

Escuela Superior de Ingenieros.

Proyecto Fin de Carrera:

**SISTEMA DE CONTROL DE
TEMPERATURA EN BUCLE
ABIERTO.**

Realizado por: Dulce M^a Muñoz del Rey.

Tutor: Antonio José Estepa Alonso.

Sevilla, Julio del 2002.

Agradecimientos.

En un pequeño intento de condensar las vivencias de seis años, quiero agradecer todo su apoyo y ayuda a las principales personas que han dado color y sabor propios a mi experiencia en esta carrera universitaria.

- A mi tutor del proyecto, D. Antonio José Estepa Alonso, y a D. Rafael Estepa Alonso, por su inmenso interés, su escucha y su exquisito trato personal, acompañados de su gran aporte profesional.
 - A mis padres, por hacerme sentir tan respaldada y protegida en cada paso que he dado en la vida y regalarme una estabilidad preciosa, en la que siempre han encontrado la respuesta exacta a cada problema. Por haber puesto a sus hijos siempre los primeros en sus prioridades y habernos regalado una vida de entrega con todo el amor del mundo. Por ser las mejores personas que conozco, las que más respeto, las que más admiro y las que más amo.
 - A Cari Carrillo, por las veces que me ha hecho reír, por las noches de insomnio y café, por las noches de copitas porque todas no iban a ser iguales, por entender tan bien todas mis excentricidades, por adivinarme siempre, por su preciosa sensibilidad, por su generosidad asombrosa y por su fidelidad incondicional. A sus padres, por su trato delicioso conmigo.
 - A Rajesh Mhatani, por nuestra alianza perfecta, por hacer la carrera a medias y haberme colocado siempre como heredera primera de todos sus apuntes, por haber sabido endulzar cualquier momento amargo. Por su ingenioso sentido del humor, por haberme dado todo lo que ha estado siempre en su mano, por escucharme, por el sentido tan hermoso que tiene de la amistad. Por ser una persona asombrosamente recta y un maestro en tolerancia.
 - A José Valor, porque hace de la sencillez una virtud para convertirse en la persona más cercana del mundo, por la alegría que derrocha, por los momentos tan buenos que hemos pasado, por la confianza que irradia y por la que ha depositado en mí.
 - A María José Jurado, por ser un ser diferente, por la magia que desprende y por la belleza y la sensibilidad que encierra. Por enseñarme tantas cosas, por regalarme su fragilidad, por su apoyo en cada instante y por el cariño con el que envuelve todo lo que hace.
 - Al Colegio Mayor “La Luz” de Sevilla, por encerrar los recuerdos de los años más felices de mi vida.
-

ÍNDICE.

1	Introducción.....	1-5
1.1	Justificación de la necesidad del proyecto.....	1-6
1.1.1	Deficientes resultados del corazón artificial.....	1-6
1.1.2	Posibilidad de crear “bancos de órganos”.	1-7
1.1.3	Automatización de la criopreservación.	1-8
1.2	Entidades participantes.	1-10
1.2.1	Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla.	1-10
1.2.2	Hospitales Universitarios Virgen de la Macarena y Virgen del Rocío.....	1-10
2	Objetivos y alcance.....	2-1
2.1	Objetivos.....	2-1
2.1.1	Objetivos generales.....	2-1
2.1.2	Objetivos desglosados.	2-2
2.2	Alcance.	2-4
3	Análisis previo. Situación actual.	3-1
3.1	Antecedentes generales.....	3-1
3.2	Fundamentos fisiológicos del proyecto.	3-2
3.2.1	Bases fisiológicas de los transplantes de corazón.	3-2
3.2.1.1	Problema del rechazo de tejidos	3-2
3.2.1.2	Problema de la conservación de los órganos.	3-3
3.2.2	Bases de la Criobiología.	3-5
3.2.2.1	Susceptibilidad y Resistencia en la Naturaleza.	3-5
3.2.2.2	Proceso Congelación-Secado.....	3-8
3.2.2.3	Sobreenfriamiento.....	3-8
3.2.2.4	Criopreservación.....	3-9
3.2.2.4.1	Reversibilidad funcional.....	3-9
3.2.2.4.2	Vitrificación versus Congelación.	3-10
3.3	Fundamentos termodinámicos del proyecto.	3-10
3.3.1	Bases termodinámicas del enfriamiento celular.	3-11
3.4	Fundamentos técnicos del proyecto.....	3-12
3.4.1	Introducción a los Sistemas de Control.	3-12
3.4.2	Sistema de Control de la máquina de Landendorff.	3-14
3.4.2.1	Control Independiente de Temperatura y Concentración.	3-14
3.4.2.2	Control exclusivo de temperatura.	3-18
3.4.3	Bombas peristálticas.	3-21
3.4.3.1	Cabeza giratoria.	3-21
3.4.3.2	Motor.	3-21
3.4.3.3	Tubos.	3-22
3.4.3.4	Clasificación.	3-22
3.4.4	Tarjetas de adquisición de datos.....	3-23
3.4.4.1	Visión general de una tarjeta de adquisición de datos.....	3-23
3.4.4.1.1	Conversión Analógica-Digital A/D.	3-24

3.4.4.1.2	Conversión Digital-Analógica D/A.....	3-24
3.4.4.1.3	Entradas-Salidas Digitales (I/O digitales).	3-24
3.4.4.1.4	Rangos de entrada.....	3-25
3.4.4.1.5	Tipos de entradas.....	3-26
3.4.4.1.6	Velocidad. Throughput.....	3-26
3.4.4.1.7	Salidas analógicas.....	3-27
3.4.4.1.8	Método de transferencia de datos.....	3-27
3.4.4.1.8.1	Bus ISA.....	3-28
3.4.4.1.8.2	Bus PCI.....	3-28
3.4.4.1.8.3	PC Card Bus.....	3-30
3.4.4.2	Bus PCI.....	3-31
3.4.5	Herramientas de desarrollo software.....	3-36
3.4.5.1	Entorno de programación: HP VEE Y DT VPI.....	3-36
3.4.5.1.1	Arquitectura de capas abiertas.....	3-37
3.4.5.1.2	Características de HP VEE.....	3-38
3.4.5.1.3	Características de DT VPI.....	3-39
3.4.5.1.4	Requerimientos del sistema.....	3-40
4	Descripción global de la solución.....	4-1
4.1	Introducción y descripción del proyecto.....	4-1
4.1.1	Descripción de objetivos.....	4-1
4.1.1.1	Control independiente de concentración y temperatura	4-2
4.1.1.1.1	Especificación de temperatura.....	4-2
4.1.1.1.2	Especificación de concentración.....	4-4
4.1.1.1.3	Especificación de volumen.....	4-5
4.1.1.1.4	Modelado.....	4-5
4.1.1.2	Control exclusivo de temperatura.....	4-6
4.1.1.2.1	Modelado.....	4-7
4.2	Soluciones alternativas y antecedentes generales.....	4-9
4.2.1	Procedimientos anteriores: técnicas de hipotermia.....	4-9
4.2.2	Prototipos de sistemas anteriores.....	4-9
4.3	Descripción y Justificación de la solución adoptada. Análisis de la solución.....	4-11
4.3.1	Estudio de la criopreservación	4-11
4.3.1.1	Principios de la Criobiología.....	4-11
4.3.1.1.1	Estudios fisicoquímicos de la formación de hielo.....	4-12
4.3.1.1.2	Estudios biofísicos de la formación de hielo.....	4-12
4.3.1.1.3	Estudios biológicos de la formación de hielo.....	4-15
4.3.1.2	Metodología de la criopreservación.....	4-17
4.3.1.2.1	Sustancias crioprotectoras.....	4-17
4.3.1.2.2	Enfriamiento.....	4-18
4.3.1.2.3	Almacenamiento.....	4-20
4.3.1.2.4	Calentamiento.....	4-20
4.3.1.3	Criopreservación de tejidos.....	4-21
4.3.1.3.1	Diferencias intrínsecas entre células cultivadas y aisladas... ..	4-21
4.3.1.3.2	Limitaciones en el transporte de masa en la criopreservación de tejidos.....	4-22
4.3.1.3.3	Limitaciones en el transporte de calor en la preservación de tejidos.....	4-24
4.3.1.3.4	Daños de la congelación en los tejidos.....	4-24

4.3.2	Desarrollo Hardware de la máquina de Langendorff	4-26
4.3.2.1	Montaje de laboratorio hospitalario.....	4-26
4.3.2.1.1	Definición de las bombas empleadas.....	4-27
4.3.2.1.2	Elementos adicionales de una máquina de Langendorff.....	4-28
4.3.2.2	Montaje electrónico.....	4-28
4.3.3	Desarrollo Software de la máquina de Langendorff.....	4-29
4.3.3.1	Módulo Interfaz.....	4-31
4.3.3.1.1	Determinación del perfil de criopresevación.....	4-32
4.3.3.1.2	Tareas a realizar.....	4-33
4.3.3.1.3	Diseño conceptual.....	4-34
4.3.3.1.4	Particularización.....	4-36
4.3.3.2	Módulo Muestreo.....	4-37
4.3.3.2.1	Justificación de la necesidad de muestreo.....	4-39
4.3.3.2.2	Reloj local.....	4-40
4.3.3.2.3	Tareas a realizar.....	4-41
4.3.3.2.4	Diseño conceptual.....	4-42
4.3.3.2.5	Particularización.....	4-44
4.3.3.3	Módulo Caudal.....	4-45
4.3.3.3.1	Sistema de ecuaciones para el cálculo de caudales.....	4-46
4.3.3.3.2	Resolución del sistema de ecuaciones.....	4-48
4.3.3.3.3	Tareas a realizar.....	4-49
4.3.3.3.4	Diseño conceptual.....	4-50
4.3.3.3.5	Particularización.....	4-52
4.3.3.3.5.1	Sistema de ecuaciones para el cálculo de caudales.....	4-53
4.3.3.3.5.2	Simplificación en la definición de matrices.....	4-54
4.3.3.3.5.3	Tareas a realizar.....	4-54
4.3.3.3.5.4	Diseño conceptual.....	4-55
4.3.3.4	Módulo Salida Analógica.....	4-57
4.3.3.4.1	Riqueza de la programación empleada.....	4-57
4.3.3.4.2	Tareas a realizar.....	4-58
4.3.3.4.3	Particularización.....	4-59
4.3.3.4.4	Solución alternativa.....	4-59
5	Descripción por subsistemas.....	5-1
5.1	Hardware de la máquina de Langendorff.....	5-2
5.1.1	Bombas peristálticas.....	5-2
5.1.2	Tarjeta de adquisición de datos.....	5-4
5.1.2.1	Instalación de la tarjeta.....	5-5
5.1.3	Conexionado.....	5-7
5.1.3.1	Control independiente de temperatura y concentración.....	5-8
5.1.3.2	Control exclusivo de temperatura.....	5-10
5.1.4	Medidas experimentales del caudal.....	5-11
5.1.4.1	Metodología de la medición de la función de transferencia.....	5-12
5.1.4.2	Resultados obtenidos.....	5-14
5.1.4.3	Formulación matemática.....	5-15
5.2	Software de la máquina de Langendorff.....	5-19
5.2.1	Conceptos básicos de HP VEE.....	5-22
5.2.2	Implementación del Módulo Interfaz.....	5-23
5.2.2.1	Captura de entradas de usuario.....	5-23
5.2.2.1.1	Dificultades de la captura de datos de entrada.....	5-26
5.2.2.2	Generación del sincronismo.....	5-27

5.2.2.2.1	Detección de la llegada del instante inicial de un intervalo.	5-28
5.2.2.2.2	Artificio para disminuir la velocidad de autoincremento de For Count.	5-28
5.2.2.2.3	Utilidad del comparador.	5-29
5.2.2.2.4	Objeto de Usuario “Recorre Matriz Steps”.	5-31
5.2.2.3	Actualización de valores de salida.	5-33
5.2.2.3.1	Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo”.	5-34
5.2.2.3.1.1	Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo inicial”.	5-34
5.2.2.3.1.2	Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo final”.	5-35
5.2.2.3.2	Objeto de Usuario “Recorre Temperaturas y Concentración”.	5-36
5.2.2.3.2.1	Objetos “Recorre Concentración” y “Recorre Temperaturas(i)”.	5-36
5.2.2.3.2.2	Objeto “Recorre Temperaturas(ii)”.	5-37
5.2.3	Implementación del Módulo Muestreo.	5-38
5.2.3.1	Limitaciones de la tarjeta de adquisición de datos.	5-39
5.2.3.2	Frecuencia de muestreo.	5-40
5.2.3.3	Procedimiento de muestreo.	5-40
5.2.3.4	Generación de un reloj local.	5-44
5.2.3.4.1	Fundamento de la generación de un reloj local.	5-45
5.2.3.4.2	Objeto Contador.	5-45
5.2.3.4.3	Bloque iterativo.	5-46
5.2.3.4.4	Comparador.	5-48
5.2.3.4.5	Calibración del tiempo.	5-49
5.2.4	Implementación del Módulo Caudal.	5-51
5.2.5	Implementación de la Función de Transferencia.	5-59
5.2.6	Implementación del Módulo Salida Analógica.	5-60
5.2.7	Interfaz de la aplicación con el usuario.	5-64

1 INTRODUCCIÓN.

El presente proyecto presenta una solución alternativa al proceso de storage o almacenamiento en frío de los órganos en espera de ser transplantados en un paciente necesitado, por lo que es una implementación multidisciplinar, que trenza nociones de Medicina e Ingeniería para obtener un prototipo de un sistema de control y monitorización de la conservación del corazón.

