna University, Av. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, San Cristóbal de La Laguna, 38200 Santa Cruz de Tenerife, Spain

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ddiazmar@ull.es; Tel.: +34-625-419-000.

Academic Editor: Alexander Star

Received: 5 January 2015 / Accepted: 15 April 2015 / Published: 20 April 2015

**Abstract:** Isometric or isotonic transducers have traditionally been used to study the contractile/relaxation effects of drugs on isolated tissues. However, these mechanical sensors are expensive and delicate, and they are associated with certain disadvantages when performing experiments in the laboratory. In this paper, a method that uses an image sensor to measure the contractile effect of drugs on blood vessel rings and other luminal organs is presented. The new method is based on an image-processing algorithm, and it provides a fast, easy and non-expensive way to analyze the effects of such drugs. In our tests, we have obtained dose-response curves from rat aorta rings that are equivalent to those achieved with classical mechanic sensors.

**Keywords:** image sensor; isolated tissue; contractile response; photogrammetry; image-processing algorithm; monitoring drug effects

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



## 1. Introduction

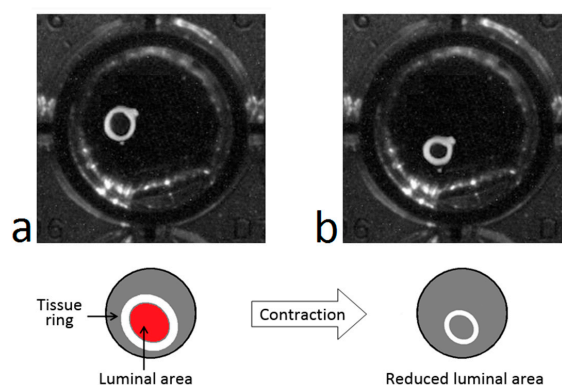
The quantification of contractile responses was one of the first methods described in pharmacology. As smooth muscle contraction/relaxation is a phenomenon that can be visualized directly, scientists studied the movements of the isolated intestine and other tissues, immersing the preparations in a tissue-bath filled with a saline buffer and recording them in kymographs using smoked paper. With minor variations, this technique is still use today, improvements coming from the incorporation of multichannel recordings due to the use of mechanical transducers, along with computer acquisition and analysis. The differences observed between isotonic and isometric/auxotonic recordings in tissues are traditionally studied using such methods. However, as vessels contract against their interior pressure and in order to avoid the tissue damage caused by the hooks or threads used in mechanical transducers, a system has been developed based on the recording of contractions by monitoring the inner pressure.

Arterial vessels are dynamic structures that are exposed to a pulsatile blood flow. Given that their muscle tone may be regulated by either innervation and/or circulating hormones, evidently none of the methods currently available to measure their contraction is perfect. Moreover, while a vast amount of direct data that can be obtained from organ baths, using the traditional approach to run assays on dozens of isolated tissue preparations is not commonly performed in pharmacology laboratories. There are a number of reasons for this, but the cost and the bench space required for such large equipment have been key deterrents.

In this paper, we describe a new method that allows the contractile effect of drugs to be measured on blood vessel rings using an image sensor (video-camera). Compared with traditional mechanical transducers, this method offers an easy, fast and non-expensive way to carry out studies into contractile responses using less complicated equipment.

## 2. Materials and Methods

When an artery ring contracts after the application of a drug, its lumen diameter decreases gradually (see Figure 1). This contractile response can be registered in a temporal sequence of images that can be acquired automatically with an image acquisition system such as that shown in Figure 2.



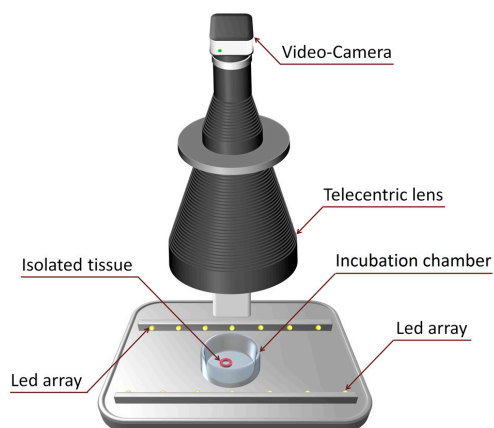
**Figure 1.** Representation of the contractile response: Rat aorta ring before (a) and after (b) the application of a contractile drug.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

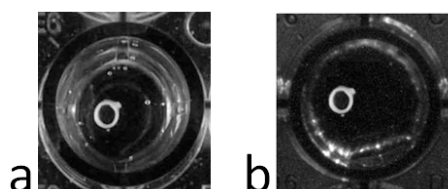


**Figure 2.** Image acquisition system.

This system is comprised of a high resolution video-camera, a telecentric lens and a simple illumination system. To monitor the contractions, we have developed an image-processing algorithm that detects the tissue ring when a new image is captured and that measures its lumen area by calculating the number of pixels enclosed within the ring. At the same time, a specific software application calculates an on-line dose-response curve that can be readily converted into surface units.

### 2.1. Video-Camera

Any commercial USB controlled video-camera can be used with the acquisition software, such as a simple webcam. We use a UI1490LE camera (Ueye, IDS Imaging, Obersulm, Germany) the high resolution of which (10 Megapixels) allows us to record very mild contractions. The camera is situated  $\approx 60$  cm above the incubation chamber and we take advantage of the camera's telecentric lens (OptoEngineering, Mantova, Italy) to eliminate image aberrations like reflections and geometric distortions, or those related to perspective (Figure 3). Even without a telecentric lens, the influence of many aberrations can be dampened by image processing.



**Figure 3.** Image of the same aorta ring under conditions of equal light without (a) and with (b) a telecentric lens.

### 2.2. Software Application

The software application is user-friendly with a simple graphical interface based on a windows environment and menus. The video camera can be adjusted via the application, which can also control

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

image acquisition. In addition, the user can configure the experimental parameters and monitor the contractile response in real time. The results can be stored in a tabulated program (e.g., Excel) or as a text file. The application was designed on Microsoft Windows® OS and implemented using MATLAB® [1].

### 3. Image-Processing Algorithm

A new algorithm was developed to automatically detect and measure the luminal area of a blood vessel ring (and other luminal organs) from the images obtained. The algorithm is based on computer vision and photogrammetry techniques, which were implemented using the Image Acquisition [2] and Image Processing [3] toolboxes for MATLAB®. In a detailed data processing flowchart we highlight three main blocks: preprocessing, luminal area detection, and luminal area measurement (Figure 4). These three blocks are divided into different processes as described below.

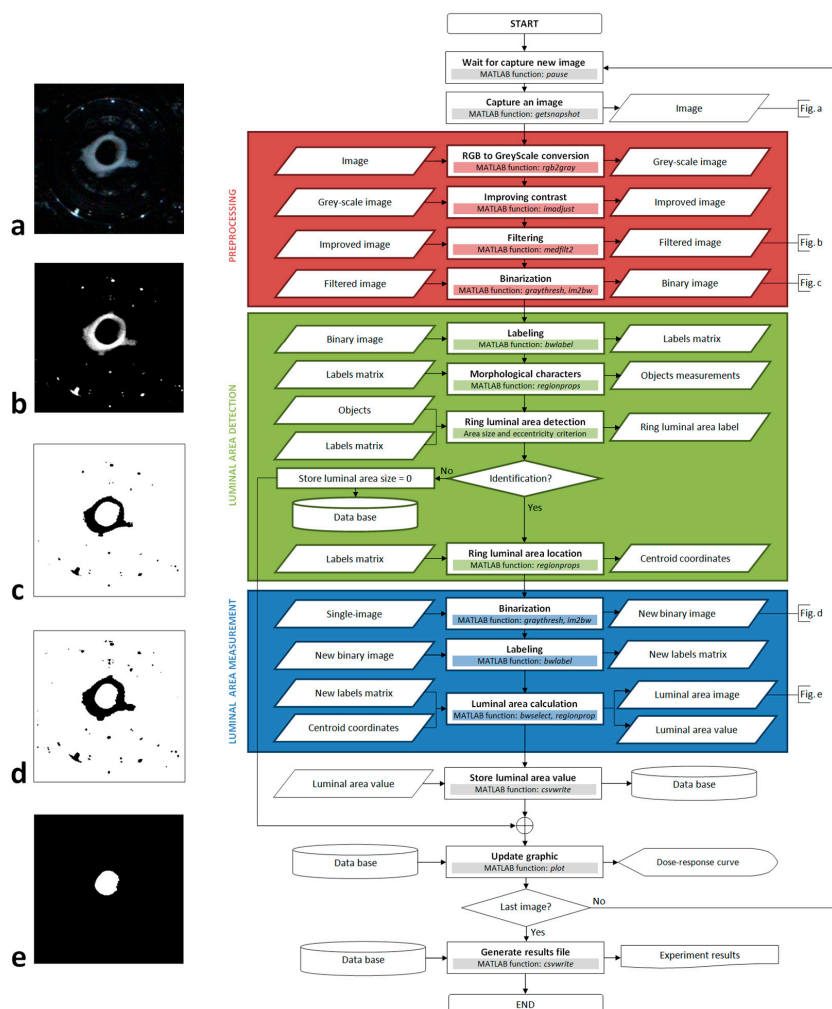


Figure 4. Image algorithm flowchart.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

