

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Aeroespacial

Prototipo de sistema de perfusión de crioprotector controlada para criopreservación de órganos

Autor: María del Carmen Ortiz Serrano

Tutor: Dr. Ramón Risco Delgado

Dep. Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2015



Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería Aeroespacial

Prototipo de sistema de perfusión de crioprotector controlada para criopreservación de órganos

Autor:

María del Carmen Ortiz Serrano

Tutor:

Dr. Ramón Risco Delgado

Profesor titular

Dep. de Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla
Sevilla, 2015

Trabajo Fin de Grado: Prototipo de sistema de perfusión de crioprotector controlada para criopreservación de órganos

Autor: María del Carmen Ortiz Serrano

Tutor: Ramón Risco Delgado

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2013

El Secretario del Tribunal

Índice de contenidos

1. Introducción	11
1.1 Criopreservación	11
1.2 Crioprotector	12
1.3 Vitrificación	12
2. Objetivos del trabajo	13
3. Descripción del trabajo	15
3.1. Agente crioprotector.....	15
3.2. Protocolos	16
3.3. Sistema de perfusión.....	18
3.4. Bombas peristálticas	20
3.5. Tarjeta de Adquisición de Datos	22
3.6. Software.....	23
3.7. Sistema de succión.....	30
4. Conclusiones	31
5. Anexos.....	33
5.1. Instalación del Labview	33
5.2. Instalación del software de la tarjeta.....	36
5.3. Instalación y calibración de la tarjeta de adquisición de datos.....	41
5.4. Hojas de Cálculo utilizadas por el Programa.....	42
6. Bibliografía	55

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo es proporcionar al Equipo de investigación de la Escuela de Ingenieros de la Universidad de Sevilla y el CNA las herramientas necesarias para hacer un estudio sobre cómo se extiende el crioprotector dimetilsulfóxido en los órganos de animales, mediante la utilización del TAC (Tomografía Axial Computerizada por Rayos X).

En primer lugar, se presentan unas nociones básicas sobre la criocongelación y, a continuación, se describe el trabajo realizado propiamente dicho.

1.1 Criopreservación

La criopreservación o criocongelación es un proceso por el cual se congelan células y tejidos con el fin de la preservación de las mismas.

Se basa en el hecho de que a muy bajas temperaturas los procesos vitales disminuyen, quedando la vida “en suspensión”.

Las células y los tejidos criocongelados mantienen latentes sus propiedades vitales y son viables para poder ser usadas tras la descongelación posterior.

Este hecho resulta muy útil en la investigación y aplicaciones médicas, por lo que las células y los tejidos criocongelados se conservan en unos bancos creados al efecto, para su uso posterior.

Actualmente ya es un hecho la preservación de células y tejidos mediante el proceso de la criocongelación; sin embargo, aún no se ha conseguido aplicar el procedimiento con éxito a órganos completos.

Lo que impide que dé resultados en los órganos es la formación de hielo inherente al proceso de criopreservación por las razones que se exponen a continuación.

Durante la congelación, el agua, componente principal de cualquier sistema vivo, cristaliza aleatoriamente por la parte extracelular; así, conviven dos estados diferentes del agua en una misma célula: la que aún está líquida por la zona intracelular y el hielo que se forma en la extracelular. Al disminuir la cantidad de agua líquida, aumenta la concentración de sales disueltas en ella y esto produce un desequilibrio osmótico en la célula. Este desequilibrio creado entre el medio intracelular y el extracelular provoca la deshidratación de la célula, comprometiendo así su viabilidad futura.

La formación de hielo puede darse tanto durante el procedimiento de enfriamiento como durante el de calentamiento.

Otro efecto perjudicial de la transformación del agua en hielo es que el agua congelada ocupa más volumen que en estado líquido y este aumento de volumen del agua provoca que los cristales que se formen, distribuidos aleatoriamente, al expandirse presionen sobre las células y generen sobre ellas un daño mecánico que causa planos de fractura en la estructura interna de la célula y esto la hace inservible para su uso posterior.

Para evitar la formación de hielo durante el enfriamiento se usan los llamados crioprotectores. Estos agentes sustituyen al agua de la célula y consiguen mantener el equilibrio osmótico en ella.

La presencia de estos compuestos es efectiva con células aisladas o agrupadas en un tejido, pero no así cuando se trata de órganos; esto ocurre principalmente por dos razones.

La primera es que la arquitectura interna de los órganos es más compleja y por tanto mayor el daño que se produce por la formación de cristales de hielo, ya que estos cristales se forman en los espacios entre las células y destruyen las estructuras extracelulares que las mantienen unidas formando el órgano.

La segunda razón es que cada tipo de célula tiene sus propios requerimientos de criopreservación óptima y no todas responden por igual a todos los crioprotectores. Y dado que en los órganos hay diferentes

tipos de células, cuando se aplica un determinado crioprotector a un órgano, se está limitando la recuperación de las células que lo forman al estarse imponiendo un único protocolo para todas.

1.2 Crioprotector

Los crioprotectores son soluciones anticongelantes que evitan o reducen la formación de hielo durante el proceso de congelación y descongelación de las células.

El uso de crioprotectores tiene un inconveniente y es que a temperatura ambiente son tóxicos, por lo que se deben respetar unas tasas mínimas de enfriamiento y cantidad de esta sustancia, de forma que a menor temperatura se puede utilizar mayor cantidad del producto.

Uno de los principales problemas a la hora de encontrar un buen protocolo de aplicación del procedimiento de crioprotección es el desconocimiento de saber qué cantidad utilizar, cómo entra y cómo se extiende el crioprotector cuando se introduce en el órgano.

1.3 Vitrificación

Es una forma de evitar la formación de hielo y, como consecuencia, el daño que ésta produce durante el proceso de criocongelación.

Este método consiste en enfriar el órgano hasta que éste pasa a un estado denominado “estado vítreo”, que es un estado de sólido amorfo libre de hielo.

Cuando se trata de preservar órganos grandes, la vitrificación plantea algunos desafíos. Para empezar, se necesitan altas concentraciones de crioprotectores (por lo menos cinco veces mayores que en un enfriamiento lento convencional) que pueden envenenar las células y los tejidos que supuestamente deben proteger.

El precursor de este método fue Greg Fahy, que en 2002 vitrificó el riñón de un conejo, manteniéndolo por debajo de la temperatura de transición vítrea de -122 grados centígrados durante 10 minutos, antes de descongelarlo y trasplantarlo a un conejo que vivió durante 48 días antes de que fuera sacrificado para examinarlo.

Pero el riñón no funcionó tan bien como una versión sana, principalmente debido a que una parte concreta, la médula, tardaba más que el resto en absorber la solución crioprotectora, lo que supuso que se formara una pequeña cantidad de hielo en ella durante el procedimiento de descongelación.

El problema se agrava con los tejidos más grandes porque requieren más tiempo para cargar los compuestos, lo que significa tiempos de enfriamiento más lentos y más oportunidades de que se produzca la exposición tóxica. Con la dificultad añadida de que tanto si el enfriamiento es demasiado rápido como si se alcanzan temperaturas demasiado bajas, aumenta la probabilidad de que aparezcan grietas.

Este proceso de calentamiento es extremadamente delicado no sólo por la importancia de la rapidez de calentamiento del espécimen durante el proceso de vitrificación, sino también porque debe hacerse de forma suficientemente uniforme; en caso contrario la vidriosidad podría dar paso a la cristalización, un proceso conocido como desvitrificación y, de nuevo aumenta la posibilidad de producirse el agrietamiento.

Por tanto, los factores limitantes durante el procedimiento de vitrificación son la rapidez y la uniformidad con las que se puedan descongelar los órganos; y eso es debido a que el calentamiento se realiza generalmente de afuera hacia adentro.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las últimas investigaciones sobre el tema apuntan a que hoy en día el camino más adecuado para obtener la criopreservación de órganos es mediante la vitrificación, y, para que esto sea posible, es necesario profundizar en el estudio de cómo se extiende el crioprotector por el órgano.

Hoy en día se desconoce si una vez perfundido el crioprotector, éste se ha extendido de forma homogénea por el órgano, algo crucial para evitar la formación de hielo y el daño del órgano.

Para estudiar la cantidad necesaria de agente crioprotector se han utilizado varias técnicas, no obstante ninguna de ellas ha obtenido resultados suficientemente precisos para el adecuado control de la concentración de agente crioprotector.

El equipo de investigación de la Escuela Superior de Ingenieros de la Universidad de Sevilla, junto a científicos del CNA, han descubierto recientemente que esta tecnología TAC ha resultado muy útil en lo referente al estudio de uno de los crioprotectores más utilizados, el dimetilsulfóxido (DMSO), porque con rayos X se obtienen imágenes que muestran datos muy relevantes relacionados con la concentración de DMSO.

Se ha descubierto que esta tecnología es útil con este crioprotector porque es visible en el TAC al estar compuesto por azufre y tener 32 electrones en su corteza atómica.

Con esta tecnología TAC se pretende conocer la distribución del crioprotector dentro del órgano a tiempo real, dado que se hará una monitorización de la perfusión durante todo el proceso de vitrificación del órgano, consiguiéndose una imagen tridimensional del mismo y controlándose la cantidad de crioprotector que haya en él; también permitirá la detección de la formación de hielo.

Con la información proporcionada, se podrá ir modificando la temperatura y la cantidad de crioprotector hasta conseguir un protocolo idóneo que permita evitar la formación de cristales y conseguir la criopreservación del órgano.

El objetivo de este Trabajo es proporcionar al equipo de investigación mencionado las herramientas necesarias para hacer el estudio sobre la extensión del dimetilsulfóxido a través de órganos de animales mediante la utilización del TAC (Tomografía Axial Computerizada por Rayos X).

Para conseguir este objetivo, este trabajo consiste en la creación, diseño y programación de un sistema de perfusión automático, que reproduzca el protocolo deseado y previamente diseñado.

Se diseñará también un sistema de succión que recoja los fluidos sobrantes durante la perfusión, para que no “encharquen” al animal.

3. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

3.1. Agente crioprotector

Para este estudio se usará como agente crioprotector el dimetilsulfóxido (DMSO), como ya se ha mencionado anteriormente, mezclado con PBS (Phosphate Buffered Saline).

El DMSO pertenece al grupo de los llamados “crioprotectores penetrantes”, que funcionan desplazando el agua del interior de la célula y evitando así la formación de cristales de hielo.

El dimetilsulfóxido crioprotege debido principalmente a su alta capacidad para la prevención de acumulación excesiva de electrolitos y de otras sustancias durante el enfriamiento, así como su capacidad para evitar la formación de cristales.

Su eficacia se ve aumentada por su bajo peso molecular que permite la entrada rápida a través de la membrana celular.

El DMSO consigue muy buenos resultados a temperaturas muy bajas pero es muy tóxico a temperatura ambiente.

El PBS es una solución salina muy utilizada en procedimientos bioquímicos por no ser tóxica para la célula y mantener estable su pH, por lo que no altera el comportamiento habitual celular; estas características hacen que el animal pueda sobrevivir hasta varias horas con PBS.

Por lo expuesto anteriormente en esta investigación se utilizará el DMSO mezclado con PBS.