Los trasplantes de corazón se realizan cuando los órganos correspondientes al paciente han sufrido lesiones irreparables, como ocurre en los infartos de miocardio y en diferentes miocardiopatías, dilatadas e hipertróficas. Actualmente tienen una tasa aceptable de éxito, pero deben ser realizados únicamente en centros médicos especializados. Desde que en 1967 el cirujano sudafricano Chistiaan Barnard llevó a cabo el primer trasplante de corazón, han surgido múltiples soluciones, fruto de la investigación conjunta de profesionales de diversas ramas de la Ciencia y la Técnica, para solucionar tanto el problema del rechazo del órgano en el cuerpo del nuevo receptor como la cuestión de la conservación del corazón vivo en el intervalo de tiempo que transcurre entre el momento de la extracción del donante hasta que se puede transplantar en la otra persona receptora.

En principio el mayor problema fue la tendencia natural del organismo a rechazar los tejidos ajenos, el cual fue solucionado por la Medicina a principios de la década de 1980 con el empleo de fármacos inmunosupresores, en particular la ciclosporina. Por su parte la Criobiología se ha encargado del problema de la conservación y almacenamiento de los órganos, partiendo del estudio de los sistemas vivos a cualquier temperatura por debajo del rango estándar fisiológico: resistencia y susceptibilidad al frío en plantas, insectos y vertebrados, procesos de congelación y secado, sobreenfriamiento, criocirugía, congelación y criopreservación.

Este proyecto se une a esta línea de investigación de la Bioingeniería, que aplica los principios de ingeniería y procedimientos de diseño para resolver problemas médicos. Seguirá en particular la conclusión a la que ha llegado la Criobiología de utilizar las temperaturas bajo cero en el almacenamiento de los órganos, con la implementación de una mejora de anteriores intentos de fabricación de una máquina de Langendorff para la conservación del corazón en frío. La criopreservación consiste en mantener las muestras biológicas en un estado de “animación suspendida” a temperaturas criogénicas (temperaturas más bajas del rango estándar fisiológico).

Se ha observado que durante el enfriamiento del órgano, para evitar que se congelen los tejidos con su consiguiente destrucción, es muy aconsejable la inyección de anticongelante, diluido en agua para que resulte menos tóxico. Esta máquina de Langendorff consta de dos bombas peristálticas que toman de sus baños respectivos ciertas cantidades de anticongelante y otras dos bombas peristálticas que propulsarán de otros dos baños otros volúmenes de agua. Estas cuatro cantidades se mezclarán en una sola, que se inyecta automáticamente al corazón a cierta temperatura y en cierta concentración, adecuadas en cada instante para las condiciones necesarias para su supervivencia. Este sistema de cuatro bombas está controlado desde un ordenador, que

realiza todas las funciones de procesamiento para permitir un control independiente de la temperatura y de la concentración de la disolución total, así como las funciones de interfaz con el usuario de la máquina. Así mismo existe también la posibilidad de implementar un primer prototipo con tan sólo dos bombas, en la que la concentración viene ya determinada, una vez que seleccionamos la temperatura deseada de la mezcla total.

1.1 JUSTIFICACIÓN DE LA NECESIDAD DEL PROYECTO.

A continuación se presenta un análisis de las motivaciones que hacen necesario el desarrollo de esta máquina de Langendorff, tanto en su versión de 2 bombas como con 4 bombas, que presenten control independiente de la concentración y la temperatura.

1.1.1 DEFICIENTES RESULTADOS DEL CORAZÓN ARTIFICIAL.

Desde la década de 1950 se han desarrollado progresivamente los corazones artificiales. En 1966 se implantó con éxito por primera vez una bomba auxiliar de propulsión como una medida transitoria, y al menos un dispositivo de este tipo se mantuvo activo durante varios años. En 1969 se implantó el primer corazón artificial en un ser humano, de nuevo como medida temporal.

El primer corazón artificial permanente, diseñado por Robert Jarvik fue implantado en 1982 a un paciente que sobrevivió tres meses. Desde aquel momento gran número de pacientes han recibido el corazón artificial de Jarvik y otros corazones artificiales, pero, los pacientes que sobreviven tienen tendencia a sufrir accidentes cerebrovasculares y otros problemas.

Durante los primeros meses de 1980, el doctor William DeVries implantó el corazón artificial Jarvik-7 en pacientes graves. Aunque uno de los pacientes con un Jarvik-7 implantado sobrevivió 620 días, este corazón artificial causó muchas complicaciones médicas serias. En el presente, los corazones artificiales se usan sólo de manera temporal, hasta recibir un corazón humano adecuado.

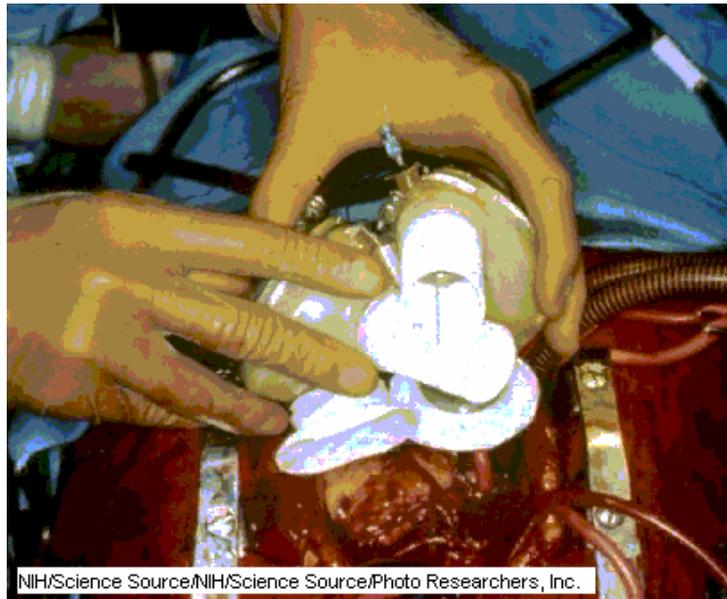


Fig.1. Corazón artificial Jarvik

Todo esto nos lleva a pensar que la solución definitiva para el paciente es recibir otro corazón de la misma naturaleza, por lo que los estudios deben centrarse en mejorar esta técnica que reduce el rechazo del organismo, más tolerante a los tejidos humanos que a un artefacto artificial que bombee la sangre y que además elimina el riesgo de las complicaciones circulatorias y las lesiones cerebrales.

1.1.2 POSIBILIDAD DE CREAR “BANCOS DE ÓRGANOS”.

Una vez elegido el corazón humano como mejor sustituto de él mismo y solucionada por la Medicina la cuestión del rechazo con el empleo de fármacos inmunosupresores, en particular la ciclosporina, sólo quedan buscar los caminos para conservar el corazón durante el tiempo intermedio entre la extracción y la implantación. Así este proyecto se hace necesario para alargar la vida del corazón que va a ser transplantado, mejorando sus condiciones de conservación al ser completamente controladas y monitorizadas por un ordenador. Así podría pensarse que si la técnica de almacenamiento de órganos fuese concienzudamente estudiada y mejorada, podríamos tener grandes reservas de corazones conservados en frío, de modo que en cualquier instante que se requiriese un trasplante, habría un órgano disponible y se eliminaría el problema de encontrar un corazón adecuado en un tiempo tan ajustado como el que se requiere actualmente.

La novedad del proyecto es que persigue la preservación y posterior almacenamiento del corazón humano prescindiendo de la técnica de **hipotermia** que es la que se utiliza actualmente y con la que se consigue tan solo una tasa de 4 a 6 horas de vida del órgano preservado. Se sigue otra nueva técnica llamada **enfriamiento criogénico**, que persigue la capacidad de almacenamiento indefinido, y que aumente espectacularmente el tiempo de criopreservación del corazón sin que se produzcan daños celulares.

Se elige como técnica de conservación el frío, y para evitar que crezca hielo dentro del órgano, destruyendo irreparablemente tejidos, la máquina que desarrollamos en este proyecto inyecta automáticamente en el corazón un anticongelante diluido. Esta disolución inyectada no tendrá siempre las mismas propiedades durante todo el proceso de almacenamiento (storage) del corazón. Su temperatura y concentración irán variando a medida que transcurre el tiempo, según cierto perfil elegido por el especialista, basándose en la idea de que el crioprotector será tanto menos tóxico cuanto más frío esté el corazón.

1.1.3 AUTOMATIZACIÓN DE LA CRIOPRESERVACIÓN.

El cirujano tan sólo tendrá que elegir el perfil de temperaturas y concentración de la disolución, que se inyectará automáticamente en el corazón, a lo largo del tiempo que se requiera para tener enfriado el órgano y que quede en las condiciones ideales para poder permanecer en espera hasta poder realizar la operación de trasplante. De este modo, el cirujano queda libre de esta tarea de ir variando manualmente las temperaturas de los baños de soluto y disolvente y de ir cambiando los volúmenes que toma de cada baño en cada uno de los intervalos de tiempo que requiere la conservación y almacenamiento del órgano a transplantar. Se reduce por tanto el probable error humano que aparecería al requerir tanta rapidez, exhausta atención y habilidad manual la tarea de ir variando todos estos parámetros secuencialmente y en un largo período de tiempo de hasta varias horas. Todo ello es posible gracias al control automático que ofrece esta máquina, por su soporte software de procesamiento de datos, cálculo de acciones de control y salidas de datos analógicas para las bombas que actúan de dispositivos pasivos y controlados.

De la misma manera el órgano queda expuesto simplemente al frío y a la disolución inyectada, sin necesidad de ser manipulado continuamente por el médico, con el riesgo de alteración e introducción de ruidos que podrían variar negativamente sus condiciones de conservación.

Nuestra máquina presenta la ventaja de poseer una interfaz con el usuario, por lo que los parámetros son totalmente libres cada vez que ejecutamos el programa y por tanto iniciamos el proceso de conservación de un órgano. Dicha interfaz es cómoda de usar, sencilla y de atractiva apariencia, consistiendo en tres simples tablas donde el cirujano introduciría las distintas temperaturas, las distintas concentraciones de las disoluciones y los instantes de tiempo significativos en los que quiere que se produzca un cambio de concentración en la sustancia inyectada en el corazón. Una vez introducidos estos datos, el usuario acaba con su misión y pasa a ejecutarse el programa software residente en el disco duro de nuestro PC y en tiempo real las bombas peristálticas comienzan a administrar las cantidades solicitadas, a las temperaturas deseadas en cada instante, para que la mezcla total inyectada en el corazón cumpla con el perfil especificado por el usuario como entrada del programa.