### 3.1. Image Preprocessing

This first block in the algorithm includes four image enhancement processes: RGB to grey-scale conversion, contrast enhancement, filtering by median filter, and binarization. As the color of the image holds no information about the tissue's response, we removed the RGB components to obtain a grey-scale image. The image's histogram is modified to automatically enhance the contrast, so that the blood vessel ring stands out from the background image and other objects. To achieve this, the histogram is modified to give a grey values distribution similar to an inverted Gauss-Bell, in which the first threshold grey value is configured between 0% (black) and 50%, and the second threshold is between 75% and 100% (white). This step is very important because it reduces reflections, brightness and any undesirable bubbles.

After contrast enhancing, there are still some groups of pixels in the image that are too white, resulting from reflections and intense brightness due to the conditions of illumination. Many of these groups of pixels can be deleted through a binarization process if their intensity is attenuated. To achieve this we use a median filter that reduces the intensity of these pixels by calculating a new intensity value from neighboring pixels, without producing any blurring of the object's edges (see the image obtained after applying these three adjustments in Figure 4b).

The binarization process reduces the grey-scale image (Figure 4b) to a binary image by applying a threshold routine (Figure 4c). We follow the Otsu method [4] included in the MATLAB® libraries to set an appropriate threshold grey value for each image. The main advantage of this method is that the threshold value is calculated automatically and it is very efficient when the histogram is similar to an inverted Gauss-Bell distribution. Accordingly, the enhanced contrast and the filtering applied in the two stages indicated above allow the threshold value for the image to be optimized (see Figure 4c as an example of how the image appears after this process).

### 3.2. Detection of the Luminal Area

One of the key aspects of this algorithm is that it distinguishes the luminal area of the tissue from other objects. For this reason, we developed an efficient method to successfully identify and situate the lumen, again divided into four processes (Figure 4): labeling, calculation of the morphological features, identification of the luminal area, and location of the luminal area.

The labeling process takes the binary image from the previous stage as its input (Figure 4c). Basically, it consists in giving an identification number to each object present in the image, for which we have used the image-segmentation method outlined in [5] and that is included in MATLAB® libraries. As a result of this process, we obtain a matrix of labels with the same dimensions as the input image. The value of each element corresponds to the label given to a pixel of the image in function of the object to which it belongs. However, one disadvantage of this process is that the larger the number of objects in the image the longer the computation time. For this reason, our algorithm searches for white objects enclosed by black pixels (for example, in Figure 4c there are only two white objects: the image background and the luminal area of the tissue, as opposed to more than twenty black objects).

The calculation of morphological features provides information about the shape of the objects. This information is taken from the matrix of labels using a specific MATLAB® function (see Figure 4) and from this, parameters such as the area, size, perimeter or eccentricity of objects can be calculated. These

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

parameters allow us to differentiate some objects from others, and in our case, we have found that the best parameters to identify the luminal area are the size and eccentricity.

Since the area of the lumen is one of the largest objects in the image, we first removed all the objects that were smaller than a given pixel threshold. However, most objects that result from excessive brightness and reflections are difficult to remove and generally, they do not have a regular morphology. Conversely, the lumen of the rings is a very circular object and it stands out for its high level of eccentricity relative to the other objects. For this reason, after size filtering we choose the object with the highest eccentricity. After carrying out more than 3000 recognition tests, we found that this simple identification criterion has an error probability of approximately 0.001%. This process is the most critical step in the algorithm because the contractile response can only be measured once the tissue has been successfully identified. Once the lumen has been successfully identified, the algorithm uses the label associated with it to calculate the coordinates of the pixel closest to its centre from the matrix of labels obtained during labeling process.

### 3.3. Measurement of the Lumen Area

A priori, this last block seems redundant because we calculate the ring area in the previous step to distinguish it from other objects. However, this measurement was obtained from an image manipulated to facilitate the identification of the lumen area (Figure 4b) and the objects' original appearance is considerably altered by binarization. In fact, when the appearance of the tissue is enhanced it becomes larger and more rounded, making it easier to distinguish to obtain its eccentricity value (Figure 4c). The problem is that the area measurement that we obtain is far from real and as such, the algorithm uses the original image (Figure 4a) along with the coordinates calculated in the previous block in order to obtain a measurement that is as accurate as possible.

To achieve this, the original image is binarized again without enhancement (generating an image such as that shown in Figure 4d), and this new binary image is labeled and a new matrix of labels is obtained. In this case, there are more objects because those that were removed from the image in the preprocessing block now appear again. However, as we now know the precise position of the lumen, it is easy to identify.

Subsequently, the luminal area of the ring is isolated into a binary image such as that shown in Figure 4e. This image is built from the new matrix of labels, where we only select those pixels whose label coincides with the label of the pixel located in the coordinates that we calculated in the previous block (centroid pixel). To shape the image, we paint the selected pixels white on a black background. Finally, the area is calculated (in pixels) by counting the number of white pixels that appears in the new binary image and this value is stored.

## 4. Experimental Section

We describe here an experiment carried out using our method to analyze the contractile effect of the  $\alpha$ -adrenergic agonist phenylephrine on 15 rat aorta rings. This experiment was performed on male Sprague-Dawley rats that were anesthetized with diethyl ether, and sacrificed by cervical dislocation and exsanguination. The thoracic aorta was removed according to the procedure described in [6] and 25 aorta rings  $\leq 1$  mm thick were obtained under a stereoscopic microscope, extracting blood clots from

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

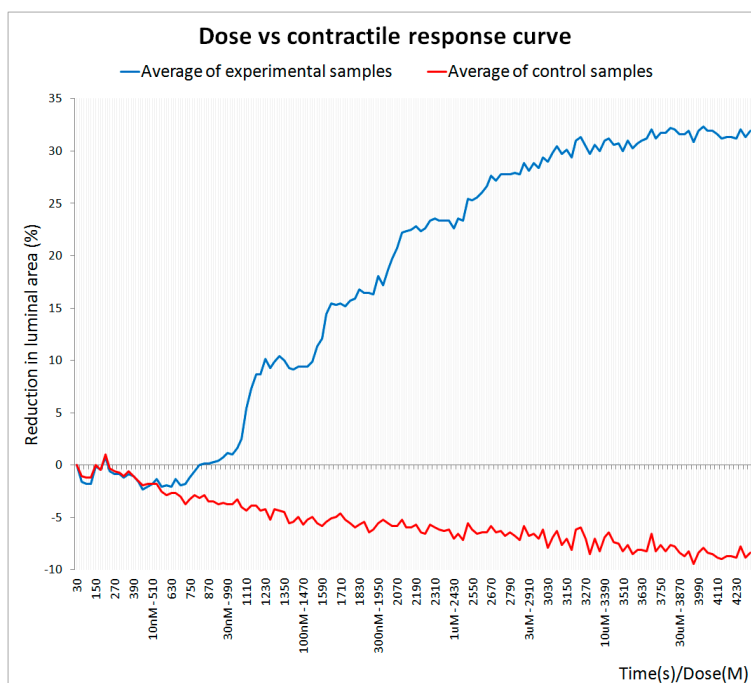
Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

the lumen. Each ring was placed in a small glass incubation chamber in 100  $\mu\text{L}$  of Krebs-HEPES saline solution and maintained at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Before commencing the experiment the rings were allowed to stabilize for 40 min, changing the medium twice during this period. While the rings were stabilizing, the software application was prepared to set up the experimental parameters and adjust the video-camera lens in order to obtain a sharp image on the computer screen.