En los protocolos de criopreservación la perfusión se inicia con PBS y nada, o muy poco DMSO. A medida que va disminuyendo la temperatura y el DMSO es menos tóxico, se va aumentando la cantidad de DMSO y disminuyendo la de PBS, hasta llegar a la cantidad deseada de DMSO.

3.2. Protocolos

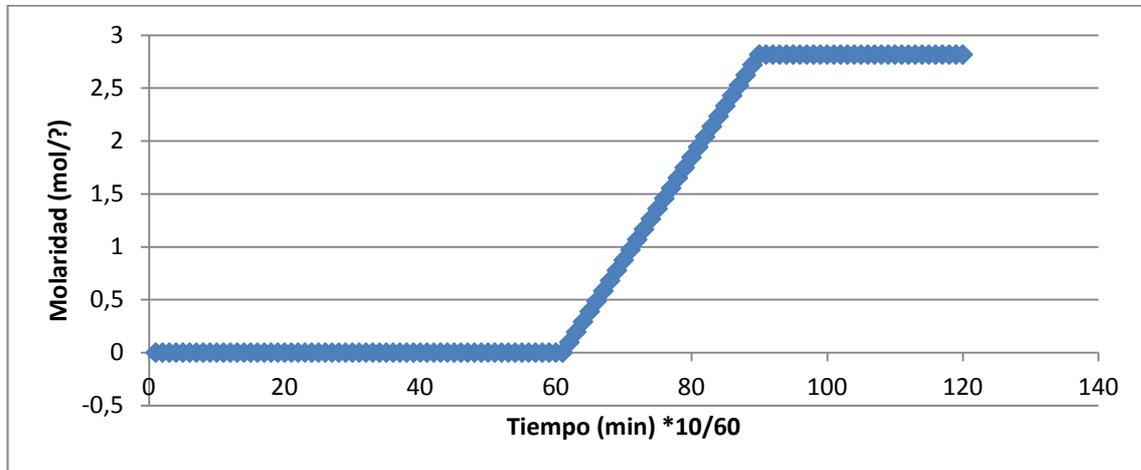
El estudio requiere realizar tres protocolos distintos. Todos con caudal de crioprotector constante, pero con porcentajes de volumen de DMSO distintos en cada uno de ellos; son 20%, 40% y 60%. El resto del porcentaje es el PBS.

Los tres protocolos empiezan con una cantidad de DMSO nula durante los primeros 10 minutos, en los que se utiliza sólo PBS. Después se va incorporando poco a poco el DMSO hasta alcanzar la cantidad correspondiente al porcentaje indicado. En el caso del 20% se alcanza en 5 minutos, en el 40% en 10 minutos y 15 para el de 60%. Una vez alcanzada esta concentración en los tres casos hay un último tramo constante que dura otros 5 minutos.

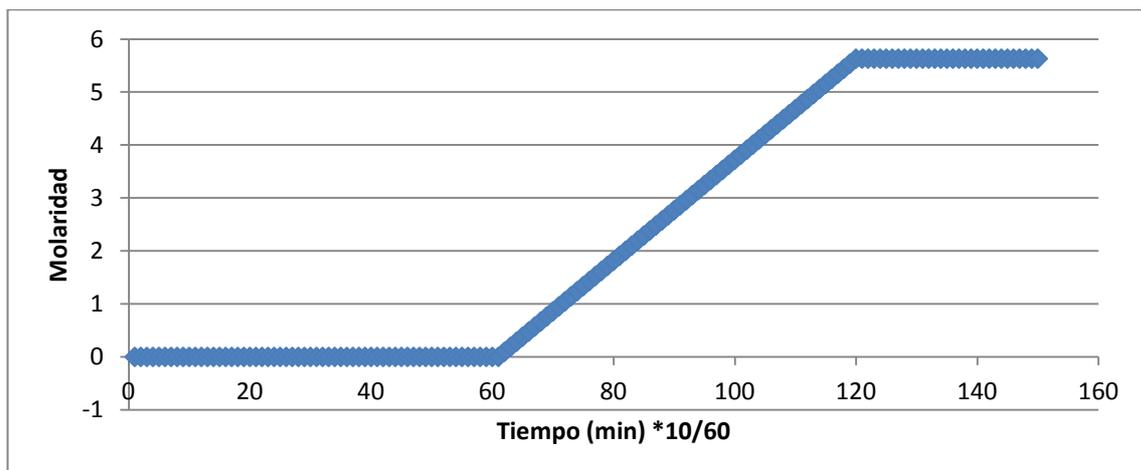
Para cada uno de los tres protocolos se exponen a continuación las gráficas que recogen los datos de molaridad tomados cada 10 segundos durante el procedimiento.

Estos datos se recogen en una hoja Excel independiente en cada protocolo para su uso posterior por el ordenador. Estas hojas de cálculo están como anexos al final de este trabajo.

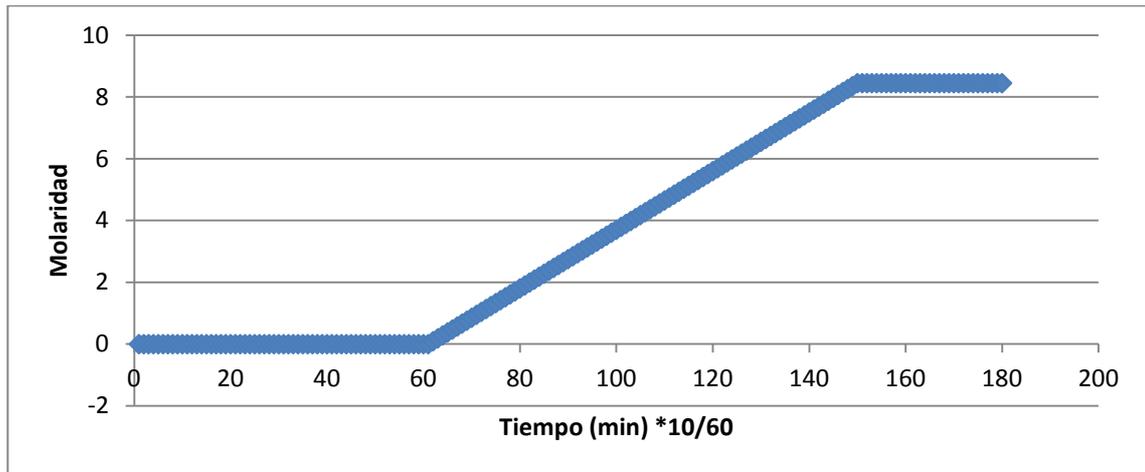
20% de DMSO:



40% de DMSO:



60% de DMSO:



En todos los protocolos el caudal total es constante e igual a 0,6 mL/min. Este caudal es el máximo que permite las bombas sin que la tarjeta sature.

3.3. Sistema de perfusión

El sistema de perfusión está compuesto por dos bombas peristálticas, una para cada una de las dos disoluciones, PBS y DMSO, que componen el crioprotector que se va a estudiar.

El sistema contiene dos recipientes: uno con PBS y otro con DMSO y cada una de las bombas tomará líquido sólo de uno de ellos.

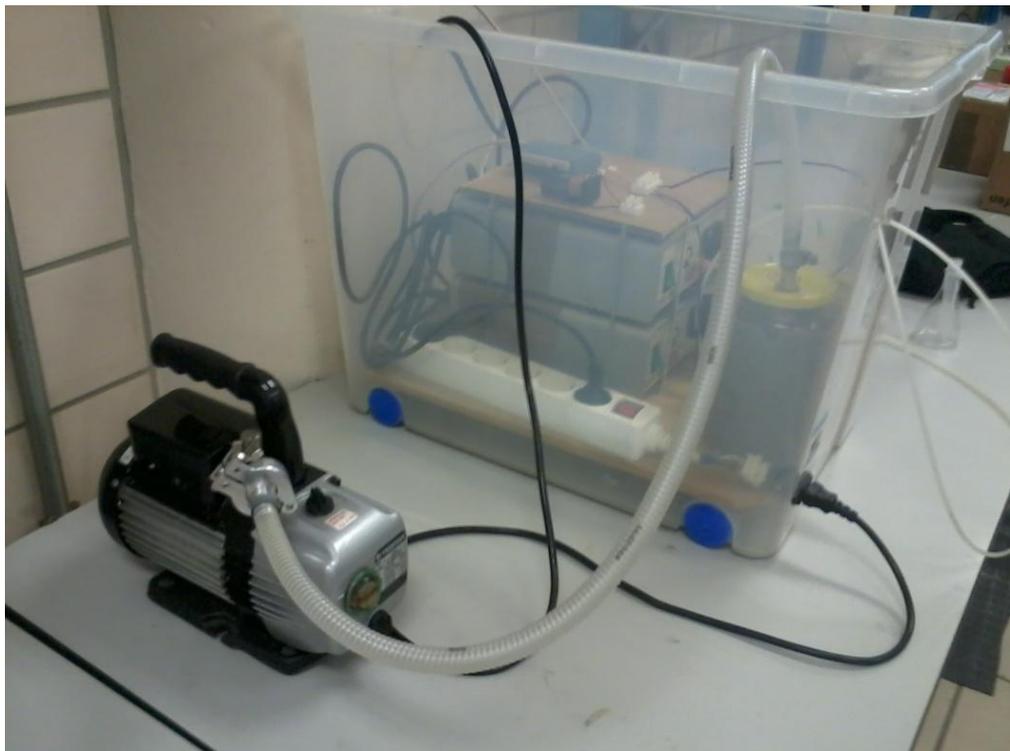
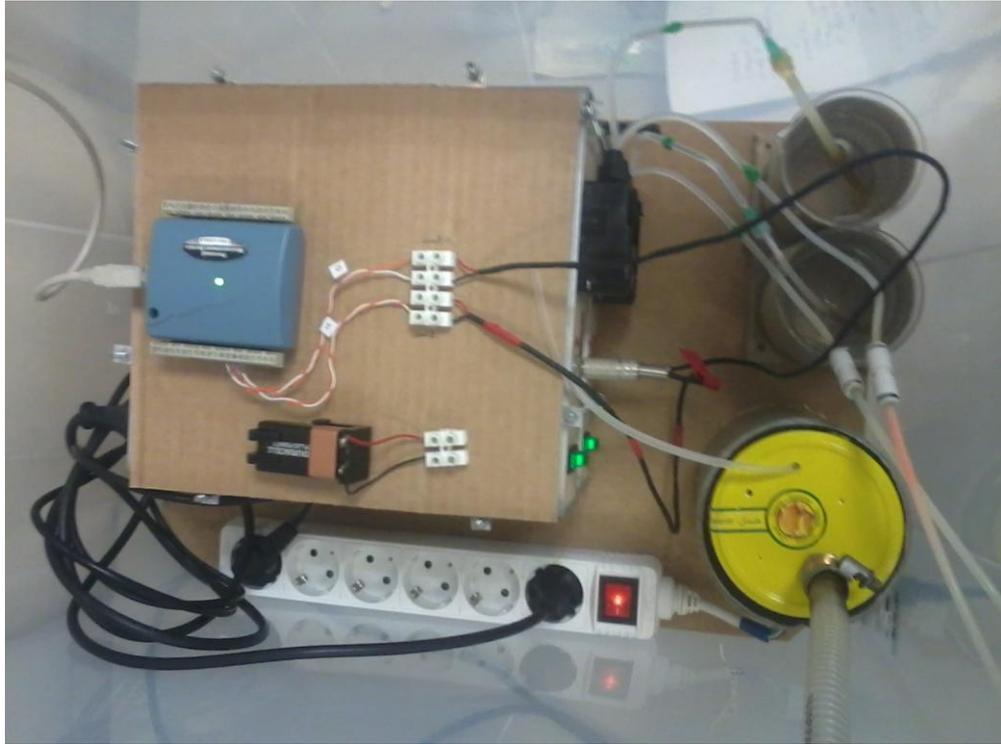
Ambas disoluciones se mezclan con un “sistema en T” en un solo conducto antes de llegar a la punta, la cual se enganchará en el animal para la perfusión. Esto se muestra en la siguiente imagen:



El control de las bombas se hace con el ordenador, mediante un programa que se ha elaborado en Labview y que se expone más adelante.