Otra de las ventajas que aporta el hecho de que todo el control de almacenamiento y conservación del corazón sea automático y controlado por un ordenador, es que el médico encargado de mantener vivo el órgano pueda ocuparse de otras funciones también útiles, como realizar un electrocardiograma (ECG) para ver la

correcta evolución del corazón. El electrocardiograma registra la actividad eléctrica del corazón. Un impulso eléctrico, generado en el nódulo sino-auricular, precede a cada contracción del músculo cardiaco; las ondas dibujadas en un ECG trazan el recorrido de estos impulsos tal y como se propagan en el corazón. Las irregularidades del ECG reflejan trastornos en el músculo, en el aporte de sangre neural o en el control neuronal del corazón.

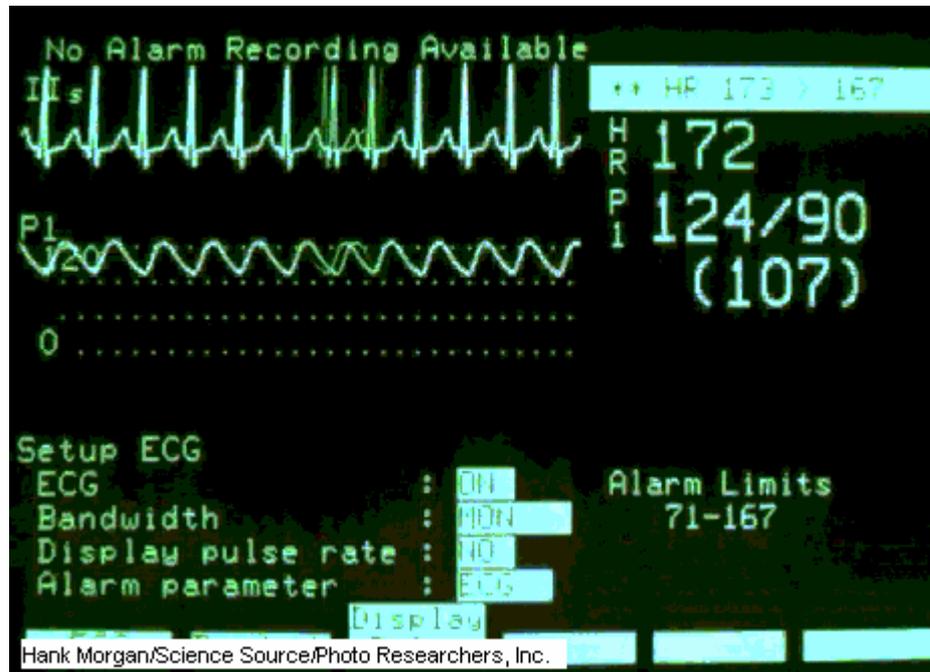


Fig.2 Electrocardiograma

En vista de los resultados que arrojará progresivamente el electrocardiograma, en caso de que el corazón esté respondiendo anómalamente y pueda requerir un cambio de tratamiento, sin detener el programa podría introducir un nuevo perfil más drástico que podría acelerar la supervivencia del órgano conflictivo, y sin pérdida alguna de tiempo porque durante la introducción de los nuevos datos el programa ha seguido ejecutándose y por tanto inyectando al corazón la disolución inicialmente programada. Una vez introducido el nuevo perfil, tan solo ha de detener el programa y arrancarlo de nuevo, lo cual le llevaría escasos segundos y en los que las bombas seguirían funcionando por mínima inercia. Así el corazón no ha sufrido una supresión de disolución aunque se ha reiniciado la máquina.

1.2 ENTIDADES PARTICIPANTES.

Para el desarrollo del proyecto es necesario contar con un grupo de trabajo multidisciplinario que engloba a Ingenieros, Físicos, Médicos, etc, lo cual genera sin duda un grupo importante de recursos humanos con información especializada sobre aspectos concretos de la conservación criogénica. Ello permitirá plantearse retos científico-tecnológicos de especial relevancia que pueden concretarse en futuros proyectos de gran interés, involucrando instituciones, empresas públicas y privadas, centros de investigación etc. con intereses científicos, tecnológicos o empresariales. De esta forma al final del proyecto estaríamos en la situación óptima para crear un grupo de trabajo en el campo de la Ingeniería Biomédica con posibilidades reales de afrontar nuevos retos científico-tecnológicos.

1.2.1 ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS DE SEVILLA.

La Investigación y Desarrollo (I+D) se concentra en los distintos Departamentos y Laboratorios, cuya finalidad es servir de ejemplo en el proceso de trasvase de la I+D a la demostración y a la producción. La infraestructura disponible para la prestación de servicios tecnológicos hacen posible las actividades que se encuadran en el marco del presente proyecto:

- ✓ Material necesario para la implementación.
- ✓ Laboratorios para la realización, ensayos y pruebas del prototipo.
- ✓ Proyectos de innovación.
- ✓ Formación y difusión científica y tecnológica.

1.2.2 HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DE LA MACARENA Y VIRGEN DEL ROCÍO.

Mediante la participación en el presente proyecto de algunos sectores de dichos Hospitales, relacionados con la Biofísica y la Cardiología, se profundizará en la utilización de las técnicas de criopreservación de órganos, aportando parte de su instrumentación, conocimientos y tecnología, y extrayendo previsiblemente de la colaboración la oportunidad de mantener y potenciar la existencia de profesionales formados en dichas técnicas.

Esta interacción con el personal médico nos permite poder experimentar la máquina de Langendorff con corazones de animales, tales como ratas, conejos y cerdos, extraídos en laboratorios experimentales, y poder ver así el correcto funcionamiento de la máquina, la criopreservación de estos órganos y observar si se produce la esperada reversibilidad funcional del corazón tras haber sufrido el proceso de enfriamiento criogénico.

2 OBJETIVOS Y ALCANCE.

2.1 OBJETIVOS.

2.1.1 OBJETIVOS GENERALES.

El presente proyecto está orientado fundamentalmente hacia la criopreservación de órganos y pretende como objetivo principal desarrollar un prototipo de la máquina de Langendorff, usada como herramienta para conservar y almacenar el órgano en espera a ser transplantado. Se diseñarán 2 prototipos de máquina:

- ✓ Un primer modelo con 2 bombas. Se tendrá únicamente control sobre la temperatura de la disolución inyectada en el corazón, dejando la concentración como parámetro dependiente. En este primer modelo se evalúa el funcionamiento de la técnica de criopreservación escogida para que el modelo constituya así un primer paso sólido para sucesivas mejoras del sistema.
- ✓ Un segundo modelo con 4 bombas. Es el resultado de una pequeña generalización en las ecuaciones matemáticas que rigen el sistema de 2 bombas, teniendo como resultado en este segundo modelo de la máquina un control independiente de la temperatura y la concentración del agente crioprotector que inyectamos al enfriar el órgano.

Otro objetivo es abarcar también las investigaciones necesarias para lograr la correcta funcionalidad del sistema, así como las pruebas, optimizaciones y validaciones necesarias para una eficaz conservación de los órganos criopreservados, y también las actividades colaterales que dejen al conjunto en condiciones de abordar su fabricación.

Este proyecto es la continuación lógica de los trabajos realizados por físicos y médicos a la hora de determinar teóricamente las condiciones fisicoquímicas, biofísicas, cinéticas, etc... más apropiadas para conservar un corazón, los cuales nos han permitido validar la idea expuesta mediante la construcción de un prototipo de experimentación.

De forma general, los objetivos del proyecto son:

1. Desarrollo de un prototipo que permita la criopreservación y posterior almacenamiento en frío del corazón humano, sin usar la técnica de hipotermia que se utiliza actualmente y con la que se consigue una tasa de 4 a 6 horas de vida del órgano preservado, y desarrollando por tanto la nueva técnica del enfriamiento criogénico, que persigue la capacidad de almacenamiento indefinido.

Una vez estudiado el enfriamiento criogénico y el fundamento de una máquina de Langendorff y demostrada la viabilidad de la criopreservación

de órganos a temperaturas criogénicas, el objetivo natural siguiente ha de ser desarrollar un prototipo de la máquina mejorada por el control independiente de la temperatura y la concentración, y experimentar con órganos animales, ya que tan solo se trata de un prototipo y no se podría experimentar arriesgando vidas humanas que realmente necesitan un órgano que podría ser criopreservado sin éxito en nuestros experimentos.

2. Estudio de la metodología de la criopreservación de órganos, de la termodinámica del enfriamiento celular, los aspectos físico-químicos y biofísicos de la formación de hielo.
3. Determinación del perfil ideal de temperaturas y concentraciones que recibe como entrada la máquina de Langendorff.
4. Que a la terminación del proyecto se disponga de los elementos científicos, técnicos y documentales necesarios para abordar la fabricación de la máquina de Langendorff con un control independiente de la temperatura y la concentración.

2.1.2 OBJETIVOS DESGLOSADOS.

Los objetivos generales descritos pueden desglosarse en otros más específicos de la siguiente forma:

- ✓ Profundización en las técnicas de criopreservación de órganos en frío.
- ✓ Optimización de la velocidad de enfriamiento del órgano.
- ✓ Estudio de las concentraciones del anticongelante, que no deben ser demasiado altas para que no resulten dañinas al inyectarlas en el corazón.
- ✓ Estudio de las concentraciones del anticongelante, que deben ser suficientemente altas para evitar la formación de cristales, al inyectarlas en el corazón.
- ✓ Determinación de la curva ideal de concentraciones a lo largo del tiempo.
- ✓ Determinación del perfil ideal de temperaturas a lo largo del tiempo.
- ✓ Especificaciones sobre la tasa de muestreo de la curva continua de temperaturas propuesta por el usuario de la máquina.
- ✓ Registro de la aparición de la actividad eléctrica y mecánica del corazón tras la criopreservación para comprobar su reversibilidad funcional .

- ✓ Estudio de las características de la tarjeta de adquisición de datos instalada en el PC que controla todo el sistema.
- ✓ Diseño conceptual del sistema completo a partir de los recursos reales de los que se dispone.
- ✓ Calibraciones para conseguir el funcionamiento en tiempo real de la máquina de Langendorff.
- ✓ Estudio del tiempo de respuesta de la máquina.
- ✓ Estudio de la compatibilidad eléctrica, conectores y niveles de tensión, entre las salidas analógicas de la tarjeta del PC y las bombas peristálticas disponibles para el sistema.
- ✓ Determinación de la relación entre la tensión aplicada y el caudal que suministran las bombas peristálticas integradas en el sistema.
- ✓ Diseño con materiales aislantes de los tubos e interconexiones que transportan los fluidos bombeados, para que minimicen las pérdidas térmicas y no se altere la temperatura de los líquidos que transportan durante su corto trayecto hasta su inyección en el órgano tratado.
- ✓ Estudio de pérdidas térmicas introducidas por la temperatura de la habitación y no idealidades de los aislantes empleados.
- ✓ Modelado de las pérdidas en un factor de corrección, adecuado al rango de temperaturas de trabajo, que optimice el bucle abierto en el que trabaja el sistema.
- ✓ Diseño de la aplicación software para la máquina de Langendorff con control independiente de temperatura y concentración.
- ✓ Diseño de la aplicación software para la máquina de Langendorff con control exclusivo de temperatura, para que sirva de primer paso en la prueba de implementación física de la máquina y en la integración del software con el hardware.
- ✓ Diseño de una interfaz gráfica sencilla para el usuario, donde sólo se le muestren sus entradas de datos y aquellos valores que le pueden resultar de interés durante la ejecución del programa. Así se evita que el usuario tenga que acceder a los bloques de programación para introducir sus datos o visualizar otros, porque los parámetros de interés son monitorizados en una atractiva presentación.
- ✓ Construcción automática via software de una gráfica que represente frente al tiempo las temperaturas seleccionadas por el usuario, para aportarle una mayor comprensión de la velocidad de enfriamiento seleccionada.