In the experiment, eight doses of phenylephrine were added at 8 min intervals in a cumulative manner. Specifically, the final concentration of the doses dispensed was 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  and 30  $\mu\text{M}$ . To maintain the medium volume constant, each different dose was added in a 10  $\mu\text{L}$  volume (a 10 $\times$  concentration) after having previously removed 10  $\mu\text{L}$  of the medium.

The software application was configured to register the response of the rings at a rate of 2 frames/min. The application indicates when the next dose should be injected and the concentration that should be dispensed. As a result, the application generates a dose-response (contraction) curve. The program updates the plot after analyzing each new image, enabling the contractile effect to be observed on-line (see Figure 5 for the dose-response curve obtained in this experiment).



**Figure 5.** Dose-response curve obtained with the image processing algorithm.

Each dot in the plot corresponds to the mean response of the 15 experimental (blue line) and 10 control (red line) rings. The curve is normalized to the average value of the initial lumen area, which corresponds to the baseline measurement. In this case, and due to the nature of the arterial tissue, it is impossible to obliterate the lumen and the maximum reduction in area produced by a vasoconstrictor like phenylephrine usually does not exceed 40%. This phenomenon is clearly evident in the

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

dose-response curve (Figure 5), where a plateau is reached above a given concentration of phenylephrine at which the reduction in the lumen area remained around 30%.

## 5. Results and Discussion

We have implemented an innovative approach to measure the contraction of isolated blood vessels using an image sensor, obtaining results that are fully comparable to those obtained with mechanical transducers. For instance, the  $EC_{50}$  obtained for phenylephrine ( $169.5 \pm 31.3$  nM), as well as the displacement of the concentration-response curves to the right caused by the  $\alpha_1$  antagonist prazosin, were in the nM range, as described using classical organ baths [7]. Using the Gaddum transformation [8], the  $K_i$  we obtained in this way for prazosin was 10 pM, which is similar to that found using a standard organ bath, both in our laboratory and elsewhere [7,9,10].

The use of this new approach offers certain advantages as it does not involve the use of any specific recording system (transducers, signal conditioning, or glassware: see Table 1). Moreover, as it avoids the use of the classic organ-bath, the amount of drugs, gases, buffers and solutions required is reduced. Likewise, since the rings are not tied to a sensor, rings with a thickness <1 mm can be used, minimizing tissue loss and facilitating multiple and simultaneous analyses. We initially thought that basal pretension would be necessary for recording, however, the aorta rings contracted and dilated (after contraction) in the same way as extension could be obtained with traditional systems. Histological analysis of arterial rings performed either immediately after isolation or after a 5 h experiment indicated that the arterial wall structures, including the endothelium, apparently suffered no damage. Moreover, the vasodilatation caused by acetylcholine on phenylephrine-precontracted arteries indicates the endothelium was still functional. We are currently adapting this technique to be used in 96-well plates. In addition, the system is also being successfully applied to other ring preparations like the rat trachea.

**Table 1.** Advantages over the classical method.

	Mechanical Sensor	Image Sensor
Average time to prepare and mount one tissue ring ( <i>excluding sacrifice and dissection</i> )	20 s	2 s
Optimization of animal resources ( <i>minimum ring thickness</i> )	4 mm	<1 mm
Optimization of drugs ( <i>i.e., for a n = 25 phenylephrine dose-response experiment</i> )	2.61 mg ( <i>Minimum</i> )	0.041 mg ( <i>Minimum</i> )
Gases	95% O <sub>2</sub> + 5% CO <sub>2</sub>	Not Necessary
Buffers	6.25 L	0.05 L
Volume of isotonic solution per ring	4–50 mL	0.05–0.2 mL
Damage to tissue ring	Invasive ( <i>The tissue is tied to the sensor by hooks</i> )	Non-invasive
Equipment	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mechanic sensor</li> <li>• Transducer accessories</li> <li>• Signal conditioner</li> <li>• Power supply</li> <li>• Computer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Video-camera</li> <li>• Telecentric lens *</li> <li>• Illumination *</li> <li>• Computer</li> </ul>

\* Optional equipment.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

## 6. Conclusions

A new and innovative method has been devised to measure the contractile effects of drugs on isolated blood vessels and other luminal organs based on an image sensor. This method is much cheaper than classical mechanical transducer based techniques and it can be implemented in any academic or industrial laboratory. Furthermore, it is very easy to use, it reduces the number of animals required, and it minimizes the drug and the solution volumes needed for each experiment.

## Acknowledgments

This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2010-15822 & BFU2013-45253-P) and CONSOLIDER (CSD2008-00005) grants to R.B.

## Author Contributions

R.B. conceived the technique, designed the pharmacological experiments and carried out the data analysis. D.D.-M. and M.R.-M. implemented the image-processing algorithm, designed the software application and fabricated the image acquisition system. J.G.H.-J. designed and performed the experiments and carried out the data analysis. D.D.-M. wrote the paper.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. *Matlab [CD-ROM]*; Version R2011b; The MathWorks Inc.: Natick, MA, USA, 2011.
2. The MathWorks Inc. WebSide. Available online: <http://es.mathworks.com/products/imaq/> (accessed on 26 September 2012).
3. MathWorks Inc. WebSide: Available online: <http://es.mathworks.com/products/image/> (accessed on 26 September 2012).
4. Otsu, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* **1975**, *11*, 23–27.
5. Haralick, R.M.; Shapiro, L.G. *Computer and Robot Vision, Vol. I*; Addison-Wesley Publishing Co., Inc.: Boston, MA, USA, 1991.
6. Blattner, R.; Classen, H.G.; Dehnert, H.; Döring, H.J. Experiments on isolated smooth muscle preparations. In *Biological Measuring Techniques*; Hugo Sach Elektronik: Freiburg, Germany, 1978; pp. 4–12.
7. Scarborough, N.L.; Carrier, G.O. Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. I. Role of extracellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *231*, 597–602.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



8. Lazareno, S.; Birdsall, N.J. Estimation of competitive antagonist affinity from functional inhibition curves using the Gaddum, Schild and Cheng-Prusoff equations. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109*, 1110–1119.
9. Cohen, M.L.; Wiley, K.S.; Slater, I.H. *In vitro* relaxation of arteries and veins by prazosin: Alpha-adrenergic blockade with no direct vasodilation. *Blood Vessels* **1979**, *16*, 144–154.
10. Doggrell, S.A. An analysis of the inhibitory effects of prazosin on the phenylephrine response curves of the rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1992**, *346*, 294–302.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Apéndice VIII

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

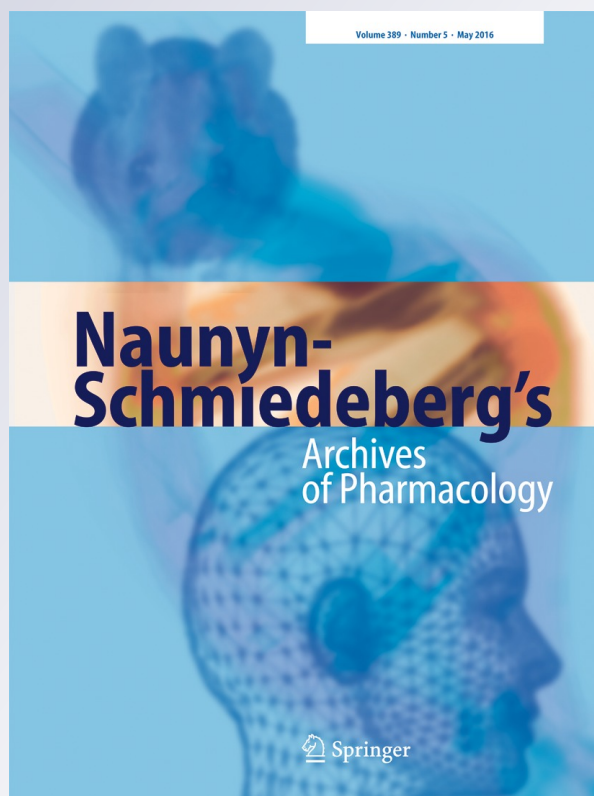
# Analyzing isolated blood vessel contraction in multi-well plates