Para poder realizar este control, el ordenador necesita que las señales analógicas que recibe de las bombas se transformen en información digital, lo que se consigue a través de la tarjeta de adquisición de datos.

El sistema de perfusión se muestra en las siguientes imágenes:



3.4. Bombas peristálticas

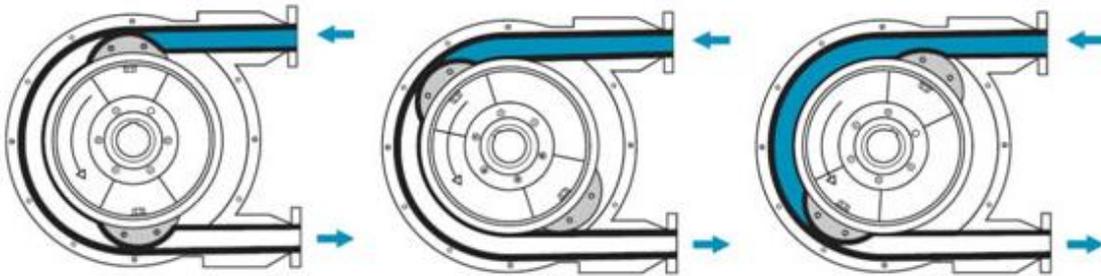
Como ya se ha mencionado, el sistema está formado por dos bombas peristálticas, encargadas de bombear los dos fluidos (PBS y DMSO) desde el depósito hasta el animal.

Una bomba peristáltica es un tipo de bomba hidráulica, cuyo principio de funcionamiento se basa en comprimir y descomprimir el tubo flexible por el que circula el fluido de forma progresiva. Esto se lleva a cabo por un rotor, al que van conectados unos rodillos que se encargan de comprimir el tubo.

Los rodillos aplastan el tubo taponándolo por la zona por la que pasan (fig. 1); al girar se desplaza la zona taponada por el primer rodillo y se libera el espacio que éste va dejando, creando así un vacío que fuerza al fluido a moverse por ese espacio (fig. 2); cuando continúe el giro (fig. 3), el segundo rodillo ocupará la posición que dejó el primero y se repetirá el proceso. El fluido avanzará a medida que la compresión vaya avanzando por el conducto.

En todo momento hay al menos un rodillo comprimiendo el tubo, lo cual evita que el líquido circule hacia atrás.

El funcionamiento de estas bombas se ilustra en la siguiente figura:



Para este proyecto se necesitan, como ya se ha mencionado, dos bombas peristálticas, una para el PBS y otra para el DMSO y son las que se muestran en la figura:



El ordenador que controla el funcionamiento de las bombas calcula también el voltaje que se les debe suministrar para que proporcionen el caudal deseado.

3.5. Tarjeta de Adquisición de Datos

Para que el ordenador pueda controlar las bombas se necesita una tarjeta de adquisición de datos, que transforme las señales físicas de las bombas (analógicas) en datos que puedan ser procesados por un sistema digital, como el ordenador, y viceversa.

Se usará la tarjeta PMD-1208LS, que se conecta al ordenador a través de un puerto USB.

En la siguiente imagen se ve una foto de esta tarjeta:



Esta tarjeta se caracteriza por tener dos bancos de borneras, cada uno con 20 conexiones. Cada terminal tiene asociado un número de pin tal y como se indica en la siguiente figura:



Las características de esta tarjeta son las siguientes: ocho entradas análogas, dos salidas análogas de 10 bits de resolución, 16 conexiones digitales de Entrada/Salida y un contador de eventos externo de 32 bits.

Esta tarjeta es compatible con los sistemas operativos Window XP/Vista/7/8 de 32 y 64 bits y dispone de un puerto USB por el que se conecta al ordenador.

La tarjeta requiere de los programas InstaCal, TracerDAQ, Softwire para Visual Studio y los componentes MCC DAQ. En el anexo se explica donde conseguirlo y como instalarlo.

Para nuestro proyecto sólo necesitamos cuatro canales, dos por cada bomba, es decir, dos salidas analógicas y dos tierras. Se han usado los pines 12, 13, 14 y 15.

Para el correcto funcionamiento de la tarjeta es necesaria su instalación y calibración. Para ello se usa un programa llamado InstaCal. En el anexo 3 se explica cómo instalar y calibrar la tarjeta, y en el anexo B dónde conseguir y cómo instalar el InstaCal.

3.6. Software

Para el programa de control de las bombas usaremos el Labview. Con él desarrollaremos dos programas: el principal, que será el encargado de reproducir los protocolos de perfusión que deseamos, y el secundario, que servirá sólo para llenar los conductos antes de la perfusión y evitar que entre aire en el animal.

3.6.1. Labview

Labview es un entorno gráfico de programación que utiliza el lenguaje “G”.

Los programas desarrollados en Labview se llaman Virtual Instruments (VI) y cada uno de ellos consta de dos partes principales:

- Panel Frontal: es la interfaz con el usuario, la utilizamos para interactuar con el usuario cuando el programa se está ejecutando. En esta interfaz se definen los *controles* (los usamos como entradas y pueden ser botones, marcadores etc..) e *indicadores* (los usamos como salidas y pueden ser gráficas, etc ...).
- Diagrama de Bloques: es el programa propiamente dicho, donde se define su funcionalidad; aquí se colocan iconos que realizan una determinada función y se interconectan (el código que controla el programa).

Suele haber una tercera parte *icono/conector* que son los medios utilizados para conectar un VI con otros VIs.

Nosotros usaremos la versión 2013 de Labview, versión 13.0.

3.6.2. Programa principal

Este programa se aplica independientemente a cada uno de los tres protocolos que estamos considerando.

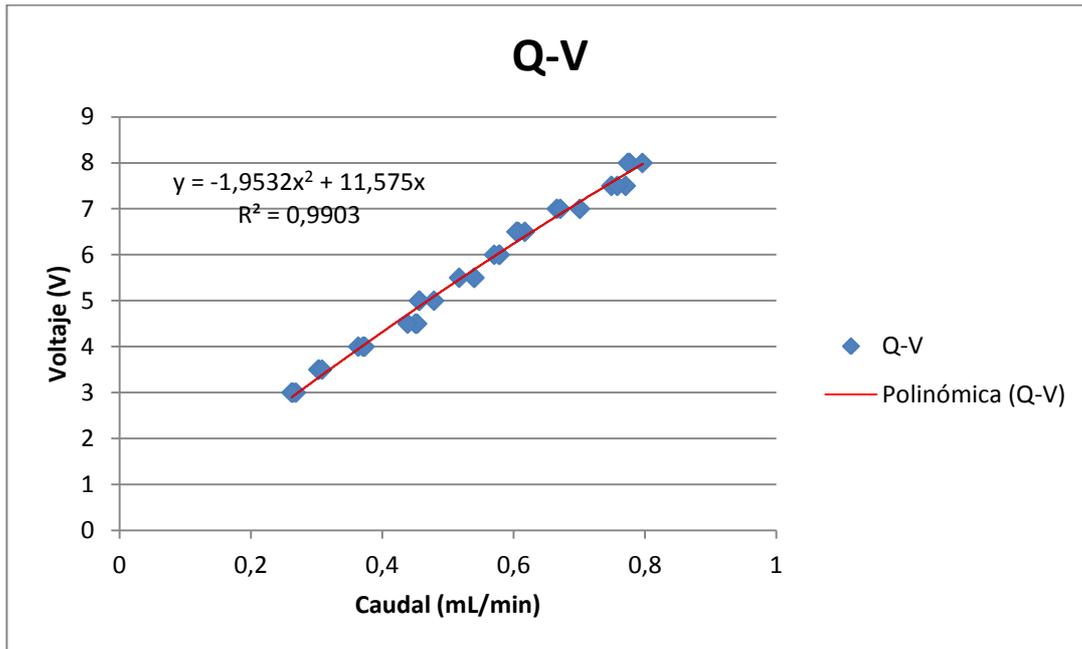
Se trata, en primer lugar, de calcular el voltaje necesario para que las bombas puedan conseguir el caudal total requerido y la molaridad en cada instante del proceso.

Para ello primero debemos obtener una ley experimental de cada bomba que nos relacione el caudal que se obtiene con cada voltaje proporcionado.

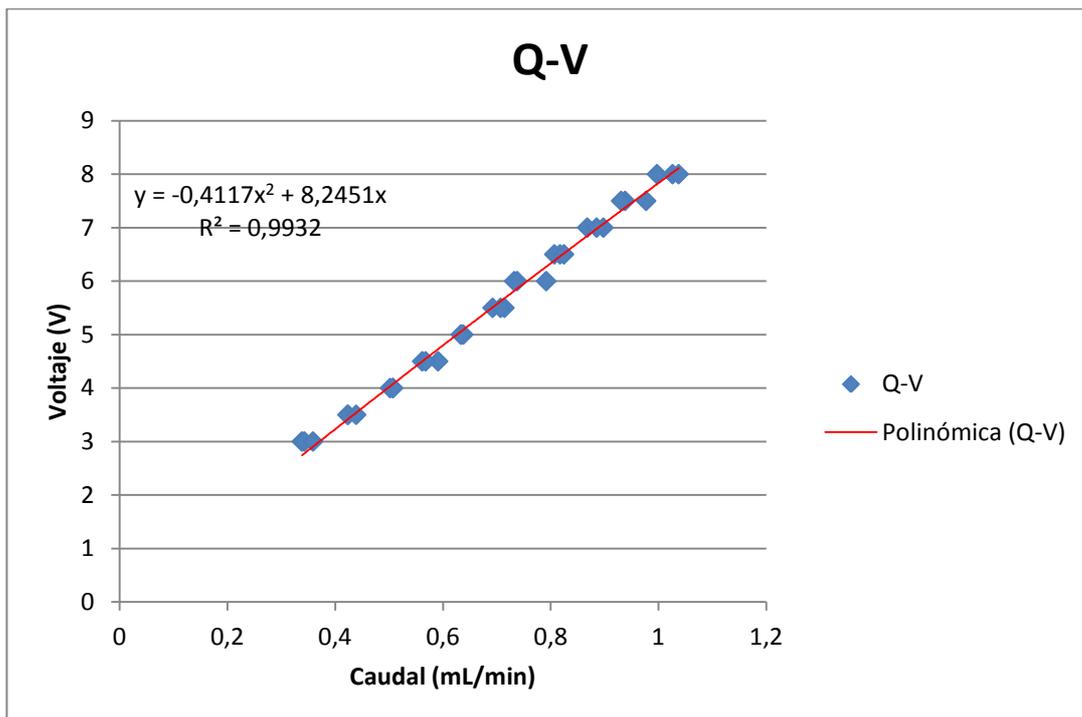
Dicha ley se ha calculado conectando las bombas a una fuente de voltaje y aumentando el voltaje desde 3V a 8V, con incrementos de 0,5V y midiendo el tiempo que tarda para cada voltaje en llenarse 2 ml. Para conseguir mayor precisión, se han hecho tres mediciones para cada voltaje.