- ✓ Elaboración de documentación para difusión del proyecto por Internet a través de la página web de criopreservación del Grupo de Investigación del Departamento de Física Aplicada.
- ✓ Elaboración de documentación detallando los subsistemas software en los que se dividen las dos aplicaciones diseñadas, para los sistemas de 2 y 4 bombas, que permitan un conocimiento más profundo de los mecanismos de control de la máquina de Langendorff implementada.

2.2 ALCANCE.

El proyecto incluye las siguientes actividades:

- ✓ Búsqueda de documentación acerca de las técnicas de criopreservación de órganos, recogida de estudios y artículos más recientes, análisis de los últimos avances en la criogenización, estudio detallado de aspectos fisiológicos, físicos y químicos del corazón como órgano vivo, análisis de la termodinámica del enfriamiento celular.
- ✓ Participación en los Seminarios organizados por el tutor del proyecto, para que todos aquellos proyectos relacionados con la criopreservación de órganos estén interconectados y mutuamente enriquecidos por la experiencia y las investigaciones realizadas por cada uno.
- ✓ Diseño teórico de un prototipo de la máquina de Langendorff en sus dos versiones: con control independiente de temperatura y concentración y con control exclusivo de la temperatura.
- ✓ Implementación software de ambos prototipos mediante programación.
- ✓ Pruebas del software y consecuentes modificaciones del mismo ante errores.
- ✓ Implementación hardware del prototipo mediante conexionado adaptado de las bombas peristálticas.
- ✓ Pruebas del hardware y modificaciones en los componentes electro-mecánicos del montaje y en sus conexiones.
- ✓ Integración de los elementos software y hardware de la máquina.
- ✓ Calibración para ajustar la temporización y sincronización del sistema.
- ✓ Calibración para ajustar la función de transferencia entre la tensión que reciben las bombas peristálticas y el caudal de fluido que suministran.
- ✓ Estudio de pérdidas térmicas y modelado de las mismas, para introducir un factor de corrección de temperatura en el sistema, para el rango de temperaturas típico de trabajo.

- ✓ Observación de la reversibilidad funcional del corazón.
- ✓ Difusión del proyecto. Esto incluye la realización de un documento sobre el mismo, la aportación a la página de web de criopreservación que mantiene el Grupo de Bioingeniería, y la posible publicación de artículos en alguna revista científica, así como posibles presentaciones posteriores en congresos.

3 ANÁLISIS PREVIO. SITUACIÓN ACTUAL.

Antes de abordar una descripción global de la solución adoptada para aportar un nuevo procedimiento de criopreservación de órganos, y profundizar posteriormente en una descripción por subsistemas de la máquina de Langendorff implementada, resulta inevitable realizar un breve recorrido por los antecedentes generales que arrojan luz sobre este proyecto, y analizar los resultados de múltiples investigaciones desarrolladas con anterioridad en este campo de criogenización. Así mismo, sentaremos las bases fisiológicas, físicas y técnicas que dan paso al diseño completo de una máquina de Langendorff basada en control por ordenador.

3.1 ANTECEDENTES GENERALES.

La búsqueda de soluciones al problema de los trasplantes, la conservación de órganos una vez extraídos del paciente donante y aún no implantados en la persona receptora, las consecuencias de la conservación sobre el metabolismo y funcionalidad del órgano, se ha intentado desde hace mucho tiempo tanto desde el punto de vista puramente médico-quirúrgico como planteando alternativas en el campo tecnológico. Las soluciones médico-quirúrgicas se han centrado en el tratamiento con sustancias inmunosupresoras para evitar el rechazo del órgano, técnicas de hipotermia para conservar el órgano durante un espacio reducido de horas, inyección de soluciones cardioplégicas cristalinas en el órgano, ensayos de criopreservación con células aisladas como primera aproximación a la criopreservación de órganos enteros, etc...

Este proyecto de criopreservación se encuentra con los antecedentes de Bijan S. Khirabadi y Gregori Fahy, con sus trabajos desarrollados sobre trasplantes de riñón de conejo perfundido con EC (Euro-Collins solution) y RPS-2 (renal preservation solution) a 2-4°C durante 5 horas. La perfusión fue ejecutada por un sistema controlado por ordenador. Dicho sistema inyectaba y eliminaba la disolución propuesta y en tiempo real podía monitorizar, corregir, mostrar y grabar la resistencia vascular, el caudal de perfusión, la presión de perfusión y la temperatura de las venas y arterias, consiguiendo unas tasas de supervivencia elevadísimas. Sus experimentos fueron la primera evidencia de que un órgano sensible de un mamífero podía tolerar perfusión, sin perder su funcionalidad, con una concentración de crioprotector capaz de producir vitrificación. Anteriormente se sabía que el tejido renal podía resistir exposiciones a soluciones de vitrificación, así como los tejidos de músculo que no necesitaban recirculación de la sangre, pero era el primer experimento en demostrar que el sistema vascular también podía mantener su integridad tras tal exposición.

También contamos con el referente cercano de la tesis doctoral de Encarna Gutiérrez-Carretero, que también constituye otro acercamiento a la técnica de criopreservación de tejidos, en el que no se utiliza una máquina sino que todos los cambios de concentración y temperatura se llevan a cabo manualmente. En estos experimentos, la temperatura de la solución crioprotectora cambiaba en escalón, en lugar de hacerlo gradualmente entre valores muy próximos que asemejaban un perfil continuo de temperaturas frente al tiempo. Estos cambios de temperaturas parecen ser muy bruscos para conseguir una adecuada respuesta de los tejidos, por lo que optamos

por un perfil de temperaturas continuo en el desarrollo de la máquina de Langendorff presentada, en sus versiones de 2 y 4 bombas. Esto se consigue gracias al software, que en sus labores de procesamiento incluye la de interpolar entre todas las temperaturas introducidas por el usuario de la máquina, para construir un perfil continuo y que el corazón reciba cambios de temperatura muy graduales. En aquellos experimentos, al no ser controlados por una máquina, la temperatura a la que se sometía el órgano cambiaba bruscamente de un valor a otro, sin recorrer la recta de temperaturas que puede obtenerse de interpolar ambos valores. El cambio de temperaturas era abrupto ya que ambas temperaturas pueden estar escalonadas en decenas de grados centígrados. Con el software del prototipo de máquina de Langendorff desarrollado, ahora la temperatura podría variar incluso de centésima en centésima.

En los experimentos de Gutierrez-Carretero, se procedió a la preservación del órgano inyectando en el corazón un anticongelante diluido en agua, concretamente polietilenglicol (PEG) al 5%. “La adición de PEG al fluido de perfusión protege al corazón frente al daño tisular por criopreservación” fue una de las conclusiones de su tesis y se convierte ahora en un valioso punto de partida para la máquina de perfusión que se ha desarrollado en el presente proyecto.

3.2 FUNDAMENTOS FISIOLÓGICOS DEL PROYECTO.

La ingeniería que se desarrolla para la creación de una máquina de Langendorff capaz de conservar un corazón por frío criogénico, ha de ser fiel seguidora de los principios fisiológicos que rigen el funcionamiento del corazón, sus condiciones necesarias para vivir, el efecto del frío sobre un órgano, las consecuencias de la inyección de sustancias externas sobre los tejidos y los estudios sobre la reversibilidad de la técnica preservadora. Sólo partiendo de estos sólidos cimientos, se puede diseñar un prototipo de máquina, que parta de las especificaciones concretas en las que se condensan todos esos principios fisiológicos.

3.2.1 BASES FISIOLÓGICAS DE LOS TRANSPLANTES DE CORAZÓN.

Desde que en 1967 se llevara a cabo el primer trasplante de corazón, en su aplicación han surgido dos principales problemas, los provenientes del rechazo del corazón por el cuerpo del receptor y los derivados de la conservación del tejido miocárdico desde el momento de la extracción hasta el de la implantación en persona.

3.2.1.1 Problema del rechazo de tejidos

Los principales problemas que se presentan en el trasplante de corazón no proceden de la técnica quirúrgica, sino del rechazo del órgano donado por el sistema inmunológico del receptor. Esto sucede porque todos los tejidos corporales contienen un conjunto de determinantes antigénicos propios de la persona como son el sistema HLA y el grupo sanguíneo. El sistema inmunológico del receptor considera extraños algunos de estos determinantes antigénicos del órgano donado, y en consecuencia produce una

respuesta contra ellos. El éxito de las técnicas de trasplante depende en gran medida del desarrollo de procedimientos capaces de suprimir de manera transitoria esta respuesta inmune hasta que el órgano trasplantado se establezca en el nuevo huésped. Los fármacos inmunosupresores incluyen los corticoesteroides y sobre todo la ciclosporina. El éxito de los trasplantes también se consigue gracias a los sistemas nacionales e internacionales de selección de parejas donante-receptor, que sean parcialmente histocompatibles. En ocasiones además se emplea la radiación.

Sin embargo, al suprimir el sistema inmunológico del receptor, el órgano trasplantado es susceptible a las infecciones virales. Éstas son la causa del fracaso de muchos trasplantes, y a veces de la muerte del receptor. Las posibilidades de rechazo son mucho menores cuando el órgano trasplantado procede de un familiar en primer grado, debido a que los determinantes antigénicos son mucho más compatibles, y en el mejor de los casos (gemelos idénticos), exactamente iguales. El sistema de antígenos que determina la posibilidad de rechazo se denomina sistema HLA, y la búsqueda de compatibilidad donante-receptor se estudia a través de este sistema.

En principio el mayor problema en los trasplantes fue esta tendencia natural del organismo a rechazar los tejidos ajenos, el cual fue solucionado a principios de la década de 1980 con el empleo de fármacos inmunosupresores, en particular la ciclosporina. Dicha sustancia se da de forma natural en ciertos hongos noruegos, *Tolypocladium inflatum*, y sus propiedades médicas fueron observadas por primera vez en 1972 por un bioquímico suizo. La ciclosporina bloquea específicamente la actividad de ciertas células del sistema inmune denominadas linfocitos T, las cuales, en combinación con otras células de la sangre, podrían atacar los tejidos de los órganos trasplantados. Esto hizo posible que el número de pacientes con un trasplante de corazón que sobrevivía más de un año fuera incrementándose, aunque la administración de la ciclosporina se debe efectuar bajo estrecha vigilancia porque existe algún riesgo de lesión renal grave. En 1996 se optó por la aplicación de un nuevo fármaco llamado tacrólimus por sus demostradas ventajas frente al uso común de la ciclosporina. En la década de 1990, se consiguió que la tasa de supervivencia de pacientes trasplantados aumentara de cinco a diez años después del trasplante. En el 2001 se empezó a comercializar un nuevo inmunopresor llamado sirolimus que es preferible a los dos anteriores por los resultados observados.

3.2.1.2 Problema de la conservación de los órganos.

Esta es la cuestión en la que realmente la Ingeniería puede colaborar con la Medicina, con continuos estudios físico-químicos de los tejidos e implementaciones reales de las soluciones que se extraen del resultado de los experimentos.

En la actualidad no existen bancos de órganos porque las vitaminas se oxidan, las proteínas se desnaturalizan... al intentar conservar los órganos. Sin embargo estas reacciones químicas se producen mucho más lentamente si trabajamos en frío, por lo que todos esos procesos de oxidación, desnaturalización, etc... se ven retardados (Arrhenius), pero el problema de enfriar es la formación de cristales, que además crecen porque la Termodinámica favorece este crecimiento para alcanzar una configuración energética más estable. Este crecimiento de cristales resulta muy dañino para los órganos.

Para la preservación del órgano en frío usaremos la técnica de **enfriamiento criogénico**, para alargar los tiempos de conservación admisibles que consigue la técnica de **hipotermia**. El corazón tiene una conductividad térmica finita, por lo que el frío necesita su tiempo para penetrar todo el órgano y que no sólo esté enfriado en su parte exterior. Una vez enfriado hasta altas temperaturas, se observan daños celulares producidos por:

- ✓ La formación de hielo, que provoca daños intracelulares y extracelulares.
- ✓ El frío, que también provoca un daño de enfriamiento en los tejidos, disminuye el agua, aumentan los solutos y se incrementa la toxicidad de la célula.