**Ricardo Borges, David Díaz-Martín,  
José G. Hernández-Jiménez, Manuel  
Rodríguez-Valido & Beatriz Beltrán**

**Naunyn-Schmiedeberg's Archives of  
Pharmacology**

ISSN 0028-1298  
Volume 389  
Number 5

Naunyn-Schmiedeberg's Arch  
Pharmacol (2016) 389:521-528  
DOI 10.1007/s00210-016-1218-6



 Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



## ORIGINAL ARTICLE

# Analyzing isolated blood vessel contraction in multi-well plates

Ricardo Borges<sup>1</sup> · David Díaz-Martín<sup>2</sup> · José G. Hernández-Jiménez<sup>1</sup> · Manuel Rodríguez-Valido<sup>2</sup> · Beatriz Beltrán<sup>1</sup>Received: 9 November 2015 / Accepted: 8 February 2016 / Published online: 23 February 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Organ baths have been successfully used for over a century to study the contractile or relaxation effects of drugs. Indeed, most of our understanding of vascular pharmacology is based on such *in vitro* studies. However, multiple parallel organ baths that require mechanical transduction consume relatively large amounts of drugs, gases, and buffers, and they take up a considerable bench space. In addition, such experiments have a high demand in terms of cost and animals, and the tissue preparation is labor intensive and slow. For these reasons, organ baths are no longer in the front line of industrial pharmacological research and they have almost disappeared from most academic laboratories. We have developed a very simple system, which can be implemented virtually in any laboratory, for the automatic analyses of rat aorta ring contraction based on optical methods and using multi-well plates. Rat aorta rings ( $\approx 0.5$  mm wide) were situated in 96-multi-well plates, and the luminal vessel areas were continuously monitored using a USB camera driven by newly developed algorithms. Liquids were handled using multichannel pipettes, although these procedures can be automated for drug screening. The concentration-response curves obtained were similar to

those reported in the literature using traditional force transduction techniques on isolated tissues. This system can also be used with other tissue preparations and for simultaneous fluorescence measurements. The new system described here offers a simple, cheap, and reliable alternative to the classic organ bath system.

**Keywords** Aorta · Isolated tissues · Automation · *In vitro* contraction · Multi-well plate

## Abbreviations

MuWOB Multi-well organ bath

## Introduction

Contractile studies on isolated tissues have laid the foundations for our current understanding of how many drugs act on cardiovascular, digestive, or respiratory tracts (Borges et al. 1989b). Classical research was carried out in organ baths, immersing a piece of contractile tissue in a tempered physiological solution and connecting it to force or displacement transducers. With few modifications, these techniques continue to be used today, both in pharmaceutical laboratories and academia (Kenakin 2001).

Despite the indubitable value of this *in vitro* technique, the use of organ baths is slow, it requires a lot of bench space, it consumes moderate to large amounts of drugs, and it also requires a considerable number of trained staff. Typically, a tissue preparation is immersed in 4–50 mL of physiological tempered buffer gassed with oxygen, air, or other mixtures. The volume of buffer used means that the amount of drugs required for a standard pharmacological characterization falls in the range of tens of milligrams (Besse and Furchgott 1976),

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00210-016-1218-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ricardo Borges  
rborges@ull.es

<sup>1</sup> Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina and Instituto Universitario de BioOrgánica 'Antonio González', Universidad de La Laguna, 38071 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Física Fundamental y Experimental, Electrónica y Sistemas, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, Spain

Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

which is a limitation when drug availability is scarce. In addition, automation (when possible) is difficult and expensive. Isolated vascular tissues have been used often for drug testing, either as strips of rings, and rat aorta rings remain a fundamental preparation to assay vasoactive drugs (Borges et al. 1989a; Borges et al. 1989b; Nilsson 1984). Another important problem derived from the use of traditional organ bath is the mechanical damage caused by the threads or hooks for holding the pre-tensioned tissues, which commonly affects endothelial integrity and the smooth musculature.

In this paper, we describe the “multi-well organ bath” (MuWOB) that uses 96 multi-well plates and in which optical recordings can be made. This new approach can be used in contractile studies without the need for tissue pretension, and our experiments clearly demonstrate that it is a highly valuable tool for the pharmacological assay of both vasoconstrictors and vasodilators. Although most of the experiments presented here were conducted on aorta rings, we were also successful using tracheal rings to test bronchodilators. We demonstrate that the MuWOB we describe constitutes an alternative for either drug companies or basic research laboratories that want to perform rapid and reliable pharmacological studies on isolated tissues.

## Methods

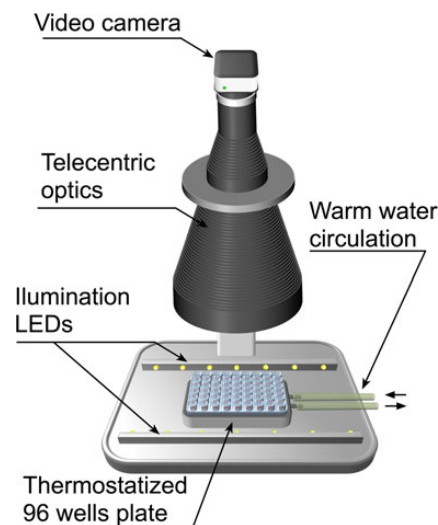
**Animals and tissues** All animal procedures were carried out in agreement with the institutional and national guidelines and regulations, and they were approved by the Ethical Committee at the University of La Laguna. Male Sprague-Dawley rats weighing about 250 g were anesthetized with ether and then sacrificed by cervical dislocation and their body wall was opened to carefully dissect out the aorta. The artery was then passed to a Petri dish filled with Krebs-HEPES solution (in mmol/L): NaCl 150; KCl 5; MgCl<sub>2</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2; glucose 11; HEPES 10 [pH 7.3] (NaOH). The tissue was carefully cleaned of the surrounding fat and connective tissue and emptied of blood clots. Around 50 arterial rings (≈0.5 mm in width) can be successfully obtained from one rat aorta using microsurgery scissors, taking care to preserve the endothelium intact (Furchgott and Zawadzki 1980). This means that two rats can produce enough material to fill a 96-well plate. Unless otherwise indicated, all the drugs used were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, San Louis, MI). A similar procedure was followed to prepare tracheal rings (Borges et al. 1989b).

Each of the wells was filled with Krebs-HEPES and each arterial ring was carefully placed into the wells, avoiding handling maneuvers that produce tissue deformation. Neither the aorta nor tracheal rings float but rather, they settle at the bottom of the wells. To be able to control the temperature, we modified a flat-bottom transparent 96-well plate (Nunc MaxiSorp, ThermoScientific, Madrid, Spain) by painting the

base black to enhance the contrast of the white tissue and then gluing it to a plastic base. In this way, a sealed chamber was formed that can be maintained at 37 °C by pumping water through the base from a heated water bath. Finally, led line lights were situated along both sides of the plate that can be used to illuminate the plate (Fig. 1).

**Monitoring contraction** The measuring device was remarkably simple. The chamber was placed and focused using either an USB video 10-Megapixel camera (Ueye UI-1490LE, IDS Imaging, Obersulm, Germany) or a standard reflex camera (Olympus E-420), placed ≈60 cm above the plate. The quality of recordings was largely improved using bi-telecentric lens (TC 23 172 Opto Engineering, Mantova, Italy), which eliminated most bright artifacts and corrected the optical perspective thus allowing the use of all wells with no distortions (Fig. 1).

In order to assess possible image distortion caused by the meniscus of the solution or the optical perspective, several control measurements were made using stainless steel calibrated and plastic rings. Bi-telecentric optics drastically reduced the distortion introduced by the perspective and meniscus. However, it was necessary to keep the volume of the liquid in the well constant in order to minimize the lens effect caused by the latter. Pictures were taken automatically using tailor-made software that triggers the camera through a USB connection. Images from all 96 artery rings were captured simultaneously and transferred to the computer for online or off-line analysis through the same USB connection. We have



**Fig. 1** Cartoon showing the USB video camera coupling to a telecentric lens taking sequential pictures of a 96-well plate situated in a temperature-controlled chamber. Illumination was provided from two parallel LEDs arrays

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

sampled successfully at 1 Hz, although usually such high-speed acquisition was not necessary.