Los resultados se han representado en las siguientes tablas:

Bomba 1:



Bomba 2:



Para cada bomba se ha representado en azul los datos recogidos experimentalmente y en rojo la recta de aproximación polinómica que más se ajusta a los resultados, calculada con el programa Excel; dicha recta será la que usemos en Labview como ley experimental.

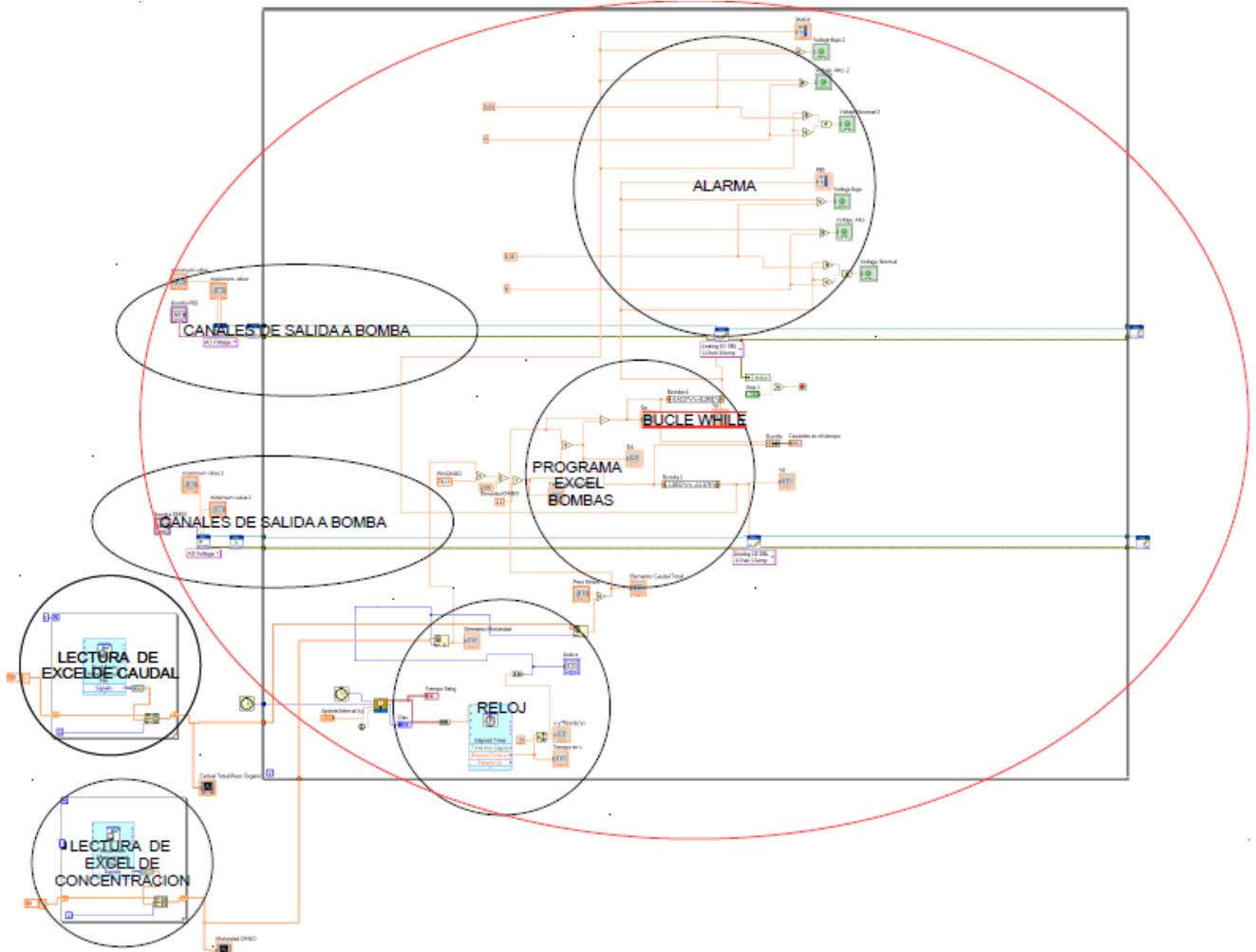
Diagrama de bloques

El programa toma los datos de dos hojas de cálculo Excel diferentes; una de ellas contiene la cantidad de molaridad cada 10 segundos, que son los mismos datos que se recogen en la gráfica correspondiente al protocolo con el que se esté trabajando, y la otra hoja contiene el caudal cada 10 segundos (recordemos que es constante). Las gráficas correspondientes a cada uno de los tres protocolos se encuentran en el apartado 3.1 de este documento y las dos listas que corresponden a cada uno de ellos pueden verse como anexos al final de

este trabajo.

Las entradas con el valor correspondiente a la molaridad y caudal cada 10 segundos, que proporcionan las listas de Excel al programa, son datos escalonados.

El siguiente esquema nos muestra las partes de las que consta el programa:



Una entrada es la lectura de los valores de caudal contenidos en una de las dos hojas Excel aludidas y la otra entrada los valores de concentración (expresados en términos de molaridad) contenidos en la otra hoja; como ya se ha comentado, los valores de ambas variables corresponden a intervalos de 10 segundos.

El reloj indica en qué momento del tiempo del protocolo estamos; es decir, calcula el índice correspondiente en cada caso.

Este índice nos indicará el caudal y la molaridad en cada instante de tiempo.

La parte del programa correspondiente al reloj se ha obtenido en la página web siguiente:

<https://decibel.ni.com/content/docs/DOC-10307>

Multiplicando la molaridad por el peso molar del DMSO y dividiéndolo por su densidad obtenemos la concentración de DMSO para cada instante de tiempo. Multiplicando esta cantidad por el caudal total obtenemos el caudal de DMSO.

Para obtener el caudal de PBS simplemente se resta el caudal de DMSO del caudal total.

Con los caudales de DMSO y PBS en cada instante de tiempo, obtenemos los voltajes correspondientes a dichos caudales utilizando la ley experimental obtenida anteriormente.

Estos cálculos se hacen en la parte del programa llamada “Programa Excel Bombas”.

Las salidas del programa son los voltajes requerido en cada instante, y se transmiten a las bombas por la parte del programa llamada “canales de salida a bombas”. Por supuesto hay dos, una para cada bomba.

Para transformar los datos digitales del ordenador en órdenes que las bombas entiendan es necesaria la Tarjeta de Adquisición de Datos de la que hemos hablado antes.

Para que el Labview pueda interactuar con la tarjeta (leer o escribir en ella) es necesario una librería especial, llamada ULx. Cómo obtener esta librería e instalarla se explica en el Anexo 2.

Son los VI de esta librerías los que se han utilizado en la parte de “Canales de salida a bombas” para poder escribir sobre la tarjeta los voltajes queridos.

Por último, el programa tiene una parte llamada “Alarma”. Esta parte es un indicador del voltaje de las bombas. Avisa si el voltaje es demasiado bajo (menor que 0,5V) o demasiado alto (mayor que 5V), lo cual provocaría la saturación de la tarjeta.

Panel Frontal

A través del panel frontal podemos interaccionar con el programa.

En él debemos seleccionar el canal para cada bomba (canal 0 para el PBS y canal 1 para el DMSO) y el máximo y mínimo valor que permite la tarjeta sin que ésta sature. En nuestro caso el rango de valor está ente 0,5 y 5 V.

También se debe seleccionar el peso del órgano del animal con el que se va a trabajar, ya que el caudal total está programado en función de éste. En caso de no depender el peso, se pondrá un 1.

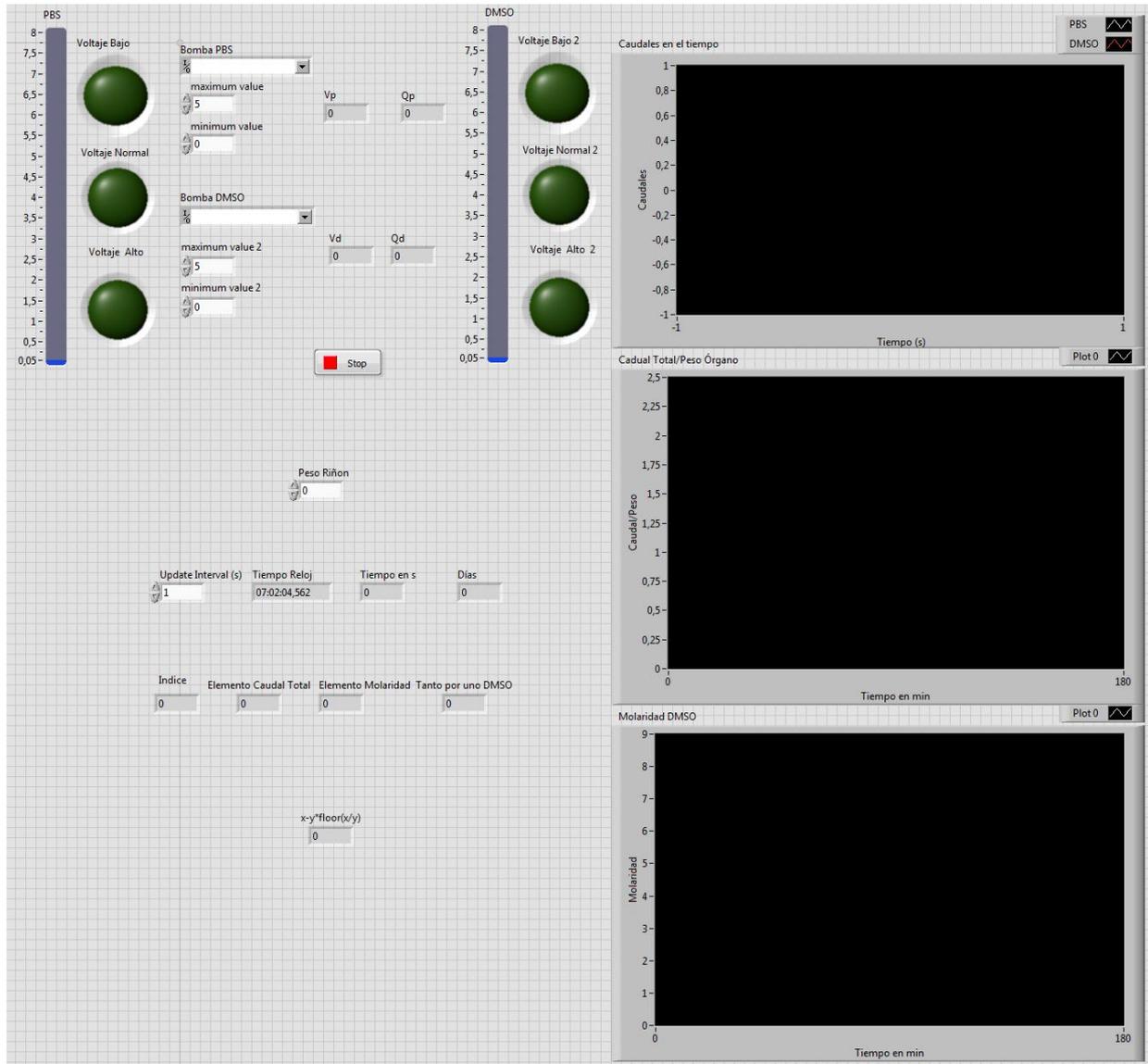
El programa muestra también el valor del caudal y del voltaje necesario para conseguirlo tanto de PBS como de DMSO.