Como solución, usaremos **agentes crioprotectores** que inyectados en el órgano tienen un efecto anticongelante, porque consiguen un descenso crioscópico, evitando la formación de los cristales de hielo tan dañinos para las células. Elegimos inyectar disoluciones de estos agentes crioprotectores durante el tiempo de perfusión del corazón porque ofrecen estas propiedades:

- ✓ Bajan el punto de enfriamiento.
- ✓ Disminuyen la formación de cristales de hielo.
- ✓ Decrementan la probabilidad de lesiones celulares.

Entre los agentes crioprotectores, encontramos los que son penetrantes en la célula porque consiguen atravesar la membrana celular y los no penetrantes, entre estos últimos se encuentran la glucosa o el polietilenglicol (PEG). El anticongelante es útil en cuanto evita la formación de cristales de hielo, pero hay que tener en cuenta que su uso como agente crioprotector resulta tóxico, aunque su toxicidad para el tejido miocárdico disminuye al descender la temperatura. Utilizando concentraciones bajas para no intoxicar la célula, optaremos por el segundo tipo de sustancia anticongelante, por las siguientes razones:

- ✓ Alto Peso Molecular.
- ✓ Velocidad de enfriamiento rápida.

El enfriamiento criogénico puede hacerse lenta o rápidamente aunque optamos por una velocidad moderada porque las velocidades extremas de enfriamiento presentan inconvenientes y acaban igualmente originando lisis celular. Por ejemplo, 4.5 °C/min sería del orden de magnitud de las velocidades intermedias. La velocidad de enfriamiento puede producir la formación de cristales de hielo o la deshidratación celular, resultando ambos efectos igualmente dañinos para los tejidos que queramos preservar.

- ✓ Enfriamiento rápido:
 - Aunque teóricamente a altas velocidades de enfriamiento las moléculas no tienen tiempo a reorientarse para formar cristales de hielo, en la realidad se forman **pequeños cristales**.

- ✓ Enfriamiento lento:
 - Aumenta el tiempo de cambio de estado, se incrementa la osmolaridad celular y se produce **deshidratación celular**. La concentración de sales en la célula es muy alta por lo que se encuentra sobreenfriada.

3.2.2 BASES DE LA CRIOBIOLOGÍA.

La Criobiología estudia los sistemas vivos a cualquier temperatura debajo del rango estándar fisiológico. Esta Ciencia resulta interesante si pensamos que la Naturaleza ha tardado millones de años para que los organismos se adapten a la dureza de las bajas temperaturas, y finalmente ha conseguido reconciliar los principios de la física y de la biología. A continuación veremos algunos de los aspectos de los que se encarga la Criobiología y que tomaremos como base para el desarrollo del proyecto.

3.2.2.1 Susceptibilidad y Resistencia en la Naturaleza.

- ✓ Reino vegetal.

Se han observado ramas de árboles que pueden sobrevivir a la inmersión en nitrógeno líquido tras un adecuado acondicionamiento inicial, gracias a que fabrican **proteínas y azúcares** que permiten al citoplasma convertirse en un cristal a unas temperaturas sobre 30 y 40 bajo cero; una vez que las células de las plantas se vitrifican, son inmunes a la mayoría de las excusiones de las bajas temperaturas. Incluso algunos líquenes consiguen vitrificarse sin esta previa cristalización.

Ciertas plantas tienen control del hielo que se forma al someterse a bajas temperaturas gracias a la elaboración de una barrera física entre sus áreas sensibles (meristemos). El agua abandona los meristemos y se deposita congelándose en el área tolerante al hielo, sin que pueda crecer el hielo a través de la barrera para invadir y matar los meristemos, de modo que sobreviven la deshidratación y por tanto el invierno.

Estos estudios nos indican que en nuestro proyecto uno de los grandes objetivos deberá ser evitar la formación de hielo en el corazón durante el proceso de enfriamiento, porque dañaría los tejidos irreparablemente.

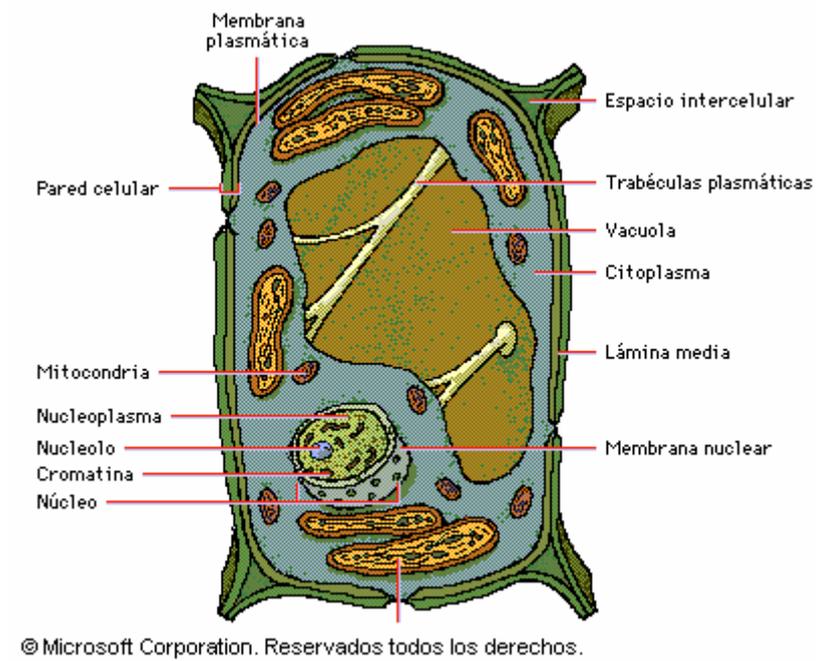


Fig.3 Célula vegetal.



Fig. 4 Citoplasma.

✓ Reino animal.

Encontramos que una de las especies de rana, ciertas tortugas, serpientes y salamandras pueden exponer todos sus órganos internos a severa congelación a relativas altas temperaturas (sobre -6°C) durante semanas con una recuperación espontánea tras el deshielo. Esto se consigue porque estos animales elaboran **agentes crioprotectores** naturales, como la **glucosa y el glicerol**, y además tienen la habilidad de poder controlar la localización del hielo, depositando la mayoría de éste en las zonas externas a sus órganos, en lugar de en su interior.

También algunos insectos elaboran **proteínas** con efecto **anticongelante** para prevenir la formación de hielo incluso cuando están por debajo de sus puntos de congelación y de hecho ya contienen hielo. Los peces polares son otro ejemplo de animales que elaboran proteínas anticongelantes, que les permiten vivir sin que se forme hielo y aunque se encuentren hasta 1°C por debajo de su punto de congelación.

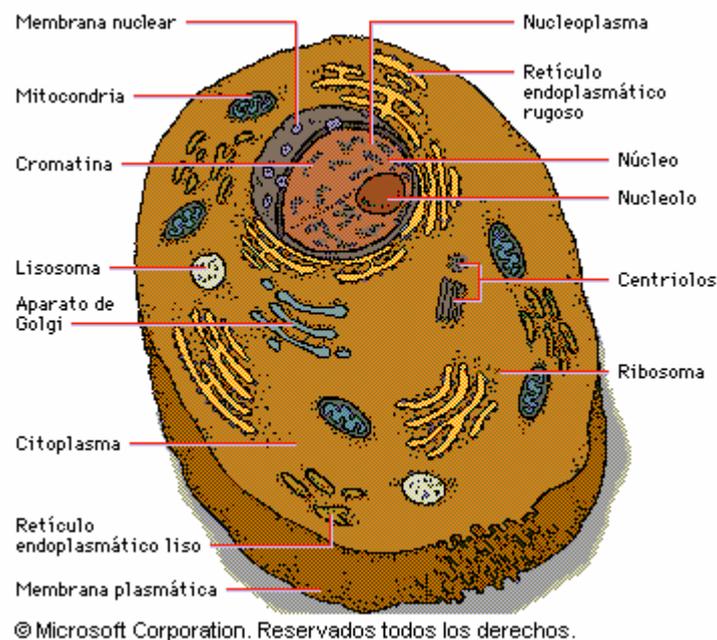


Fig.5 Célula animal.

Estos estudios nos orientan sobre la efectividad del uso de un agente crioprotector en el proceso de enfriamiento del corazón durante el proceso de almacenamiento, y así hemos optado por el uso de un anticongelante en este proyecto.

3.2.2.2 Proceso Congelación-Secado.

Este proceso de Congelación-Secado enfría las células tan rápidamente que el hielo o no llega a formarse o se forman cristales tan pequeños que no llegan a dañar a las células. Después se aplica el vacío para destilar hacia fuera el agua a esas bajas temperaturas. Las células, tras haber sido almacenadas durante un corto tiempo, son rehidratadas y recuperan sus funciones vitales, aunque sin embargo no son capaces de dividirse.

Esta técnica para almacenar células es más eficaz que la inmersión en nitrógeno líquido.

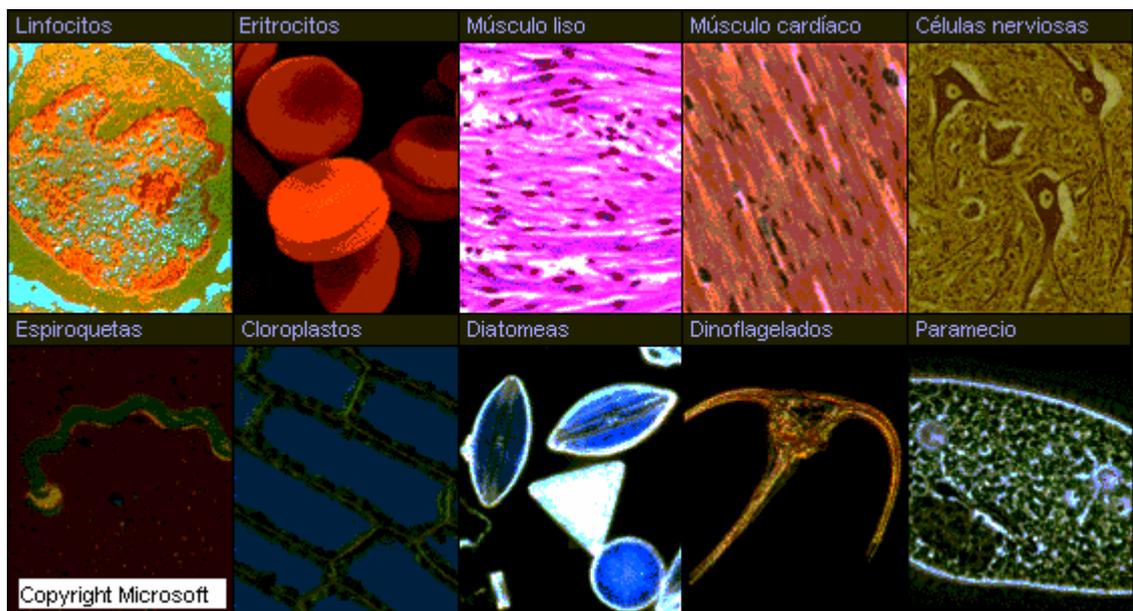


Fig.6 Distintos tipos de células.

3.2.2.3 Sobreenfriamiento.

El sobreenfriamiento es el procedimiento que permite a muchos peces, insectos, algunos mamíferos como los murciélagos y la ardilla autóctona de Alaska sobrevivir el invierno. Enfrían su cuerpo entero sin congelarse hasta unos -3°C aunque sus puntos nominales de congelación de la sangre están por debajo de -0.6°C .