Drugs were added to the wells using 8- or 12-multichannel pipettes, although liquid handled robots could also be used. The typical well volume was 100  $\mu$ L although  $\approx$ 50  $\mu$ L was sufficient to completely immerse the aorta ring. Rings did not float and they were partially stuck to the bottom of the well, probably by electrostatic forces. Prior to starting the experiments, the preparations were allowed to stabilize for 40 min, a period in which the Krebs-HEPES solution (100  $\mu$ L) was replaced two times. The drugs can then be added in an accumulative manner and/or washed out after an effect is achieved. In any case, the final liquid volume should be kept constant by previously removing the same amount of liquid to be added. Maintaining a constant volume is especially important when non-telecentric optics are used, as the water meniscus forms a lens that can distort measurements. Experiments were carried out following several protocols to analyze agonists or antagonist, and/or by combining rings from several animals, permitting us to successfully obtain very reproducible concentration-response curves with as little as  $n = 8$ . The day-to-day variation, assessed with Pearson's coefficient, was less than 6 %.

Preliminary experiments were performed to establish the intervals for drug application as 30 min for contracting agents and 15 min for relaxing drugs. These times were those required to reach the maximum contraction/relaxation, and they were longer than those observed in the preloaded arteries, where 5–10-min intervals were used.

**Acquisition and analysis software** The MuWOB software application is user friendly (Supplemental Software application and Supplemental Figure 1), and it has been designed to allow calibration and control of the camera, as well as for data acquisition and processing. We developed an algorithm for image processing and analysis, which is written in MATLAB<sup>®</sup> (MathWorks, Natick, MA) and that is based on photogrammetry and computer visualization techniques that are orientated towards the detection and recognition of objects. The description of the sequential algorithm for the recognition of rings and the method used to measure the areas are described in the Supplemental material (Recognition and measurement algorithm and Supplemental Figure 2). This program can be supplied free upon request.

Prior to starting the experiment, the software calibrated the camera in order to calculate the characteristic parameters of the camera (focal distance, translational and rotational vectors, and correcting parameters). This process also located the position of three given wells in order to determine the central pixel in each well.

Once the user has configured the setup, the system identified the luminal rings and assessed the evolution of this area from a set of images (Fig. 2). The software sequentially (i)

took a multi-well plate picture (Fig. 2a); (ii) divided the picture into multiple individual well images (Fig. 2b); (iii) removed the color, improving the appearance of the tissue rings by eliminating bubbles, reflections, and excessive brightness (Fig. 2c); (iv) converted the grey-scale image to black and white (Fig. 2d); and (v) localized the aorta ring and extracts the luminal area (Fig. 2e–f).

The luminal area was quantified through the number of pixels, and each measure was normalized to the initial value, carrying out the same procedure simultaneously in all wells. The displacement of the tissues within the wells (as for instance caused by drug application) was resolved by the new location in each round of measurements. The system returned online measurements of the pixel area, which were easily converted to surface units.

The nonlinear regression to obtain the  $EC_{50}$  or  $IC_{50}$ , or for graphical representation, was adjusted to a four-parameter logistic equation. In the event that it conformed to another equation, this is indicated in the corresponding experiment. In all cases, the regression fit ( $R^2$ ) and significance of the ANOVA ( $P$ ) are indicated. The  $EC_{50}$  or  $IC_{50}$  was expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD), obtained using BioData Fit 1.02 (Chang Bioscience, Castro Valley, CA, USA).

## Results

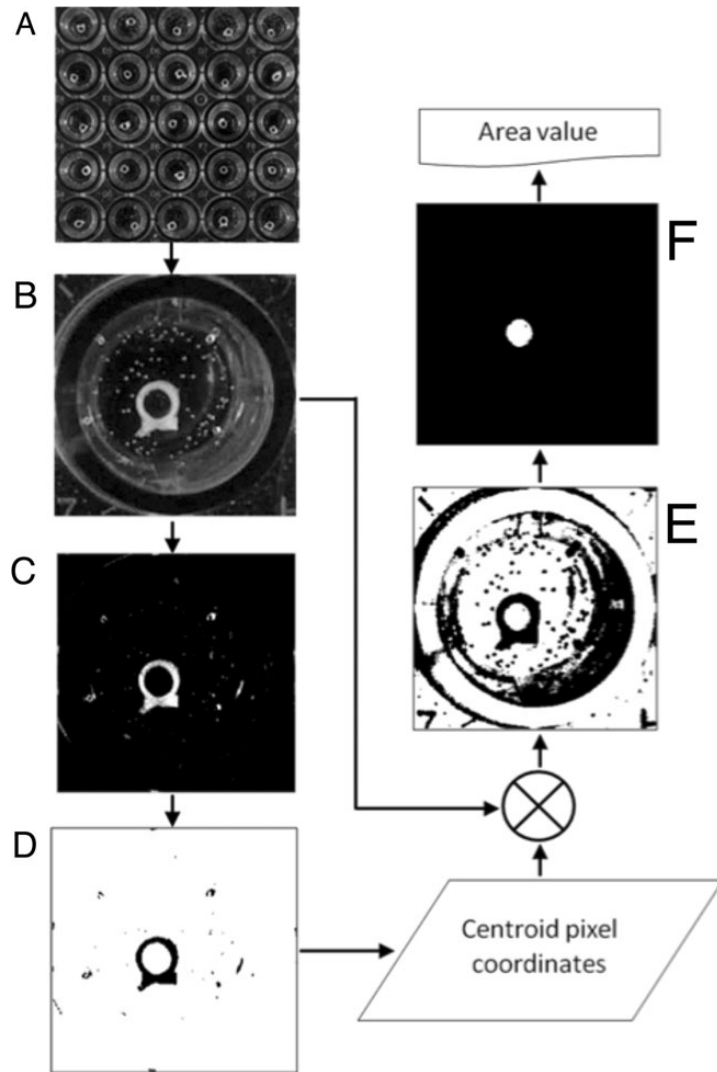
To demonstrate the utility of the MuWOB, we have carried out a series of standard experiments, including one to establish the concentration-response curve of a given agonist. Once stabilized, a typical run to obtain concentration-response curves (using eight rings), for instance in the cumulative concentration-response of phenylephrine, took less than 3 h (Fig. 3). This means that 12 different concentration-response curves can be performed in parallel using a single 96-well plate. To reduce any problems that might be derived from taking all the data from a single animal, we usually fill the plate with rings that are taken randomly from three to six animals.

These experiments were first performed in accordance with our previous experience with traditional techniques and systems, testing a new drug concentration every 5–7 min. However, we noticed that tissues continued contracting/relaxing for a longer period of time, probably due to the lack of pretension, and hence, the interval between drug applications had to be extended. However, no desensitization was observed as the maximum contraction was roughly the same when a concentration-response curve was generated and when the maximal concentration was applied from the outset.

The  $EC_{50}$  for phenylephrine ( $169.5 \pm 31.3$  nM), as well as the displacement of the concentration-response curves to the right caused by the  $\alpha_1$  antagonist prazosin, was in the nanomole range, similar to that described in classical organ baths (Scarborough and Carrier 1984a). Using the Gaddum

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

**Fig. 2** Description of the procedure for optical MuWOB measurement. **a** Upper view of aorta rings situated in the wells. **b–f** Procedure to quantify the luminal surface of the vessel (See supplemental Recognition and measurement algorithm)



transformation (Lazareno and Birdsall 1993), the  $K_i$  for prazosin was 29 pM, which is similar to that found using a standard organ bath in our laboratory and elsewhere (Cohen et al. 1979; Doggrell 1992; Scarborough and Carrier 1984a). Note that the vessel lumen cannot be completely occluded and that the maximal reduction observed was  $\approx 30\%$  with norepinephrine, phenylephrine (1  $\mu\text{M}$ ), or KCl (70 mM).