También hay un indicador del voltaje de cada bomba en cada momento, en forma de barra. Si el voltaje puede provocar la saturación de la tarjeta por ser demasiado alto o demasiado bajo, se encenderá una luz indicándolo. En caso de que no ocurra esto, estará encendida una luz que indica que el comportamiento es normal.

El dispositivo tiene también un botón de “Stop”. En caso de querer parar el programa antes de que finalice, se puede hacer pulsando dicho botón.

A continuación se muestran tres gráficas. La primera muestra la evolución en el tiempo de los caudales de PBS y DMSO. Las otras dos muestran también la evolución en el tiempo, pero en este caso del caudal total en relación con el peso del órgano y la molaridad de DMSO.

A continuación se muestra una captura del Panel Frontal del programa:



3.6.3. Programa secundario

Además del programa principal descrito anteriormente se necesita otro para el llenado de los conductos desde las bombas hasta el ratón, donde se iniciaría la perfusión. Esto es necesario para evitar que entre aire en el animal y la perfusión comience directamente inyectando el crioprotector.

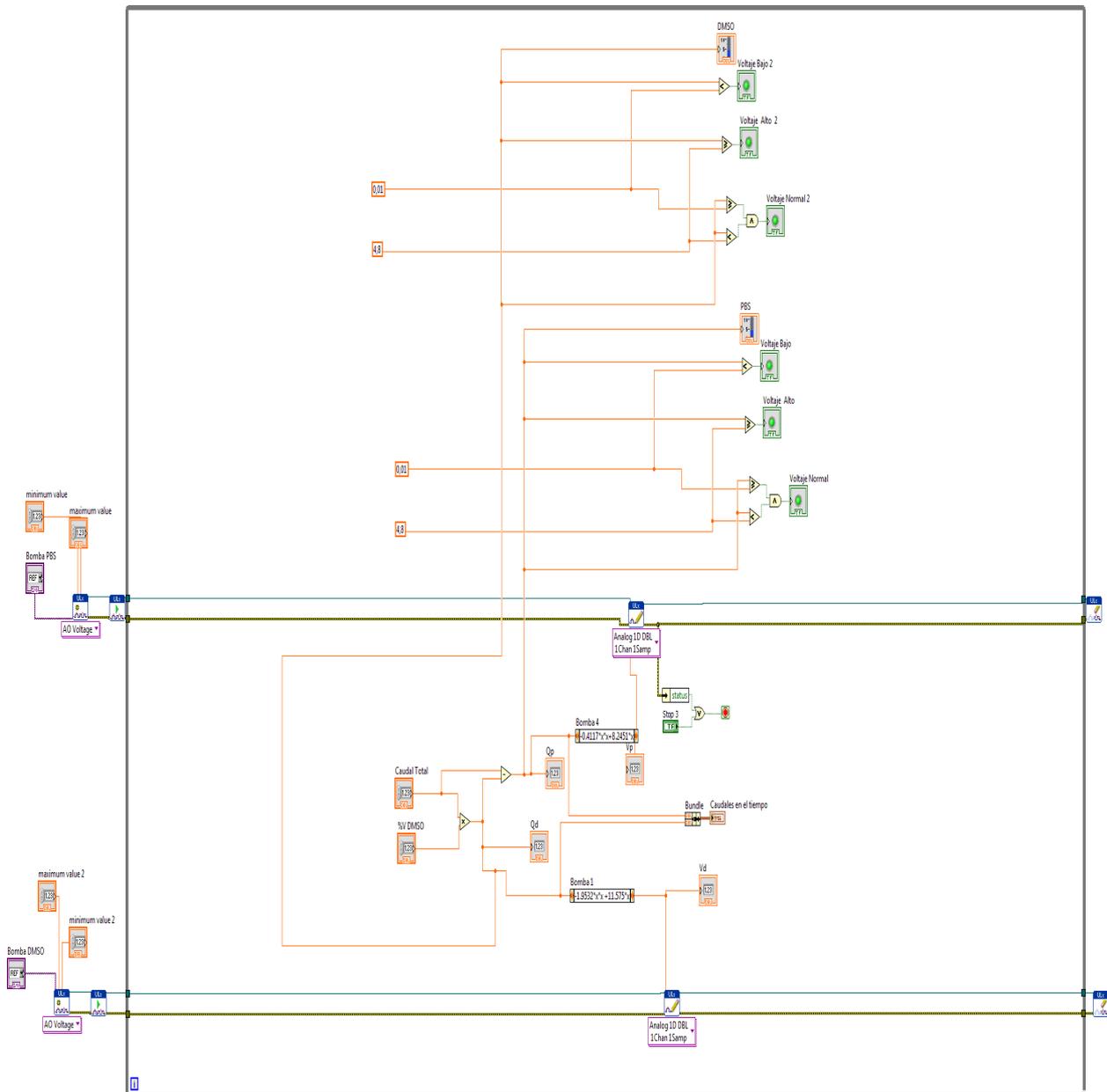
Diagrama de bloques

En el caso que nos ocupa, las entradas son simplemente el caudal total y el porcentaje en volumen de DMSO. El valor requerido de ambas variables se selecciona desde el panel frontal.

Con estos datos calculamos el caudal de DMSO y de PBS y, con la ley experimental de las bombas, el voltaje. Éste se transmite a las bombas de forma análoga al programa anterior.

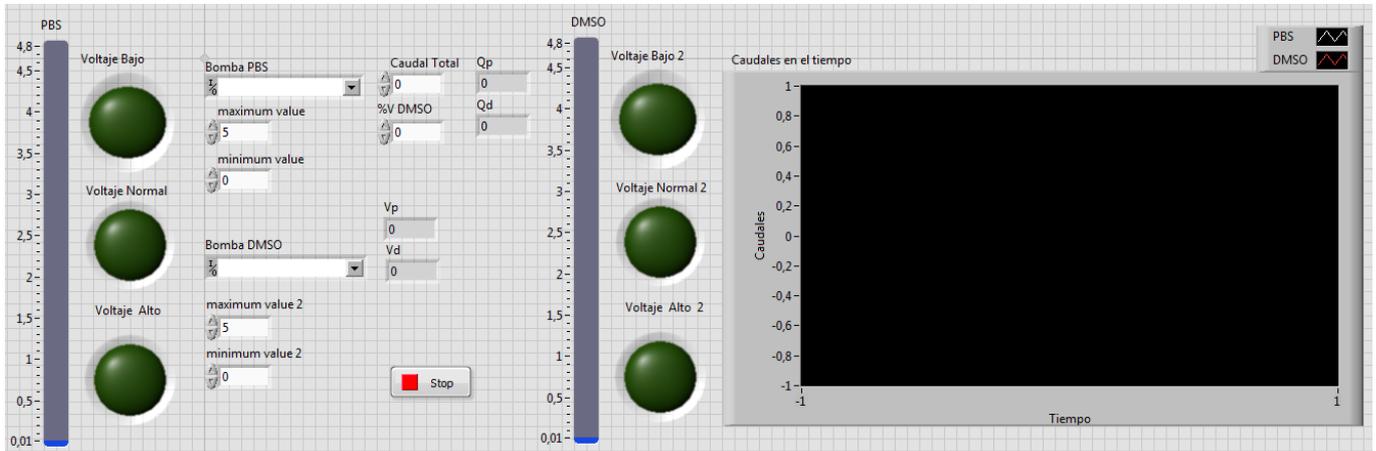
Tendrá también una alarma que nos avise cuando el valor del voltaje esté por debajo o por encima de los límites permitidos por la tarjeta, que son 0,01V y 4,8V.

A continuación se muestra una imagen del diagrama de bloques de este programa:



Panel Frontal

Muy similar al del programa principal:



Se han añadido dos iconos para seleccionar las entradas del caudal total y del porcentaje en volumen de DMSO.

3.7. Sistema de succión

Además del sistema de perfusión ha sido necesario el desarrollo de un sistema de succión.

El sistema de succión cuenta con una bomba de vacío conectada a un depósito. El depósito está también conectado a una goma que es la que irá al animal.

A través de esta goma, y gracias a la bomba, se succiona los fluidos que irán saliendo del animal en la perfusión y se irá almacenando en el depósito.

A continuación se muestra una imagen de dicho sistema:



4. CONCLUSIONES

La máquina diseñada y realizada en este trabajo ha sido probada y funciona con éxito.

El programa de Labview que controla el sistema de perfusión es muy intuitivo y fácil de usar, lo que facilita el uso de la máquina diseñada sin conocimientos informáticos avanzados.

En breve el equipo de investigación de la Escuela Superior de Ingeniería junto con el CNA van a comenzar a utilizar esta herramienta para el estudio de la difusión del DMSO a través de los órganos de un ratón.

Se espera que este trabajo sea útil en esta investigación en particular y una pequeña aportación al estudio sobre la criocongelación en general.

5. ANEXOS

5.1. Instalación del Labview

Para instalar el programa se deben seguir los siguientes pasos:

Al meter el DVD con el programa se iniciará automáticamente el instalador y empezará a cargarse una barra.

Primero hay que instalar icrosoft .NET. Para ello, una vez cargada la barra, se pincha en “I have read and accept the license terms” y se le da a “Install”.

Después se iniciará automáticamente el instalador del Labview. Se espera a que cargue la barra y se le da a “next”.

Se siguen las instrucciones que aparecerán en pantalla: se introduce el nombre que se quiera en donde dice “Full Name”.