Esta técnica ha sido usada por una compañía británica, Pafra, Ltd., para preservar enzimas y células enteras, enfriándolas en diminutas gotitas de agua, hasta temperaturas varios grados por debajo de su punto de congelación. Debido a que la probabilidad de congelación espontánea es muy baja en volúmenes tan pequeños, y a que las gotitas no se tocan entre sí al estar dispersas en una fase no acuosa como una emulsión, el sobreenfriamiento estable de gran magnitud (por ejemplo, entre -10 y -20°C) puede conseguirse con éxito durante meses. De este modo, esta técnica tiene las

ventajas de las bajas temperaturas y evita el daño de la formación del hielo. Produciría cierta desnaturalización en las enzimas, pero es un daño reversible que se soluciona espontáneamente cuando las proteínas son calentadas de nuevo.

El sobreenfriamiento aún no ha conseguido tiempos de almacenamiento mayores que las técnicas de conservación bajo cero en la preservación de órganos de mamíferos, y parte de las razones es esta desnaturalización de las proteínas.

3.2.2.4 Criopreservación.

Se sabe que los tejidos organizados que no requieren soporte vascular para sus funciones pueden ser congelados y descongelados con éxito siguiendo la técnica adecuada, y esto ha hecho posible el trasplante de válvulas de corazones humanos previamente congelados y descongelados.

Por otro lado, hay algunas células de mamíferos como los granulocitos, que son muy sensibles y difíciles de congelar adecuadamente. También nos encontramos la dificultad de que las células tras ser descongeladas, han de ser transplantadas sin eliminar el agente crioprotector y debe resultar por tanto no tóxico en el cuerpo receptor. También hay ciertos tejidos vegetales o pequeños organismos marinos que tienen una adversa reacción a los crioprotectores.

3.2.2.4.1 Reversibilidad funcional.

Sin duda, el mayor reto es la criopreservación de órganos de mamíferos. Se ha experimentado congelando intestinos de perro en nitrógeno líquido, consiguiendo su posterior recuperación tras la descongelación. Aunque el éxito ha dependido de la regeneración de los tejidos y de cierta tolerancia a daños vasculares, ya que tras la descongelación aparecían múltiples lesiones.



Fig.7 Nitrógeno líquido.

También se ha experimentado con hígados, que han recuperado parte de su funcionalidad tras haber sido congelados a -60°C , uretras que han superado profundas

congelaciones y trasplante posterior y los pulmones han sobrevivido a las mayores durezas de altas temperaturas bajo cero. Incluso corazones y riñones han superado una parcial congelación, pero no suficiente para la preservación a largo plazo.

Los corazones de ratas o conejos con los que se ha experimentado normalmente, tienen cierto retardo al reanimarse, hasta que aparece actividad eléctrica y mecánica tras la criopreservación y se observa el siguiente grado de reversibilidad funcional:

- **Función sistólica:** Conseguimos buena preservación estructural y funcional de fibras miocárdicas, membranas celulares y aparato energético. Las miofibrillas sufren un daño reversible.
- **Función diastólica:** Se pierde la distensibilidad, por lo que las fibras del corazón se contraen menos porque aumenta la rigidez en el ventrículo izquierdo.
- **Metabolismo:** Aumenta el consumo de oxígeno por un incremento del rendimiento mecánico y la deuda de O₂ tras la criopreservación. Aumenta el volumen del órgano y disminuye el pH. Las mitocondrias redondeadas que intervienen en la síntesis de proteínas sufren un daño irreversible tras el enfriamiento criogénico.

3.2.2.4.2 Vitricación versus Congelación.

La conclusión que obtenemos de nuevo es que la formación de hielo debe ser evitada, por el gran daño físico a los tejidos conectivos no vivos encontrados en los órganos, que son justo los que destruyen los capilares y las relaciones intercelulares, volviendo el órgano inservible. Por tanto la vitricación es preferible a la congelación para solucionar la cuestión del almacenamiento de órganos. La vitricación eleva la viscosidad y el enfriamiento, resultando finalmente un líquido que tiene la misma falta de movimientos y mecanismos metabólicos internos que nos interesan y buscaba la congelación con un sólido cristalino. Con esta suspensión del metabolismo conseguimos que el órgano no tenga capacidad de cambiar en el tiempo y por tanto muera. En definitiva, con la vitricación evitamos los reajustes moleculares de la cristalización que resultaban tan dañinos.

3.3 FUNDAMENTOS TERMODINÁMICOS DEL PROYECTO.

Además del fundamento fisiológico de los trasplantes de corazón y los fundamentos técnicos a la hora de diseñar un sistema que integra software y hardware, dada la naturaleza de la técnica criopreservadora que utilizamos, el enfriamiento criogénico del órgano, nos basamos en un importante estudio termodinámico que nos oriente sobre la técnica, las consecuencias, las condiciones y propiedades que se presentan en el proceso de enfriamiento del órgano.

3.3.1 **BASES TERMODINÁMICAS DEL ENFRIAMIENTO CELULAR.**

La idea básica que obtenemos de la Termodinámica es que el modo de evitar la formación de hielo dentro de una célula, al enfriarla, es hacer que se forme hielo fuera de ella.

✓ **Descenso Crioscópico.**

Al enfriar, aumenta la concentración de sales fuera de la célula, mientras dentro la concentración sigue inalterable. Este desequilibrio se solucionaría expulsando agua de la célula hacia fuera, o bien que entrasen sales de fuera a adentro de la célula, lo cual resulta imposible porque la membrana es semipermeable y las sales no pueden pasar, tan solo el agua puede cruzar la membrana en el otro sentido. Es una situación de desorden, porque lo normal es que las concentraciones, dentro y fuera de la membrana semipermeable, fueran las mismas y no hubiese tal diferencia de presiones osmóticas. Al salir el agua de la célula, aumenta la concentración de sales dentro y entonces es más difícil la formación de hielo en el interior de la célula ya que cuantas más sales tenga una disolución, más bajo es su punto de congelación. A medida que voy enfriando, va saliendo progresivamente agua de la célula y va incrementándose la concentración en el interior de la membrana semipermeable, por lo que no se congela debido a la gran cantidad de sales y no necesitamos usar anticongelante para conseguir este descenso crioscópico.

✓ **Enfriamiento controlado.**

Para conseguir este descenso crioscópico sin formación de cristales, debe ser un enfriamiento controlado, que evite el enfriamiento lento, para que el interior celular no esté sometido a una elevada concentración de sales durante un tiempo prolongado que mataría a la célula.

Si el hielo se forma a -1°C , por ejemplo, de una forma controlada, los cristales de hielo se forman lentamente y se consigue el deseado descenso crioscópico sin daños celulares, tal y como se ha descrito. Si no se enfría de forma controlada, el hielo se forma rápidamente y a temperaturas muchos más frías, incluso a -40°C , porque la formación de hielo es un proceso estocástico y se producirían cristales que se forman muy rápido, llenos de aristas, como lanzas que dañarían todos los tejidos del órgano que intentásemos criopreservar.

3.4 FUNDAMENTOS TÉCNICOS DEL PROYECTO.

3.4.1 INTRODUCCIÓN A LOS SISTEMAS DE CONTROL.

La Teoría del Control Automático define **sistema** como un conjunto de elementos que tienen cualquier tipo de interrelación que hace que se vean como un todo desde fuera y **control automático** como la disciplina cuyo objetivo es que los sistemas funcionen solos, sin la presencia de un operario.

Un sistema genérico se podría modelar de la siguiente manera:

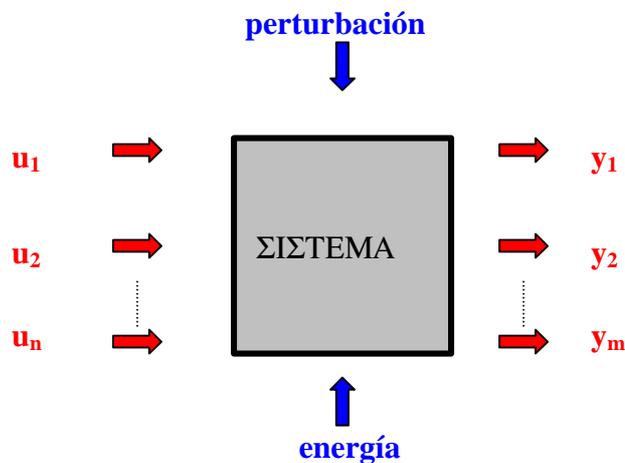


Fig.8 Modelo de un sistema genérico.

Las señales denotadas como u_i son las señales de entrada, de control o variables manipuladas, cambian de valor a lo largo del tiempo y su variación influye en el sistema. Las señales denotadas como y_i son las señales de salida, observando sus valores se comprueba si el sistema evoluciona como se deseaba al plantear su diseño. La función de transferencia de un sistema es una función que liga la relación entre las señales de entrada y las de salida. Para que los sistemas evolucionen es necesario aportar energía y en el diseño de cualquier sistema será una de las decisiones iniciales el hecho de calcular qué cantidad de energía debe suministrarle. Finalmente, la otra variable de entrada la constituyen las perturbaciones, que a diferencia de las otras entradas, no se pueden controlar y no son conocidas con exactitud a priori. El control automático decide en cada instante de tiempo la secuencia de evolución de control que hay que aplicar al sistema para que éste siga la evolución deseada. Necesitamos modelos matemáticos para formalizar las relaciones entre las salidas y entradas de un sistema.

✓ **Clasificación de los sistemas.**

Cuando en un sistema $n=m=1$, es decir hay una única señal de entrada y una única señal de salida, el sistema es monovariable. En cualquier otro caso, nos encontramos frente a un sistema multivariable.

Según trabajemos con el tiempo continuo o discretizado, también clasificamos los sistemas en continuos o discretos.

Si las salidas en un instante dependen tan solo de las entradas de ese preciso momento, el sistema es estático. Si además las salidas dependen del estado en el que está el sistema en ese instante, es decir, depende de la evolución anterior del sistema, el sistema es dinámico. Un sistema dinámico continuo define su función de transferencia mediante una ecuación diferencial para tener en cuenta esos estados anteriores del sistema. Un sistema dinámico discreto emplearía ecuaciones en diferencias para considerar la evolución del sistema en el cálculo de sus salidas para un instante determinado. Si los coeficientes de las ecuaciones diferenciales o diferenciales que describen la respuesta de un sistema dinámico son constantes, el sistema es invariable en el tiempo o estacionario. También llamamos sistemas causales aquellos en los que la salida en un instante depende de los instantes anteriores, y en la realidad todos los sistemas son causales.

✓ **Sensibilidad.**

Un sistema es sensible a la variación de un parámetro si éste influye de modo importante en el comportamiento del sistema. Un sistema realimentado es un sistema de control en bucle cerrado, que toma la salida del sistema, le aplica cierta acción de control, la compara con la referencia que deseamos tener como salida y vuelve a servir de entrada al sistema. Un sistema en bucle abierto no toma la salida del sistema para hacer correcciones sobre su variabilidad respecto al valor esperado. Por ello refuerza las calibraciones del sistema para conseguir mayor exactitud, para el rango de valores de trabajo estudia la naturaleza y valores medios de las perturbaciones que afectan al sistema y modela las variaciones de la salida en un factor de corrección que ya incluye dentro del modelo matemático que describe el sistema.

Un sistema realimentado es menos sensible, aunque existen sistemas que a pesar de estar realimentados siguen siendo sensibles e incluso si la realimentación es brusca puede provocar errores: retraso en el tiempo, sobreoscilaciones o inestabilidad del sistema. En cualquier caso, el primer paso para construir un sistema en bucle cerrado es diseñar y probar inicialmente un sistema en bucle abierto, por lo que es necesaria la implementación de la máquina de Langendorff en bucle abierto como primer paso firme hacia un control robusto de la criopreservación automática de órganos, lo cual no excluye la posibilidad de que pueda ser mejorada tomando referencias de la respuesta de la máquina, haciendo que realimenten el sistema mediante las entradas digitales que posee el PC que controla la máquina de Langendorff y pudiéndose realizar el controlador vía software, aprovechando el fuerte potencial de la aplicación, sin la necesidad de añadir circuitería externa, que añade nuevos ruidos y no idealidades.