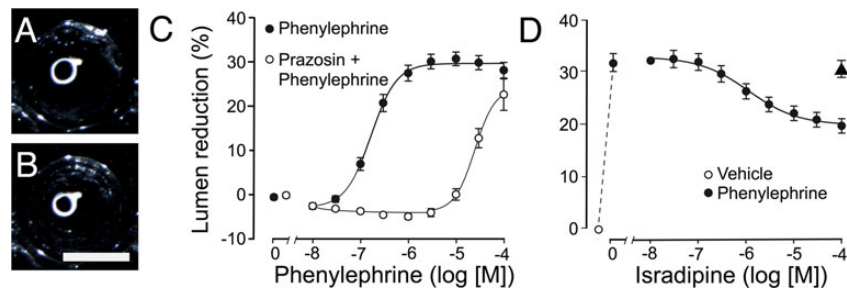
We extended the characterization of the MuWOB by studying two well-known vasodilators on precontracted arteries, using either phenylephrine or KCl as vasoconstrictors. Isradipine is a potent dihydropyridine that blocks L-type calcium channels and, as expected, isradipine potently inhibited high  $K^+$ -induced constriction ( $IC_{50} \approx 18 \pm 2.8$  nM), as it requires external calcium to promote contraction. Isradipine was

however a weak relaxing agent when contraction was triggered with an  $\alpha_1$  agonist like phenylephrine, as this agent also mobilized intracellular  $Ca^{2+}$  (Scarborough and Carrier 1984b). Using MuWOB, maximal concentrations of isradipine produced a modest ( $\approx 30\%$ ) dilatation of phenylephrine-precontracted tissues (Fig. 3d). Other vasodilators such as the NO donor sodium nitroprusside (SNP) can reverse the constriction elicited by either high  $K^+$  (Fig. 4a) or phenylephrine (Fig. 4b) in a concentration-dependent manner (Venturini et al. 1993). As expected, the potency of SNP on phenylephrine-evoked responses was much higher than on high  $K^+$ -depolarizing stimuli.

The functional response of arteries to the contraction elicited by phenylephrine over 8 h was tested using resting rings. In the

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59





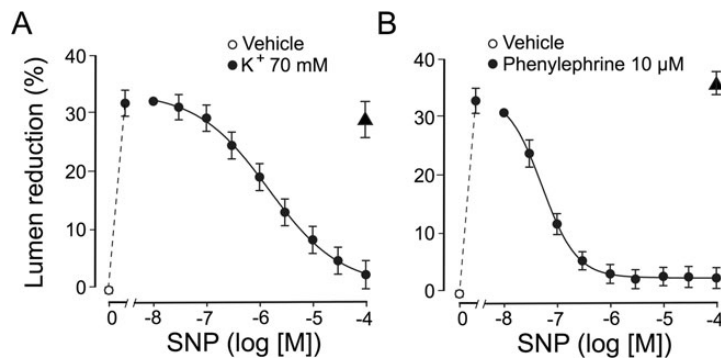
**Fig. 3** Concentration-response curve for the  $\alpha_1$  adrenergic agonist phenylephrine obtained using MuWOB. **a** Image captured with telecentric optics of an aorta ring in resting conditions and **b** the same tissue 10 min after the addition of 1  $\mu$ M phenylephrine. **c** Average measurements (mean  $\pm$  SEM) taken from aorta rings in resting conditions (0, no drugs added); in the presence of increasing concentrations of the  $\alpha_1$  agonist phenylephrine (filled circles;  $EC_{50} = 171.1 \pm 31.2$  nM (mean  $\pm$  SD);  $R^2 = 0.996$  ANOVA,  $P < 0.0001$ ) or phenylephrine and the presence of the  $\alpha_1$  antagonist prazosin (10 nM,  $EC_{50} = 59.8 \pm 1.0$   $\mu$ M;  $R^2 = 0.957$ , ANOVA

$P = 0.0008$ , open circles,  $n = 8$  rings for each condition). The  $R_{max}$  for phenylephrine was 29.6 %. Phenylephrine was applied cumulatively every 15 min. **d** Arteries were contracted with 10  $\mu$ M phenylephrine (dashed line); once stabilized, cumulative concentrations of the calcium antagonist isradipine were added every 10 min. ( $IC_{50} = 1.2 \pm 0.3$   $\mu$ M;  $R^2 = 0.994$ ; ANOVA,  $P < 0.0001$ ). Note that the contractile responses are represented as a reduction in the luminal area. Tissues were taken randomly from at least three different rats. The filled triangles show the contraction observed at the end of the experiments in aorta rings not exposed to isradipine

MuWOB, the full effect of phenylephrine was elicited even after 8 h, suggesting that the general architecture of the arterial rings was preserved. Moreover, the morphology of the rings was not apparently altered, even after 8 h (Figure 3 SM). To check whether the endothelium was functional, we repeated the classical experiment of Furchgott and Zawadzki (1980)). Figure 4A of SM shows that the contraction caused by 20 nM of norepinephrine was completely reverted by acetylcholine reaching the maximum effect at 100 nM.

However, when larger concentrations of the  $\alpha$ -adrenergic agent phenylephrine were used for precontracting the rings, the endothelial production of NO elicited by acetylcholine only partially reverted this contraction (by  $\approx 70$  %; Figure 4B SM), indicating that, in our hands, the endothelium is at least partially functional. Seventeen arterial rings were precontracted with

phenylephrine (300 nM), which reduced the luminal area by 21 %. Once stabilized, nine rings were incubated with cumulative concentrations of acetylcholine while eight received no drug (controls). These data are consistent with previous data obtained from this preparation in traditional systems (Avendano et al. 2014; Blanco-Rivero et al. 2005; Martinez-Revelles et al. 2013; Wiggers et al. 2008). However, other authors reported an almost complete (90–95 %) relaxation of aorta by acetylcholine (Weir et al. 1991). In order to know whether the cause of these discrepancies was produced by the MuWOB technique or by our cutting method, we reproduced this experimental protocol in parallel experiments using the traditional organ bath. In classical isometric recordings on aorta rings preloaded with 1 g, the  $E_{max}$  for ACh was  $88.3 \pm 9.1$  % and the  $IC_{50}$  was 0.93  $\mu$ M.



**Fig. 4** Arterial relaxation in response to cumulative concentrations of sodium nitroprusside (SNP). **a** Arteries were contracted with isotonic KCl 70 mM (dashed line); once stabilized, cumulative concentration of SNP were added every 10 min.  $IC_{50} = 1.4 \pm 0.4$   $\mu$ M (mean  $\pm$  SD);  $R^2 = 0.999$ ; ANOVA,  $P < 0.0001$ . **b** As in **a** but arteries were

precontracted with 10  $\mu$ M phenylephrine.  $n = 8$ –12 artery rings.  $IC_{50} = 58.4 \pm 5.6$  nM;  $R^2 = 0.999$ ; ANOVA,  $P < 0.0001$ . Tissues were taken randomly from at least five different rats. The filled triangles show the contractions observed at the end of experiments in aorta rings not exposed to SNP

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

We also assessed rabbit aorta rings in the MuWOB, obtaining similar results to those found with traditional organ baths (not shown).

The MuWOB can be used for high throughput screening, as seen when a simultaneous assay of 30 drugs was performed (Figure 4 and Table 1 of the Supplemental material). We have assigned an arbitrary color scale for more rapid quantification, as is more usual when using plate readers for high-throughput analyses. In this example, we incubated the arteries with drugs and we monitored their effect on the area of the rings, thereafter examining the effects on phenylephrine-induced contraction. In basal conditions, we did not observe any significant changes in the area of the rings (experiments performed in triplicate). By contrast, several drugs altered the contractility evoked by phenylephrine, enhancing (suramin, AF1†, ITH2001†, dopamine, ouabain, antranolol†, and RCTM-7†) or dampening (acetylcholine, caffeine, prazosin, sodium nitroprusside, NF1-56†, and yohimbine) these contractions (†, in italics in Table 1 SM are compounds from our drug collection). Note that most of these drugs were used at a concentration of 10  $\mu$ M, above the usual range.

Although the main part of this paper describes the use of MuWOB on arteries, this technique may also be very useful for trachea, a promising preparation to assay bronchodilators. For example, we studied the contractile effect of the muscarinic agonist methacholine (acetyl- $\beta$ -methyl choline) on rat trachea rings (Fig. 5). The pharmacological profile of the concentration-response curve overlaps that found using the traditional organ bath with force transducers and the  $EC_{50}$  is  $\approx 1.4 \pm 0.3 \mu$ M, comparable to that described in the literature (Table 2 SM). In addition, the limited shortening of the tracheal muscle usually requires four to six rings to be tied together, thereby forming a chain to increase the shortening distance and to overcome the auxotonic component of isometric transducers (Castillo and De Beer 1947; Narumiya and Toda 1985). This latter procedure largely improves the quality of recordings but it also increases the demand on animals.