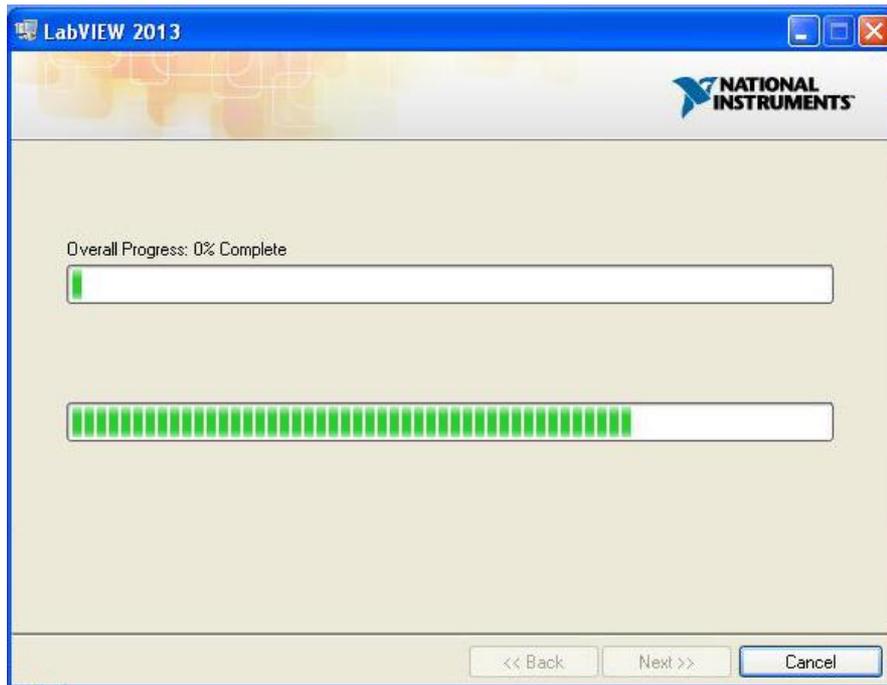
En la siguiente ventana se pide el número de serie. Éste debe introducirse en los dos espacios en blanco:

Se pincha en “Next” y se selecciona la ubicación donde se quiere instalar el programa. “Next” de nuevo.

La siguiente ventana muestra los componentes que se instalarán.

La siguiente ventana nos pregunta si queremos notificar a la empresa que desarrolla este programa y recibir notificaciones. Se desmarca esta opción.

Se acepta las licencias y se le da varias veces “Next”, hasta que inicie la instalación:

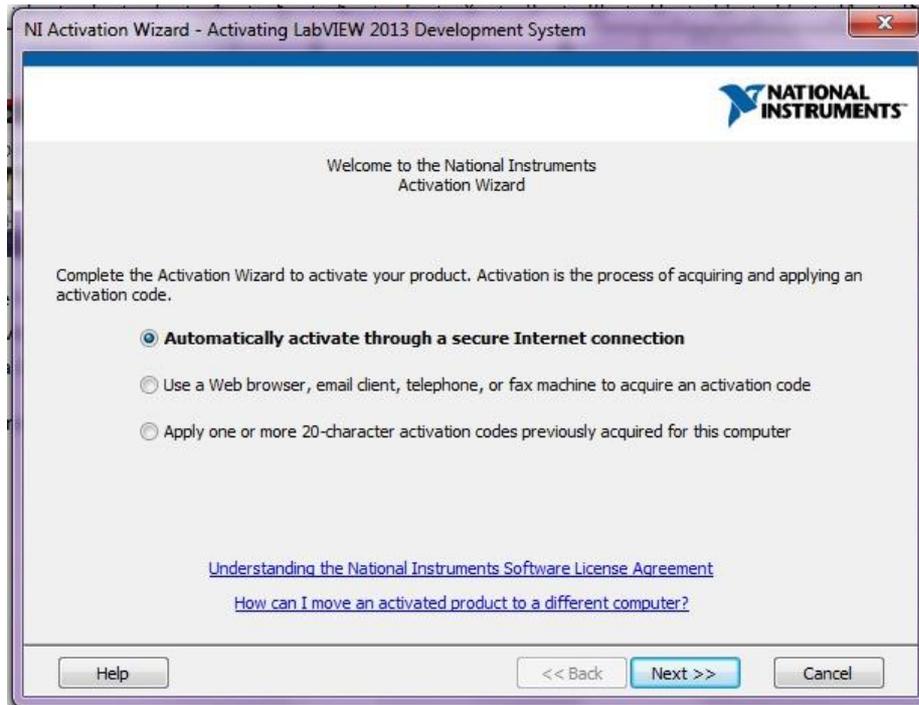


Una vez instalado aparecerá la siguiente ventana:



En él nos pregunta si se desea instalar algún driver de algún hardware para usar junto con el Labview. Como no es el caso le damos a “Decline Support”. Se picha luego en “Next” para terminar la instalación.

Aparecerá una ventana para activar el producto. En esta caso le damos a “Cancel”:



En la siguiente ventana se pregunta si se quiere enviar nuestras opiniones sobre el programa. Se dará a no.

La siguiente ventana pregunta si se quiere recibir actualizaciones periódicas. Se pincha en “no”.

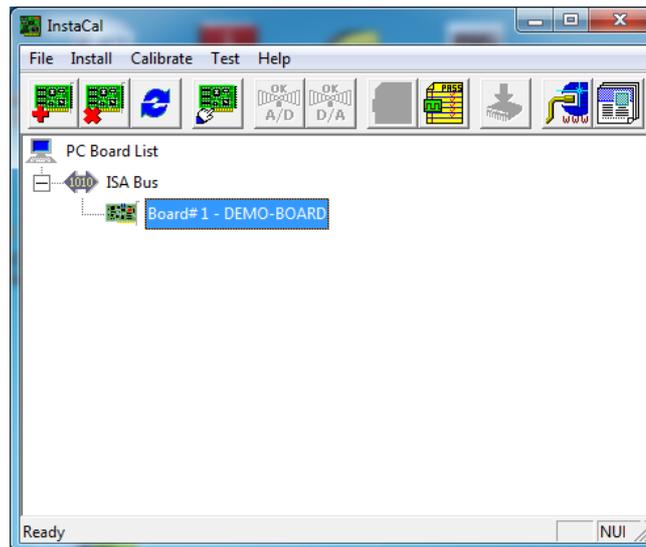
Por último se le da a “Restart” para reiniciar el ordenador.

5.2. Instalación del software de la tarjeta

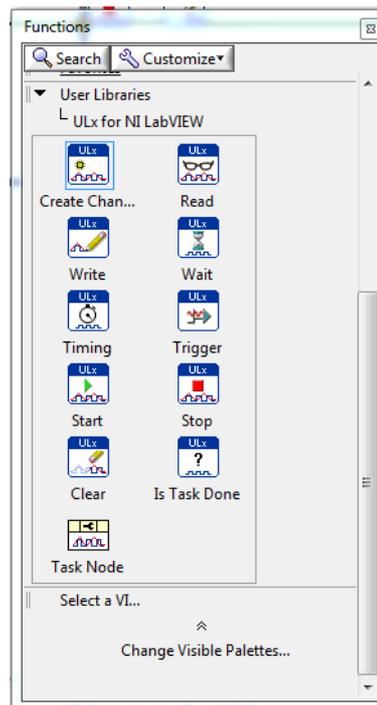
Para el correcto funcionamiento de la tarjeta hace falta instalar un paquete de programas llamado MCC DAQCD, que incluye los drivers y el software necesario.

Dentro de este paquete se encuentran los siguientes programas:

- Instacal 6.35. Programa para la instalación, calibración y prueba de dispositivos de adquisición de datos. Una vez que el dispositivo es reconocido por Windows, se usa InstaCal para detectarlo y añadirlo(s) a su fichero de configuración.



- TracerDAQ 2.3.2. Suite de aplicaciones de instrumentos virtuales con gráficas continuas, osciloscopio, generador de funciones, y el generador de tasa
- Universal Library 1.5. Librerías de programación para el desarrollo de aplicaciones de 32/64 bits. Usa lenguajes de programación para Windows.
- UL para Android 1.5. Idéntico al anterior, pero dispositivos Android (incluso tablets y smartphones). Para Linux, Mac y Windows.
- ULx para LabVIEW 2.10. Librería de instrumentos virtuales y ejemplos para la adquisición, control e instrumentación. Su sintaxis es consistente con las de las VI de DAQmx. Uso para LabVIEW 2010 y versiones posteriores. Un canal físico es un terminal o conexión de un dispositivo analógico o digital que puede medir una señal. Usa el formato de ejemplo Dev0/Ai0:3 para especificar los canales físicos. Este puede tomar medir de forma finita (valores finitos) o continuamente. Dentro de LabVIEW no se usa el Explorador de Medida y Automatización para usar ULx, sino que se consigue con la ayuda de Instacal y la configuración del hardware en él, dando un número a cada uno de los dispositivos que detecta conectado al ordenador y reconocido por LabVIEW. ULx lo podemos encontrar en la paleta de funciones dentro del diagrama de bloques. Dicha paleta se muestra en la siguiente imagen:



Este paquete de programas se puede descargar de la página web de Measurement Computing:

<http://www.mccdaq.com/software.aspx>

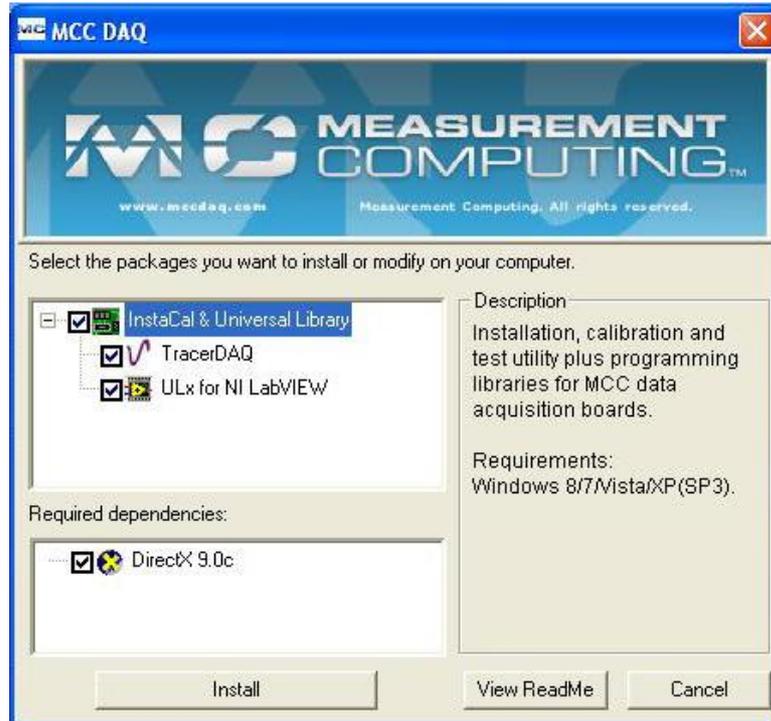
Para poder descargar el software sólo es necesario estar registrado en la página web.