3.4.2 SISTEMA DE CONTROL DE LA MÁQUINA DE LANGENDORFF.

Una vez expuesto el concepto teórico de sistema de control, identificamos la idea de un sistema genérico con la máquina de Langendorff implementada, para dimensionar sus entradas, sus salidas, sus requerimientos de energía, sus posibles perturbaciones y asentar el funcionamiento cualitativo que debe tener el sistema para obtener la respuesta deseada a su salida. Hacemos distinción entre los dos prototipos de máquina de Langendorff, con dos y cuatro bombas, porque hay una pequeña variación en sus entradas, salidas y diseño del sistema.

3.4.2.1 Control Independiente de Temperatura y Concentración.

Desde el punto de vista técnico, la máquina de Langendorff tiene como objetivo conseguir la inyección de una disolución de unas determinadas características en un corazón expuesto a tal perfusión. En el caso de la máquina implementada con cuatro bombas, el hecho de disponer de esos cuatro componentes nos permite tener un control independiente de la temperatura y la concentración de esa disolución crioprotectora.

Esta disolución es el resultado de mezclar cuatro cantidades de fluidos. Dos de estas cantidades son agua, bombeadas por sendas bombas peristálticas de dos baños que contienen agua a distintas temperaturas y las otras dos cantidades a mezclar son anticongelante, que de igual manera han sido proporcionadas por otras dos bombas independientes, de dos baños separados que se encuentran a diferente temperatura. Resumidamente, disponemos de cuatro baños, y la disolución está formada por cuatro cantidades, que han sido extraídas de un baño independiente, por una bomba peristáltica independiente (Ver figura 9.)

En cada instante deseamos que la disolución total tenga una temperatura concreta y una concentración determinada. Ambos valores son totalmente independientes y no están ligados entre sí, de manera que al elegir una temperatura para la mezcla total, no se fuerza ningún valor de la concentración, lo cual sí ocurrirá para el prototipo construido con dos bombas. Este control independiente de la concentración y la temperatura es posible debido a que se disponen de dos baños a distinta temperatura (una temperatura alta y otra temperatura muy baja, cercana o por debajo de los 0°C) de una misma sustancia. Disponemos de dos baños de agua a temperaturas T_2 y T_3 y dos baños de anticongelante a temperaturas T_1 y T_4 . Para observar la salida disponemos de un termómetro directamente colocado en la cánula donde se unen los cuatro flujos para formar la disolución total. No medimos directamente la concentración, pero al estar los cuatro flujos interrelacionados por cuatro ecuaciones matemáticas que no dejan ningún grado de libertad, si cumplen la condición de temperatura es porque cada una de las cuatro cantidades mezcladas obedecen las ecuaciones que rigen el sistema y por tanto la concentración también será correcta.

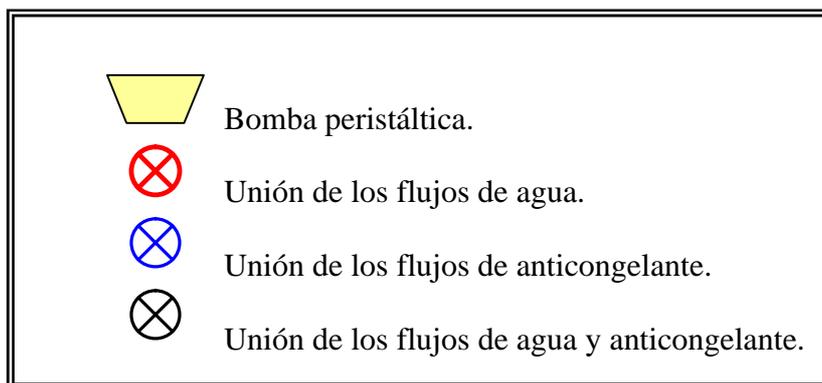
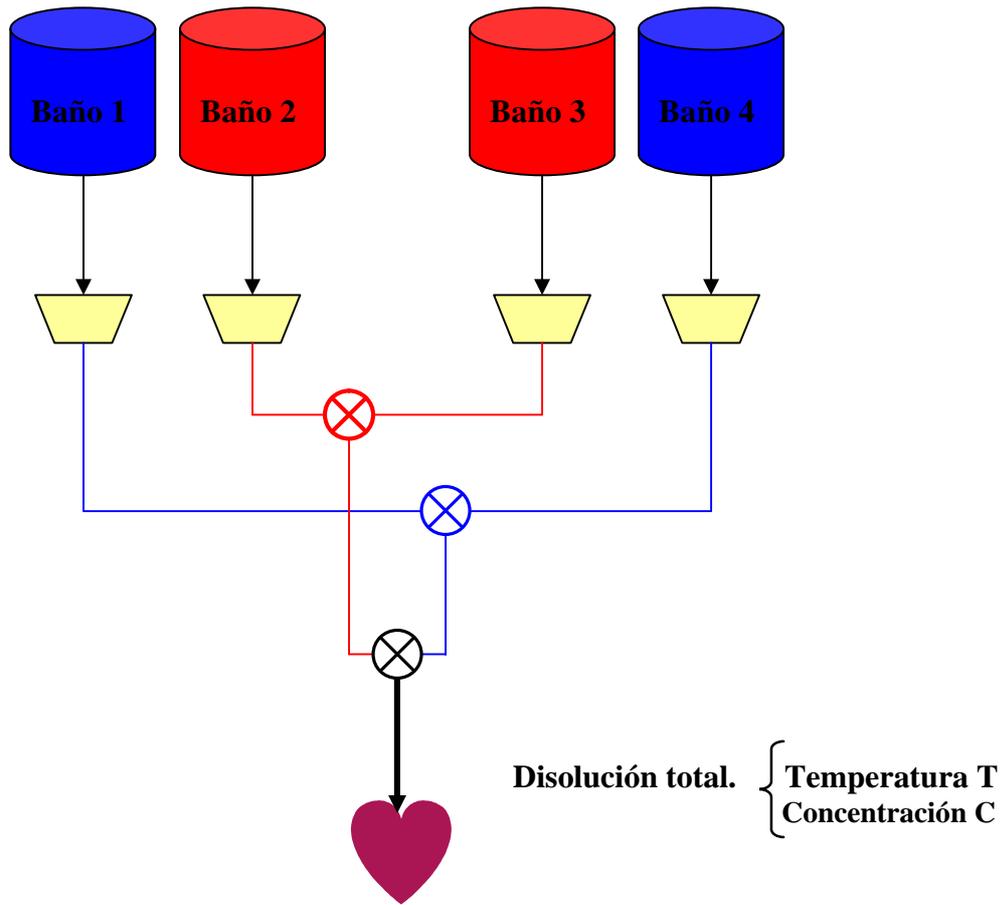


Fig.9 Esquema de bombas de la máquina de Langendorff con control independiente de temperatura y concentración.

Para un instante determinado, en el que la disolución total debe tener una temperatura T y una concentración C , se deben cumplir unas ecuaciones que se detallarán en la descripción global de la solución pero que se presentan ahora cualitativamente:

- ✓ La temperatura del conjunto formado por las dos cantidades de agua mezcladas debe ser T .
- ✓ La temperatura del conjunto formado por las dos cantidades de anticongelante mezcladas debe ser T .
- ✓ La concentración total tras mezclar las cuatro cantidades debe ser C .
- ✓ La suma de las cuatro cantidades no debe superar un flujo máximo admisible para no sobrecargar los tejidos del corazón con la presión del fluido entrante.

Estas cuatro bombas tienen una entrada de tensión de control, y proporcionan un caudal relacionado con la tensión que reciben, según cierta función de transferencia característica de la bomba. Esta entrada de tensión de cada bomba está cableada directamente a una de las cuatro salidas analógicas de una tarjeta de adquisición de datos, instalada en el ordenador. Controlando con software la tarjeta de adquisición de datos, consecuentemente se controlan los flujos proporcionados por las bombas peristálticas. Controlando dichos flujos, se controla la temperatura y la concentración de la disolución total.

En la aplicación de software diseñada para la máquina de Langendorff de 4 bombas se ofrecen unas entradas de datos al usuario. El programa presenta por pantalla tres tablas para consignar las temperaturas, las concentraciones y los instantes de tiempo significativos. En esta última tabla, el usuario introduce los hitos de tiempos importantes en el proceso criogénico, que son aquellos instantes en los que cambia la velocidad de enfriamiento y la concentración de la disolución inyectada. El protocolo de enfriamiento empleado no va a ser lineal, si no que es el resultado de interpolar cierto número de valores de temperaturas espaciados en el tiempo, por lo que las rectas resultado de interpolar entre dos valores tendrán normalmente distinta pendiente, cuyo significado físico es una variación en la velocidad de enfriamiento. El perfil continuo total de temperaturas es un conjunto de tramos rectos unidos entre sí. El usuario especifica esos instantes de tiempo en los que hay un cambio de pendiente. En otra tabla introduce la temperatura asociada a cada uno de esos instantes, para que el procesamiento de la aplicación interpole entre esos valores y reconstruya un perfil continuo de temperaturas. Finalmente en la tercera tabla, el usuario consigna la concentración de la disolución asociada a cada instante de tiempo, que se mantendrá constante en el intervalo que transcurre hasta la llegada del instante siguiente de tiempo y su consiguiente cambio de velocidad de enfriamiento. Durante un tramo de igual pendiente, la concentración no varía su valor, mientras que la temperatura irá variando según la recta que se ha formado entre los valores extremos de temperatura consignados.

Por tanto, considerando la aplicación software desarrollada como un sistema completo, la entrada del sistema es un perfil de temperaturas y concentraciones respecto al tiempo. El perfil se construye en el programa, por lo que en realidad esta entrada se divide en tres entradas para el usuario, que son las tres tablas de temperaturas,

concentraciones y tiempos descritas. La salida del sistema estaría formada por cuatro valores de tensión, cuyos voltajes se registran en las salidas analógicas de la tarjeta de adquisición de datos controlada por la aplicación. Conocidas las entradas y las salidas, podemos describir el comportamiento del sistema. En tiempo real debe tomar la concentración y la temperatura asociadas a cada instante. A partir de esos dos valores, se resuelve un sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas, cuyas soluciones son los flujos que debe proporcionar cada bomba peristáltica en ese instante. A partir del flujo de cada bomba, se aplica la función de transferencia del modelo de bombas instaladas en el sistema y se calcula la tensión que debe alimentarla para que suministre tal cantidad de fluido. Existe una salida analógica asociada a cada bomba, por lo que calculado el flujo de cada bomba y posteriormente habiéndolo traducido a un nivel de tensión equivalente, se fuerza a que cada una de las cuatro salidas analógicas tome uno de esos valores de tensión y alimente a la bomba correspondiente.

Si incluimos las bombas junto al software para formar el sistema completo, las entradas siguen siendo las tres tablas de tiempos, temperaturas y concentraciones, pero ahora la salida del sistema no está formada por cuatro valores de tensión, si no que la nueva salida sería la temperatura registrada por el termómetro que utilizamos como sensor para comprobar que la mezcla de los cuatro fluidos bombeados efectivamente cumple las condiciones requeridas y sigue la respuesta esperada con las entradas recibidas.

En este sistema la energía viene proporcionada por la alimentación del ordenador en el que reside la aplicación software que controla la máquina de Langendorff. La máquina tiene un sencillo requerimiento de energía, que se satisface con la red eléctrica doméstica ya que como todo ordenador personal, está conectado a la red de tensión de 220V. El ordenador con esta energía es capaz de hacer funcionar la aplicación y alimentar a la tarjeta de adquisición de datos, que no requiere ningún adicional acondicionamiento de señal y la potencia que recibe del ordenador le resulta suficiente para poder ofrecer su rango de tensión en las salidas analógicas. Las bombas también están conectadas a la red eléctrica y utilizan la tensión suministrada por la tarjeta de adquisición de datos como tensión de control que modula su comportamiento.