Plate readers have been successfully used for high throughput screening to analyze the effects of drugs on immobilized enzymes or cultured cells, either using photometry, fluorescence, or luminescence detection. However, to our knowledge, this is the first description of a system that provides a direct functional assay of the effect of drugs on smooth muscle activity in a multi-well plate.

## Discussion

We introduce here a new system that can be employed to study the effects of drugs on some smooth muscle preparations. Although for this demonstration most of the experiments shown were performed on rat aorta rings, we also successfully used rat trachea and rabbit aortas. The MuWOB setup is very

easy to implement, and it can be used for drug screening or basic research, both in pharmaceutical companies or academic laboratories.

Studies of contraction in isolated tissue have traditionally been carried out in organ baths, which require a special glass device (or organ bath) in which the tissue is immersed in a physiological solution (typically 4–50 mL, (Borges et al. 1989b; Kenakin 2001). The organ bath unit has liquid handling valves incorporated into its design to exchange the physiological solutions, and it is usually temperature controlled by immersion in a water bath or by pumping warm water to a jacked organ bath. The system also incorporates a tissue holder and aeration system. To record contraction, the tissue must be coupled to isometric or isotonic transducers, which must in turn be connected to a Wheatstone's bridge and an amplifier that is connected to a recording device. In order to carry out parallel experiments, pharmacologists must multiply the organ bath units, which increases the bench space required and the costs incurred. For instance, our system for a parallel organ bath for 16 isolated tissues takes about 4 m of bench and cost  $\approx$ \$45,000. By scaling this to 96 preparations, the cost would be  $\approx$ \$270,000, whereas our 96-well MuWOB costs a mere  $\approx$ \$3800.

Methods to measure smooth muscle contraction in the absence of loading tension have been validated previously in lung slices (Perez and Sanderson 2005a; Perez and Sanderson 2005b). These approaches used a similar method to estimate the luminal areas under the microscope by observing the microvasculature. This technique is extremely interesting as it can combine observations in arterioles and bronchioles, although it is not suitable for drug screening. Other methods have been developed that mimic the physiological radial tension evident in vivo, like perfused kidneys (Borges et al. 1989a), perfused renal arteries (Hrdina et al. 1967), or using pressure myographs (Falloon and Heagerty 1994). However, the sensitivity of these preparations to adrenergic agonists does not always overlap with that reported using isometric transduction.

Our main initial concern was the lack of a defined preload tension in the MuWOB. However, aorta tissue develops enough rheological resistance against either constriction or dilation, which allows its reaction to drugs to be observed in the same way as it is with standard procedures. Moreover, as we do not require mechanical tension for transducer recordings, our system does not need to use threads/hooks to record the changes in tension. This is crucial in vascular tissues, as the function of the endothelium is well preserved in our hands. In any case, any doubts we might have had were relieved by the functional responses. All the drugs tested (vasoconstrictors, vasodilators, agonists, and antagonists) behaved in the same way as in traditional systems (See Table 2 SM). Moreover, our studies with MuWOB defined similar values for quantitative parameters ( $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , etc.) as those already reported using force or torque transducers.

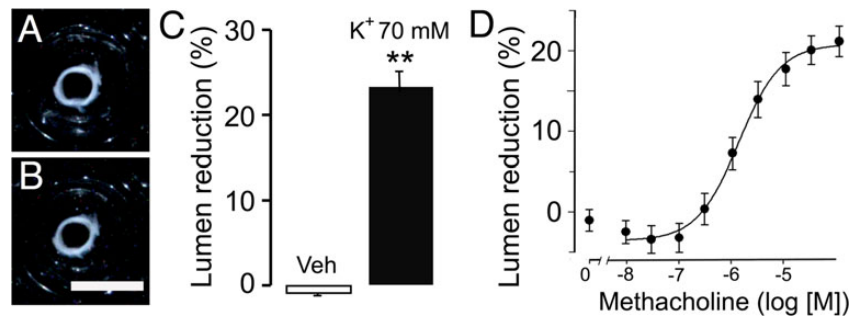
 Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59



**Fig. 5** MuWOB can be also used for other tissues such as rat trachea. Experiments were conducted as in Fig. 3 of the paper. **a** Image captured with telecentric optic of a trachea ring in resting conditions and **b** the same tissue 10 min after the incubation in isotonic 70 mM K<sup>+</sup>. **c** Average measurements (mean ± SEM) taken from tissues in resting conditions (vehicle (*Veh*), *open bar*) or isotonic high potassium (K<sup>+</sup> 70 mM). **d**

Concentration-response curve (0, no drugs added) in the presence of cumulative concentrations of the muscarinic agonist methacholine (*filled circles*; EC<sub>50</sub> = 1.4 ± 0.3 μM; R<sup>2</sup> = 0.997; ANOVA, P < 0.0001; n = 8 rings for each condition). Note that the contractile responses are represented as a reduction in the luminal area. Tissues were taken randomly from at least four different rats

Although MuWOB cannot currently be used for all classical organ bath applications, given that striated muscle like heart or skeletal tissues might require strong oxygenation and electrical stimulation, it is clear that multi-well systems possess several important advantages that open possibilities for the development of new applications. In a limited number of experiments, we successfully tested tissues obtained from a local slaughterhouse (bovine mesenteric arteries), as well as rings obtained from rabbit aorta (not shown). However, we were not successful with other preparations like rings from rat intestine as their lumen rapidly occludes. Our studies using rat trachea rings are very promising, particularly since classical preparations usually require a few rings to form a chain in order to get reliable recordings (Narumiya and Toda 1985), meaning a higher demand in terms of animals and time. Conversely, eight tracheal rings for individual analyses can be obtained from a single rat with MuWOB, providing similar results to those obtained in a traditional organ bath. As a result MuWOB is an extremely promising means to study bronchodilators. Another difference between MuWOB and traditional

systems is the time required to reach the maximum contraction/relaxation. It is plausible that this parameter can limit the observation of fine phenomena, such as the transient Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores mediated by IP<sub>3</sub>. However, we are currently working in implementing a system to simultaneously monitor Ca<sup>2+</sup> using Oregon Green®.

The MuWOB can clearly be used to analyze contraction in a large number of tissues and for instance, from the thoracic portion of the aorta, we get usually ≈20 rings (0.5–1-mm sections from each artery). However, it is important to distinguish between *n* (number of duplicates) and *N* (number of animals), and to avoid oversampling, rings from a given animal can be used in parallel experiments. Indeed, we usually load several plates by taking the rings obtained from different animals randomly.

Robotic handling procedures, like those already been designed for multi-well plates, can be incorporated into the MuWOB system, such as liquid handling, fluorescence or luminescence measurement, and multi-plate processing. This means that isolated tissues will now be suitable for high

**Table 1** Comparison with conventional, isolated tissue preparations

	Conventional organ bath	MuWOB
Estimated time required to prepare 96 samples	≈10 h	30 min
Volume of buffer/per tissue	4–20 mL	50–200 μL
Drug consumption (dose-response curve for phenylephrine, n = 8)	≈1 mg	≈15 μg
Optimization of animal resources (Minimum ring thickness)	2 mm	≈0.5 mm
Gases	O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	Not required
Bench space required	Few meters	60 cm
Portability	Not possible	Easy
Automation	Difficult or not possible	Robotic systems
Pretension	Yes	No
Cost	High	Low

Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

throughput screening. Figure 5 SM and Table 1 SM of the Supplemental material show an example of the simultaneous assay of 30 drugs in which we assign an arbitrary color scale for rapid quantification. In this way, a large number of drugs can be screened for either vasodilation/contraction or to identify those that affect bronchial contractility. Although plate readers have been successively used to analyze drug effects on immobilized enzymes or cultured cells for high throughput screening, to our knowledge, this is the first description of a system that provides a direct assay of the effect of drugs on smooth muscle activity in a multi-well plate.