Se descargará un ejecutable denominado mccdaq.exe que para instalarlo hay que seguir los siguientes pasos:

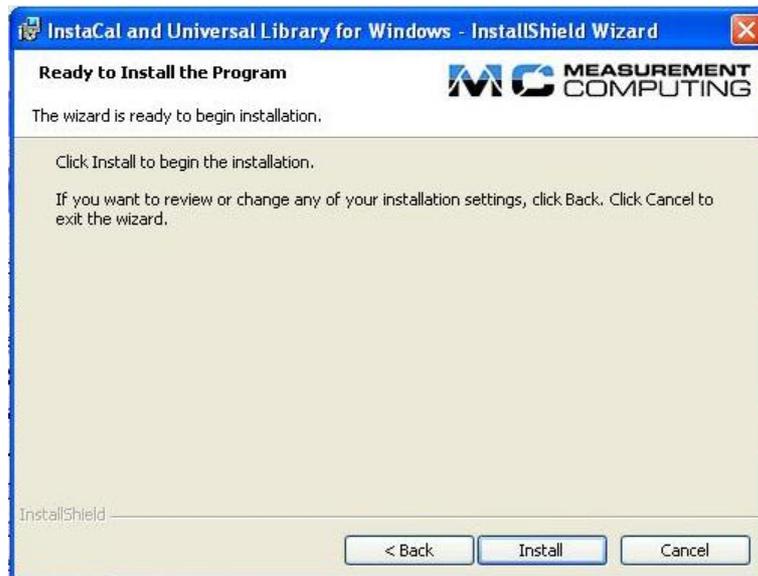
Al abrir el ejecutable aparecerá el siguiente cuadro. Se le da a “Setup” y se espera a que se vaya cargando la barra:



A continuación aparecerá el cuadro que se muestra a continuación, donde hay que darle a instalar:



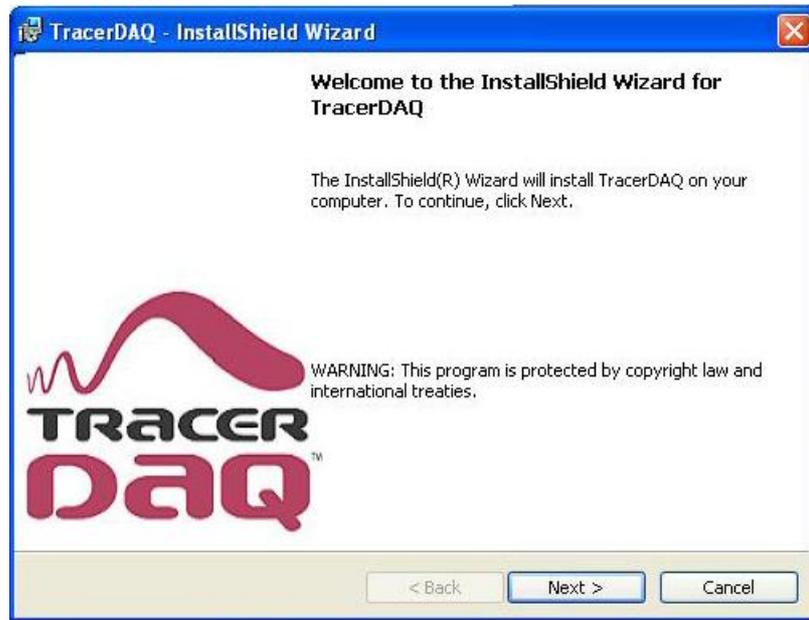
Aparecerá el instalador. Se le da a “Next” y se elige la carpeta donde se desea instalar. De nuevo a “Next” hasta que aparezca la opción de “Install”:



Cuando acabe de cargar la barra se le da a “Finish”

Con esto queda instalado el InstaCal y la Librería universal (Universal Library).

A continuación y de forma automática aparecerá el instalador del TracerDAQ:



Se le da a “Next”, se aceptan las condiciones y de nuevo a “Next” hasta que aparezca “Install”. Una vez instalado se le da a “Finish” y ya está instalado.

Ahora comienza la instalación del ULx for NI LabVIEW. De nuevo “Next” hasta “Install” y “Finish”

Empezará a cargar una barra tras la cual aparecerá la siguiente pantalla:



Ahora comienza la instalación del DirectX:



Se aceptan las condiciones y se le da a “siguiente”. Comenzará la instalación. Cuando se le da a “Finalizar”.

Finalmente, para que la instalación esté completada se debe reiniciar el ordenador.

5.3. Instalación y calibración de la tarjeta de adquisición de datos

Instalación de la tarjeta

La primera vez que se conecta la tarjeta al ordenador aparecerá una ventana de “Nuevo hardware encontrado” como la que se muestra en la imagen:



Cuando esta ventana desaparece aparece otra como la que aparece a continuación:



Cuando esta ventana se cierra la instalación se habrá completado.

Calibración de la tarjeta

La calibración es un proceso por el cual se ajustan las correcciones de offset y de la ganancia para las entradas de la tarjeta.

Es un proceso que debe realizarse cada seis meses.

Para ello se abre el InstaCal y en el menú “Calibrate” se elige la opción “A/D”. Se deben seguir las instrucciones que aparecerán en pantalla.

5.4. Hojas de Cálculo utilizadas por el Programa

Las hojas que se exponen a continuación contienen los datos de molaridad y caudal que necesita el ordenador, son dos por cada uno de los protocolos.

Protocolo 20%:

Hoja de datos 1			Hoja de datos 2		
Protocolo 1 - Molaridad			Protocolo 1 - Caudal		
Medición	Tiempo (s)	Molaridad	Medición	Tiempo (s)	Molaridad
1	0	0	1	0	0,6
2	10	0	2	10	0,6
3	20	0	3	20	0,6
4	30	0	4	30	0,6
5	40	0	5	40	0,6
6	50	0	6	50	0,6
7	60	0	7	60	0,6
8	70	0	8	70	0,6
9	80	0	9	80	0,6
10	90	0	10	90	0,6
11	100	0	11	100	0,6
12	110	0	12	110	0,6
13	120	0	13	120	0,6
14	130	0	14	130	0,6
15	140	0	15	140	0,6
16	150	0	16	150	0,6
17	160	0	17	160	0,6
18	170	0	18	170	0,6
19	180	0	19	180	0,6
20	190	0	20	190	0,6
21	200	0	21	200	0,6
22	210	0	22	210	0,6
23	220	0	23	220	0,6
24	230	0	24	230	0,6
25	240	0	25	240	0,6
26	250	0	26	250	0,6
27	260	0	27	260	0,6
28	270	0	28	270	0,6
29	280	0	29	280	0,6

30	290	0	30	290	0,6
31	300	0	31	300	0,6
32	310	0	32	310	0,6
33	320	0	33	320	0,6
34	330	0	34	330	0,6
35	340	0	35	340	0,6
36	350	0	36	350	0,6
37	360	0	37	360	0,6
38	370	0	38	370	0,6
39	380	0	39	380	0,6
40	390	0	40	390	0,6
41	400	0	41	400	0,6
42	410	0	42	410	0,6
43	420	0	43	420	0,6
44	430	0	44	430	0,6
45	440	0	45	440	0,6
46	450	0	46	450	0,6
47	460	0	47	460	0,6
48	470	0	48	470	0,6
49	480	0	49	480	0,6
50	490	0	50	490	0,6
51	500	0	51	500	0,6
52	510	0	52	510	0,6
53	520	0	53	520	0,6
54	530	0	54	530	0,6
55	540	0	55	540	0,6
56	550	0	56	550	0,6
57	560	0	57	560	0,6
58	570	0	58	570	0,6
59	580	0	59	580	0,6
60	590	0	60	590	0,6
61	600	1,388E-16	61	600	0,6
62	610	0,0970966	62	610	0,6
63	620	0,1941931	63	620	0,6
64	630	0,2912897	64	630	0,6
65	640	0,3883862	65	640	0,6
66	650	0,4854828	66	650	0,6

67	660	0,5825793
68	670	0,6796759
69	680	0,7767724
70	690	0,873869
71	700	0,9709655
72	710	1,0680621
73	720	1,1651586
74	730	1,2622552
75	740	1,3593517
76	750	1,4564483
77	760	1,5535448
78	770	1,6506414
79	780	1,7477379
80	790	1,8448345
81	800	1,941931
82	810	2,0390276
83	820	2,1361241
84	830	2,2332207
85	840	2,3303172
86	850	2,4274138
87	860	2,5245103
88	870	2,6216069
89	880	2,7187034
90	890	2,8158
91	900	2,8158
92	910	2,8158
93	920	2,8158
94	930	2,8158
95	940	2,8158
96	950	2,8158
97	960	2,8158
98	970	2,8158
99	980	2,8158
100	990	2,8158
101	1000	2,8158
102	1010	2,8158
103	1020	2,8158

67	660	0,6
68	670	0,6
69	680	0,6
70	690	0,6
71	700	0,6
72	710	0,6
73	720	0,6
74	730	0,6
75	740	0,6
76	750	0,6
77	760	0,6
78	770	0,6
79	780	0,6
80	790	0,6
81	800	0,6
82	810	0,6
83	820	0,6
84	830	0,6
85	840	0,6
86	850	0,6
87	860	0,6
88	870	0,6
89	880	0,6
90	890	0,6
91	900	0,6
92	910	0,6
93	920	0,6
94	930	0,6
95	940	0,6
96	950	0,6
97	960	0,6
98	970	0,6
99	980	0,6
100	990	0,6
101	1000	0,6
102	1010	0,6
103	1020	0,6

104	1030	2,8158
105	1040	2,8158
106	1050	2,8158
107	1060	2,8158
108	1070	2,8158
109	1080	2,8158
110	1090	2,8158
111	1100	2,8158
112	1110	2,8158
113	1120	2,8158
114	1130	2,8158
115	1140	2,8158
116	1150	2,8158
117	1160	2,8158
118	1170	2,8158
119	1180	2,8158
120	1190	2,8158

104	1030	0,6
105	1040	0,6
106	1050	0,6
107	1060	0,6
108	1070	0,6
109	1080	0,6
110	1090	0,6
111	1100	0,6
112	1110	0,6
113	1120	0,6
114	1130	0,6
115	1140	0,6
116	1150	0,6
117	1160	0,6
118	1170	0,6
119	1180	0,6
120	1190	0,6

Protocolo 40%:

Hoja de datos 3			Hoja de datos 4		
Protocolo 2 - Molaridad			Protocolo 2 - Caudal		
Medición	Tiempo (s)	Molaridad	Medición	Tiempo (s)	Molaridad
1	0	0	1	0	0,6
2	10	0	2	10	0,6
3	20	0	3	20	0,6
4	30	0	4	30	0,6
5	40	0	5	40	0,6
6	50	0	6	50	0,6
7	60	0	7	60	0,6
8	70	0	8	70	0,6
9	80	0	9	80	0,6
10	90	0	10	90	0,6
11	100	0	11	100	0,6
12	110	0	12	110	0,6
13	120	0	13	120	0,6
14	130	0	14	130	0,6
15	140	0	15	140	0,6
16	150	0	16	150	0,6
17	160	0	17	160	0,6
18	170	0	18	170	0,6
19	180	0	19	180	0,6
20	190	0	20	190	0,6
21	200	0	21	200	0,6
22	210	0	22	210	0,6
23	220	0	23	220	0,6
24	230	0	24	230	0,6
25	240	0	25	240	0,6
26	250	0	26	250	0,6
27	260	0	27	260	0,6
28	270	0	28	270	0,6
29	280	0	29	280	0,6
30	290	0	30	290	0,6
31	300	0	31	300	0,6
32	310	0	32	310	0,6
33	320	0	33	320	0,6