MuWOB is cheap to implement, as it does not involve the use of force/displacement equipment, it takes up little bench space ( $\approx 60$  cm) and, in addition, it reduces the number of animals, as well as the amount of drugs and buffers, with the associated savings in cost. This is of a particular interest for laboratories that want to perform experiments of tissue contraction but that lack the appropriate equipment. Also, MuWOB will maximize experiments when animal material is limited, such as for spontaneous hypertensive rats (SHR), old animals, or those receiving chronic treatments. Using the high-resolution cameras currently available along with MuWOB, it may even prove to be a useful system to study mouse aortas (even using 384-well plates), which could interestingly extend its use to genetically modified mice (with all the benefits that this entails). The main advantages when compared with classical organ bath methods are resumed in the Table 1.

**Acknowledgments** We thank M.S. Montesinos, S. Gortázar, and A. Casajuana for their collaboration in the initial implementation of the technique. L. Castañeyra performed the histological study of Figure 4 of SM. This work was supported in part by a Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2010-15822) and CONSOLIDER (CSD2008-00005) to R. Borges.

**Author's contributions** RB conceived and designed the experiments. JGHJ and BB performed the experiments. DD and MRV designed and implemented the software for the acquisition and analysis of data.

**Compliance with ethical standards** All animal procedures were carried out in agreement with the institutional and national guidelines and regulations, and they were approved by the Ethical Committee at the University of La Laguna.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Avendano MS et al. (2014) Increased nitric oxide bioavailability in adult GRK2 hemizygous mice protects against angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 63:369–375. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01991
- Besse JC, Furchgott RF (1976) Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. *J Pharmacol Exper Ther* 197:66–78
- Blanco-Rivero J et al. (2005) Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 46:107–112. doi:10.1161/01.HYP.0000171479.36880.17
- Borges R, Carter DV, von Grafenstein H, Halliday J, DE K (1989a) Ionic requirements of the endothelin response in aorta and portal vein. *Circ Res* 65:265–271
- Borges R, von Grafenstein H, DE K (1989b) Tissue selectivity of endothelin. *Eur J Pharmacol* 165:223–230
- Castillo JC, De Beer EJ (1947) The tracheal chain; a preparation for the study of antispasmodics with particular reference to bronchodilator drugs. *J Pharmacol Exper Ther* 90:104–109
- Cohen ML, Wiley KS, IH S (1979) In vitro relaxation of arteries and veins by prazosin: alpha-adrenergic blockade with no direct vasodilation. *Blood Vessels* 16:144–154
- Doggrell SA (1992) An analysis of the inhibitory effects of prazosin on the phenylephrine response curves of the rat aorta Naunyn-Schmiedeberg's. *Arch Pharmacol* 346:294–302
- Falloon BJ, Heagerty AM (1994) In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension* 24:16–23
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376
- Hrdina P, Bonaccorsi A, Garattini S (1967) Pharmacological studies on isolated and perfused rat renal arteries. *Eur J Pharmacol* 1:99–108
- Kenakin T (2001) Isolated blood vessel assay. *Curr Prot Pharmacol*, vol 00:4. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ pp 4.1–4.11 doi: 10.1002/0471141755.ph0404s00
- Lazareno S, Birdsall NJ (1993) Estimation of competitive antagonist affinity from functional inhibition curves using the Gaddum Schild and Cheng-Prusoff equations. *Brit J Pharmacol* 109:1110–1119
- Martinez-Revelles S et al. (2013) Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Res Sign* 18:51–65. doi:10.1089/ars.2011.4335
- Narumiya S, Toda N (1985) Different responsiveness of prostaglandin D2-sensitive systems to prostaglandin D2 and its analogues. *Brit J Pharmacol* 85:367–375
- Nilsson H (1984) Different nerve responses in consecutive sections of the arterial system. *Acta Physiol Scand* 121:353–361
- Perez JF, Sanderson MJ (2005a) The contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary arterioles is determined by the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by 5-HT and KCl. *J Gen Physiol* 125:555–567. doi:10.1085/jgp.200409217
- Perez JF, Sanderson MJ (2005b) The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *J Gen Physiol* 125:535–553. doi:10.1085/jgp.200409216
- Scarborough NL, Carrier GO (1984a) Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. I. role of extracellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction. *J Pharmacol Exper Ther* 231:597–602
- Scarborough NL, Carrier GO (1984b) Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. II. role of extracellular calcium in enhanced alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction in diabetes. *J Pharmacol Exper Ther* 231:603–609
- Venturini CM, Palmer RM, Moncada S (1993) Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide. *J Pharmacol Exper Ther* 266:1497–1500
- Weir CJ, Gibson IF, Martin W (1991) Effects of metabolic inhibitors on endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of rat and rabbit aorta. *Brit J Pharmacol* 102:162–166
- Wiggers GA et al. (2008) Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol* 295:H1033–H1043. doi:10.1152/ajpheart.00430.2008

 Springer

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

# Apéndice IX

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

Nº SOLICITUD 201000640  
Nº PUBLICACIÓN ES2390961  
TITULAR/ES  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

FECHA EXPEDICIÓN 09/06/2014

**CERTIFICADO-TÍTULO  
DE  
PATENTE DE INVENCION**

Cumplidos los requisitos previstos en la vigente Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes, se expide el presente CERTIFICADO-TÍTULO, acreditativo de la concesión de la Patente de Invención. Ha sido tramitada y concedida con realización del Informe sobre el Estado de la Técnica y **con examen previo** de los requisitos sustantivos de patentabilidad.

Se otorga al titular un derecho de exclusiva en todo el territorio nacional, bajo las condiciones y con las limitaciones previstas en la Ley de Patentes. La duración de la patente será de **veinte años** contados a partir del 15/07/2010.

La patente se concede sin perjuicio de tercero y sin garantía del Estado en cuanto a la validez y a la utilidad del objeto sobre el que recae.

Para mantener en vigor la patente concedida, deberán abonarse las tasas anuales establecidas, que se pagarán por años adelantados. Asimismo, deberá explotarse el objeto de la invención, bien por su titular o por medio de persona autorizada de acuerdo con el sistema de licencias previsto legalmente, dentro del plazo de cuatro años a partir de la fecha de solicitud de la patente, o de tres años desde la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial.



Fdo.: Ana María Redondo Mínguez  
El Director del Departamento de Patentes e Información Tecnológica P.D. El Jefe de Servicio de Actuaciones Administrativas



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por:	Fecha:
DAVID DIAZ MARTIN UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:20:25
RICARDO BORGES JURADO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 14:34:34
MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 16:48:37
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	05/07/2017 16:35:59

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 390 961**

21) Número de solicitud: 201000640

51) Int. Cl.:

**G01N 33/483** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22) Fecha de presentación:

**15.07.2010**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**20.11.2012**

Fecha de la concesión:

**31.01.2014**

45) Fecha de publicación de la concesión:

**07.02.2014**

73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
OTRLEDFICIO CENTRAL, DELGADO BARRETO  
S/N  
38201 LA LAGUNA (Tenerife) ES**

72) Inventor/es:

**BORGES JURADO, Ricardo;  
RODRIGUEZ VALIDO, Manuel;  
MACHADO PONCE, Jose David;  
BELTRAN BAUTE, Beatriz;  
SUAREZ MONTESINOS, Monica;  
DIAZ MARTIN, David y  
GONZALEZ MORALEZ, Yezer**

54) Título: **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACION MULTIPLE Y SIMULTANEA DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DE SUSTANCIAS FARMACOLOGICAS MEDIANTE METODOS OPTICOS**

57) Resumen:

Dispositivo para la evaluación múltiple y simultánea de la actividad contráctil de sustancias farmacológicas mediante métodos ópticos caracterizados por el uso de placas multi-pocillo o equivalentes, un módulo de adquisición digital de imágenes para la monitorización y cuantificación de la actividad farmacológica. Las preparaciones están termostalizadas y el sistema incorpora el procesado mediante algoritmos que permiten la cuantificación de la actividad contráctil de forma simultánea.

A diferencia de los métodos al uso, no requiere de transductores de fuerza o de desplazamiento para la cuantificación de la actividad contráctil. Su aplicación reduce de forma drástica el tiempo requerido para la obtención de resultados.

**ES 2 390 961 B1**

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 969032

Código de verificación: 3HhmTPSD

Firmado por: DAVID DIAZ MARTIN

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 28/06/2017 14:20:25

RICARDO BORGES JURADO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 14:34:34

MANUEL JESUS RODRIGUEZ VALIDO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 16:48:37

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

05/07/2017 16:35:59