34	330	0		34	330	0,6
35	340	0		35	340	0,6
36	350	0		36	350	0,6
37	360	0		37	360	0,6
38	370	0		38	370	0,6
39	380	0		39	380	0,6
40	390	0		40	390	0,6
41	400	0		41	400	0,6
42	410	0		42	410	0,6
43	420	0		43	420	0,6
44	430	0		44	430	0,6
45	440	0		45	440	0,6
46	450	0		46	450	0,6
47	460	0		47	460	0,6
48	470	0		48	470	0,6
49	480	0		49	480	0,6
50	490	0		50	490	0,6
51	500	0		51	500	0,6
52	510	0		52	510	0,6
53	520	0		53	520	0,6
54	530	0		54	530	0,6
55	540	0		55	540	0,6
56	550	0		56	550	0,6
57	560	0		57	560	0,6
58	570	0		58	570	0,6
59	580	0		59	580	0,6
60	590	0		60	590	0,6
61	600	1,388E-16		61	600	0,6
62	610	0,0970966		62	610	0,6
63	620	0,1941931		63	620	0,6
64	630	0,2912897		64	630	0,6
65	640	0,3883862		65	640	0,6
66	650	0,4854828		66	650	0,6
67	660	0,5825793		67	660	0,6
68	670	0,6796759		68	670	0,6
69	680	0,7767724		69	680	0,6
70	690	0,873869		70	690	0,6

71	700	0,9709655		71	700	0,6
72	710	1,0680621		72	710	0,6
73	720	1,1651586		73	720	0,6
74	730	1,2622552		74	730	0,6
75	740	1,3593517		75	740	0,6
76	750	1,4564483		76	750	0,6
77	760	1,5535448		77	760	0,6
78	770	1,6506414		78	770	0,6
79	780	1,7477379		79	780	0,6
80	790	1,8448345		80	790	0,6
81	800	1,941931		81	800	0,6
82	810	2,0390276		82	810	0,6
83	820	2,1361241		83	820	0,6
84	830	2,2332207		84	830	0,6
85	840	2,3303172		85	840	0,6
86	850	2,4274138		86	850	0,6
87	860	2,5245103		87	860	0,6
88	870	2,6216069		88	870	0,6
89	880	2,7187034		89	880	0,6
90	890	2,8158		90	890	0,6
91	900	2,8158		91	900	0,6
92	910	2,8158		92	910	0,6
93	920	2,8158		93	920	0,6
94	930	2,8158		94	930	0,6
95	940	2,8158		95	940	0,6
96	950	2,8158		96	950	0,6
97	960	2,8158		97	960	0,6
98	970	2,8158		98	970	0,6
99	980	2,8158		99	980	0,6
100	990	2,8158		100	990	0,6
101	1000	2,8158		101	1000	0,6
102	1010	2,8158		102	1010	0,6
103	1020	2,8158		103	1020	0,6
104	1030	2,8158		104	1030	0,6
105	1040	2,8158		105	1040	0,6
106	1050	2,8158		106	1050	0,6
107	1060	2,8158		107	1060	0,6

108	1070	2,8158		108	1070	0,6
109	1080	2,8158		109	1080	0,6
110	1090	2,8158		110	1090	0,6
111	1100	2,8158		111	1100	0,6
112	1110	2,8158		112	1110	0,6
113	1120	2,8158		113	1120	0,6
114	1130	2,8158		114	1130	0,6
115	1140	2,8158		115	1140	0,6
116	1150	2,8158		116	1150	0,6
117	1160	2,8158		117	1160	0,6
118	1170	2,8158		118	1170	0,6
119	1180	2,8158		119	1180	0,6
120	1190	2,8158		120	1190	0,6

Protocolo 60%:

Hoja de datos 5		
Protocolo 3 - Molaridad		
Medición	Tiempo (s)	Molaridad
1	0	0
2	10	0
3	20	0
4	30	0
5	40	0
6	50	0
7	60	0
8	70	0
9	80	0
10	90	0
11	100	0
12	110	0
13	120	0
14	130	0
15	140	0
16	150	0
17	160	0
18	170	0
19	180	0
20	190	0
21	200	0
22	210	0
23	220	0
24	230	0
25	240	0
26	250	0
27	260	0
28	270	0
29	280	0
30	290	0
31	300	0
32	310	0
33	320	0

Hoja de datos 6		
Protocolo 3 - Caudal		
Medición	Tiempo (s)	Molaridad
1	0	0,6
2	10	0,6
3	20	0,6
4	30	0,6
5	40	0,6
6	50	0,6
7	60	0,6
8	70	0,6
9	80	0,6
10	90	0,6
11	100	0,6
12	110	0,6
13	120	0,6
14	130	0,6
15	140	0,6
16	150	0,6
17	160	0,6
18	170	0,6
19	180	0,6
20	190	0,6
21	200	0,6
22	210	0,6
23	220	0,6
24	230	0,6
25	240	0,6
26	250	0,6
27	260	0,6
28	270	0,6
29	280	0,6
30	290	0,6
31	300	0,6
32	310	0,6
33	320	0,6

34	330	0
35	340	0
36	350	0
37	360	0
38	370	0
39	380	0
40	390	0
41	400	0
42	410	0
43	420	0
44	430	0
45	440	0
46	450	0
47	460	0
48	470	0
49	480	0
50	490	0
51	500	0
52	510	0
53	520	0
54	530	0
55	540	0
56	550	0
57	560	0
58	570	0
59	580	0
60	590	0
61	600	1,388E-16
62	610	0,0970966
63	620	0,1941931
64	630	0,2912897
65	640	0,3883862
66	650	0,4854828
67	660	0,5825793
68	670	0,6796759
69	680	0,7767724
70	690	0,873869

34	330	0,6
35	340	0,6
36	350	0,6
37	360	0,6
38	370	0,6
39	380	0,6
40	390	0,6
41	400	0,6
42	410	0,6
43	420	0,6
44	430	0,6
45	440	0,6
46	450	0,6
47	460	0,6
48	470	0,6
49	480	0,6
50	490	0,6
51	500	0,6
52	510	0,6
53	520	0,6
54	530	0,6
55	540	0,6
56	550	0,6
57	560	0,6
58	570	0,6
59	580	0,6
60	590	0,6
61	600	0,6
62	610	0,6
63	620	0,6
64	630	0,6
65	640	0,6
66	650	0,6
67	660	0,6
68	670	0,6
69	680	0,6
70	690	0,6

71	700	0,9709655
72	710	1,0680621
73	720	1,1651586
74	730	1,2622552
75	740	1,3593517
76	750	1,4564483
77	760	1,5535448
78	770	1,6506414
79	780	1,7477379
80	790	1,8448345
81	800	1,941931
82	810	2,0390276
83	820	2,1361241
84	830	2,2332207
85	840	2,3303172
86	850	2,4274138
87	860	2,5245103
88	870	2,6216069
89	880	2,7187034
90	890	2,8158
91	900	2,8158
92	910	2,8158
93	920	2,8158
94	930	2,8158
95	940	2,8158
96	950	2,8158
97	960	2,8158
98	970	2,8158
99	980	2,8158
100	990	2,8158
101	1000	2,8158
102	1010	2,8158
103	1020	2,8158
104	1030	2,8158
105	1040	2,8158
106	1050	2,8158
107	1060	2,8158

71	700	0,6
72	710	0,6
73	720	0,6
74	730	0,6
75	740	0,6
76	750	0,6
77	760	0,6
78	770	0,6
79	780	0,6
80	790	0,6
81	800	0,6
82	810	0,6
83	820	0,6
84	830	0,6
85	840	0,6
86	850	0,6
87	860	0,6
88	870	0,6
89	880	0,6
90	890	0,6
91	900	0,6
92	910	0,6
93	920	0,6
94	930	0,6
95	940	0,6
96	950	0,6
97	960	0,6
98	970	0,6
99	980	0,6
100	990	0,6
101	1000	0,6
102	1010	0,6
103	1020	0,6
104	1030	0,6
105	1040	0,6
106	1050	0,6
107	1060	0,6

108	1070	2,8158
109	1080	2,8158
110	1090	2,8158
111	1100	2,8158
112	1110	2,8158
113	1120	2,8158
114	1130	2,8158
115	1140	2,8158
116	1150	2,8158
117	1160	2,8158
118	1170	2,8158
119	1180	2,8158
120	1190	2,8158

108	1070	0,6
109	1080	0,6
110	1090	0,6
111	1100	0,6
112	1110	0,6
113	1120	0,6
114	1130	0,6
115	1140	0,6
116	1150	0,6
117	1160	0,6
118	1170	0,6
119	1180	0,6
120	1190	0,6

6. BIBLIOGRAFÍA

- Austerlitz, H. *Data Acquisition Techniques Using PCs*. Academic Press. 2003.
- Avis, K. E. *Cryopreservation. Applications in Pharmaceuticals and Biotechnology*. Informa. 1999.
- Bitter, R. &. *Labview. Advanced Programming Techniques*. CRC Press. 20007.
- Blume, P. A. *The LabVIEW Style Book*. Pearson Education. 2007.
- Borini, A. &. *Preservation of Human Oocytes*. Informa healthcare. 2009
- Conway, J. &. *A Software Engineering Approach to LabVIEW*. Prentice Hall PTR. 2003
- Hua, Z. Application of LabVIEW in the Design of Data Acquisition and Signal Processing System of Mechanical Vibration. *International Conference on Mechatronic Science, Electric Engineering and Computer*. 2011.
- Introducing ULx for NI Labview*. Measurement Computing. 2010
- James, K. *PC Interfacing and Data Acquisition*. 2000.
- Larsen, R. W. *LabVIEW for Engineers*. Prentice Hall. 2011.
- Moreno Sáiz, V. M. *Monitorización y Control con Tarjeta de Adquisición de Datos*. Universidad de Cantabria. 2009
- Pallás Areny, R. *Adquisición y Distribución de Señales*. Marcombo. 1993
- Park, J. &. *Practical Data Acquisition for Instrumentation and Control Systems*. Elsevier. 2003
- Pegg, D. E. *The Biophysics of Organ Cryopreservation*. Plenum Press. 1987.
- PMD-1208LS. User's Guide*. Measurement Computing. 2005.
- Qin, Z. &. *Technique of Data Acquisition for Linear Induction Motor based on LabVIEW*. International Symposium on Instrumentation & Measurement, Sensor Network and Automation. 2012.
- Taylor, R. H. *Data Acquisition for Sensor Systems*. Chapman & Hall. 1997.
- Travis, J. &. *LabVIEW for Everyone: Graphical Programming Made Easy and Fun*. Prentice Hall. 2006.
- Wolkers, W. F. *Criopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press. 2015.
- Zhmakin, A. J. *Fundamentals of Cryobiology. Physical Phenomena and Mathematics Models*. Springer. 2009.
- Fahy, G. M. *Physical and biological aspects of renal vitrification*. Organogenesis. 2009.
- Cossins, D. *¿Realmente algún día podremos congelar nuestros óvulos?* BBC. 2014.
- Flores Rivera, E. *Preservación de órganos. Parte IV*. 2008.
- Mínguez, Y. *Estado actual de la criopreservación*. Revista iberoamericana de fertilidad y reproducción humana.
- Atlas de anatomía. Historia ilustrada*. Susaeta.
- Groel Néstor. *Las bombas peristálticas*. Sociedad acuariológica de plata. 2006.
- Luz Mabel Ávila-Portillo, B. *Fundamentos de criopreservación*. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4. 2006.
- Holguín Londoño, G. A. Milena Pérez Londoño, S. Orozco Gutiérrez, A. A. *Curso básico LabVIEW 6i*. Universidad Tecnológica de Pereira. 2002.
- Esteve Chueca, F. Rodríguez Rodríguez J. M. *Ciencias naturales 3º BUP*. Marfil. 1985.