Finalmente la perturbación del sistema vendrá dada por la inercia de las bombas, aunque al trabajar en un rango de tensión reducido de 0 a 10 voltios y con caudales máximos de 60ml no afectará excesivamente ya que las variaciones del caudal que se exigen a las bombas son pequeñas y todos los cambios son graduales, entre valores muy cercanos, por los que la inercia podría resultar despreciable. También el propio rozamiento que se produce en la bomba cuando el rodillo de la bomba peristáltica presiona unos conductos de goma para hacer fluir el líquido que bombea, introducirá variaciones térmicas.

También serán perturbaciones al sistema la temperatura ambiente de la habitación donde se instala la máquina de Langendorff y las no idealidades de los materiales aislantes empleados para construir los conductos por los que fluyen los fluidos bombeados. Los conductos que canalizan el agua y el anticongelante son de corta longitud, la longitud precisa para que se puedan mezclar las cuatro cantidades e inyectar en el corazón, por lo que será una perturbación controlada. Mediante acondicionamiento exterior se elige una temperatura cómoda y fresca para la habitación, de modo que la estancia siempre se encuentre a la misma temperatura en los

experimentos y ambas perturbaciones sean por tanto modelables con cierta fiabilidad en un factor de corrección aproximado, que sea válido para el rango de temperaturas de trabajo.

3.4.2.2 Control exclusivo de temperatura.

El desarrollo del sistema de control de la máquina de Langendorff de dos bombas será similar al expuesto para la implementación con cuatro bombas y tendrá pequeñas variaciones en el diseño, ya que persigue el mismo objetivo técnico, la inyección de una disolución de unas determinadas características en un corazón expuesto a perfusión.

Esta disolución es el resultado de mezclar dos cantidades de fluidos de distinta temperatura y naturaleza. Una de estas cantidades es bombeada por una bomba peristáltica de un baño que contiene agua a cierta temperatura T_1 y la otra cantidad es proporcionada por otra bomba peristáltica independiente, de otro baño separado que contiene anticongelante a temperatura T_2 . (Ver figura 10).

En cada instante deseamos que la disolución total tenga una temperatura concreta, que se consigue mezclando cantidades de agua y anticongelante, hasta conseguir que se equilibren las diferencias de temperatura variando los flujos añadidos y se obtenga la temperatura deseada. La mezcla resultante alcanzará una determinada concentración ya que al sólo disponer de dos bombas, al elegir una temperatura para la mezcla total, se fuerza el valor de la concentración. Para observar la salida disponemos de un termómetro directamente colocado en la cánula donde se unen los dos flujos para formar la disolución total. Para un instante determinado, en el que la disolución total debe tener una temperatura T se deben cumplir dos ecuaciones que se detallaran en la descripción global de la solución pero que ahora se adelantan cualitativamente:

- ✓ La temperatura total tras mezclar las dos cantidades, agua y anticongelante, debe ser T .
- ✓ La suma de las dos cantidades no debe superar un flujo máximo admisible para no sobrecargar los tejidos del corazón con la presión del fluido entrante.

Estas dos bombas son idénticas a las usadas en la máquina de Langendorff con control independiente de temperatura y concentración. Cada bomba tiene una entrada de tensión de control, y proporciona un caudal dependiente de la tensión que recibe, según cierta función de transferencia característica de la bomba. Cada bomba tiene su entrada de tensión de control conectada directamente a una de las cuatro salidas analógicas de una tarjeta de adquisición de datos, instalada en el ordenador. En esta implementación, dos de las cuatro salidas analógicas quedan libres y podrían ser usadas para otros propósitos, admitiendo la escalabilidad del sistema. Controlando con software la tarjeta de adquisición de datos, consecuentemente se controlan los flujos proporcionados por las bombas peristálticas. Controlando dichos flujos, se controla la temperatura de la disolución total.

En la aplicación de software diseñada para la máquina de Langendorff de 2 bombas se ofrecen dos entradas de datos al usuario, el programa presenta por pantalla dos tablas para consignar las temperaturas y los instantes de tiempo significativos. En esta última tabla, el usuario introduce los hitos de tiempos importantes en el proceso criogénico, que son aquellos instantes en los que cambia la velocidad de enfriamiento. Al igual que en el diseño para cuatro bombas, optamos por un protocolo de enfriamiento no lineal, que es aquel que no utiliza una velocidad de enfriamiento constante en la criopreservación del órgano. El perfil continuo total de temperaturas es un conjunto de tramos rectos unidos entre sí. El usuario especifica esos instantes de tiempo en los que hay un cambio de pendiente. En otra tabla introduce la temperatura asociada a cada uno de esos instantes, para que el procesamiento de la aplicación interpole entre esos valores y reconstruya un perfil continuo de temperaturas.

Resumidamente, si consideramos la aplicación software como un sistema completo, la entrada del sistema es un perfil de temperaturas respecto al tiempo. El perfil se construye en el programa, por lo que en realidad esta entrada se divide en dos entradas para el usuario, que son las dos tablas de temperaturas y tiempos descritas. La salida del sistema estaría formada por dos valores de tensión, cuyos voltajes se registran en las salidas analógicas de la tarjeta de adquisición de datos controlada por la aplicación. Conocidas las entradas y las salidas, podemos describir el comportamiento del sistema. En tiempo real debe tomar la temperatura asociada a cada instante. A partir de esos dos valores, se resuelve un sistema de dos ecuaciones cuyas soluciones son los flujos que debe proporcionar cada bomba peristáltica en ese instante. A partir del flujo de cada bomba, se aplica la función de transferencia de la bomba peristáltica y se calcula la tensión que debe alimentarla como señal de control para que suministre tal cantidad de fluido. Existe una salida analógica asociada a cada bomba, por lo que calculado el flujo de cada bomba y posteriormente habiéndolo traducido a un nivel de tensión equivalente, se fuerza a que cada una de las dos salidas analógicas empleadas tome uno de esos valores de tensión y alimente a la bomba correspondiente.

Si incluimos las bombas junto al software para formar el sistema completo, las entradas siguen siendo las dos tablas de tiempos y temperaturas, pero ahora la salida del sistema no está formada por dos valores de tensión, si no que la nueva salida sería la temperatura registrada por el termómetro que utilizamos como sensor para comprobar que la mezcla de los dos fluidos bombeados efectivamente cumple las condiciones requeridas y sigue la respuesta esperada con las entradas recibidas.

Los requerimientos de suministro de energía y las posibles perturbaciones del sistema coinciden idénticamente con las condiciones que se daban en el sistema de cuatro bombas, por lo que resulta innecesaria una reiteración.

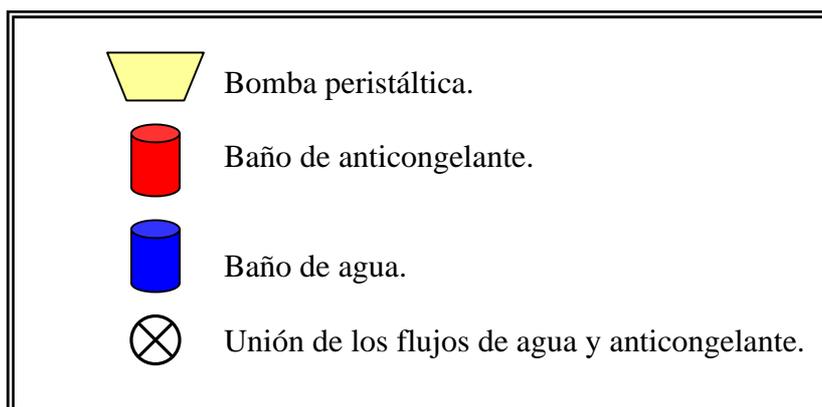
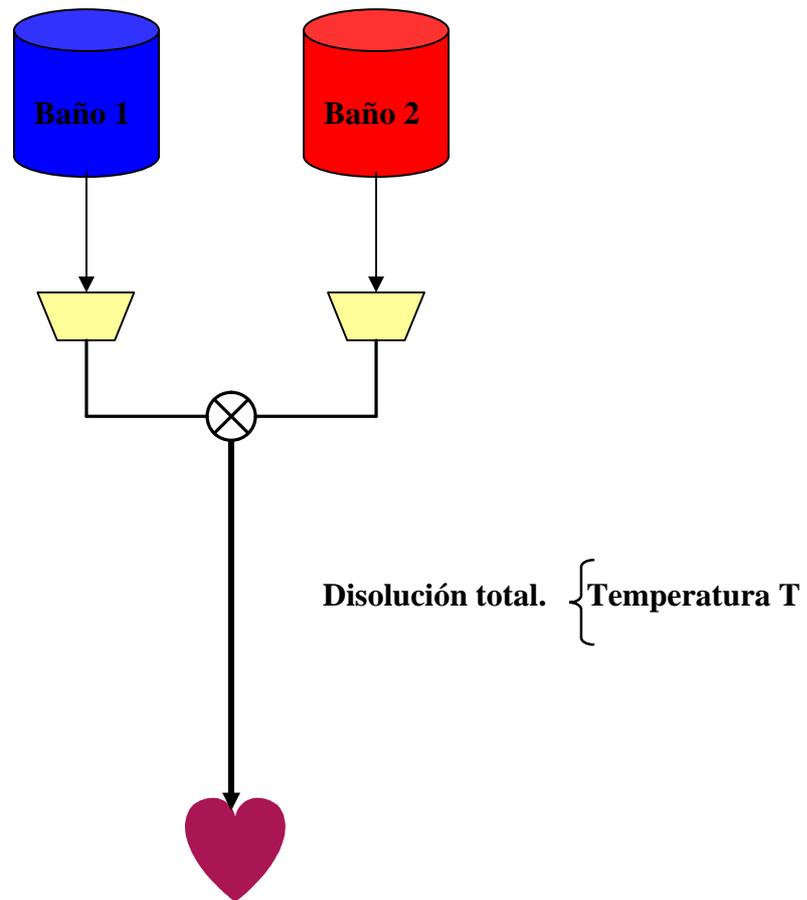


Fig.10 Esquema de bombas de la máquina de Langendorff con control exclusivo de temperatura.

3.4.3 BOMBAS PERISTÁLTICAS.

Estos sistemas son ideales para bombear con precisión fluidos (líquidos, gas y soluciones) a caudales bajos. Constan de una cabeza giratoria con doble rodillo: el rodillo que avanza obstruye un tubo que, al reabrirse, aspira el fluido que es atrapado por el rodillo siguiente y más tarde expulsado de la bomba. También se fabrican bombas en las que los cabezales están provistos de tres rodillos que producen un flujo continuo y sin retroceso. Esta técnica ofrece las siguiente ventajas:

- ✓ No hay contaminación del fluido o de la bomba, ya que el fluido está contenido en el tubo.
- ✓ Buena acción de bombeo con unos caudales precisos.
- ✓ La bomba es de auto-cebado y puede funcionar en seco.

Las bombas peristálticas son ideales para aplicaciones de laboratorio, procesamiento de alimentos, expedición de bebidas, tintas y soluciones fotográficas, farmacéuticas, de fermentación y muchas otras en las que el fluido sea compatible con el tubo que lo transporta.



Fig.11. Bomba peristáltica.

3.4.3.1 Cabeza giratoria.

La cabeza giratoria con doble o triple rodillo encaja en el eje de un motor de impulsión y está protegida por una tapa transparente. Las bombas peristálticas están provistas de cabezales cuyo diseño permite extraer fácilmente el tubo para su esterilización o reposición por otro de distinto tamaño.

3.4.3.2 Motor.

Los caudales son directamente proporcionales a la velocidad del rotor y por ello dependen de la tensión de activación del motor. Debido a la mayor velocidad del rotor y a la mayor carga del motor, las vidas útiles del tubo y del motor se verán reducidas, especialmente durante períodos de bombeo prolongados y continuos. Los tubos de silicona están disponibles con distintos diámetros así como existen motores de impulsión de distinta velocidad nominal, por lo que jugando con la velocidad nominal del motor de impulsión y el diámetro de tubos pueden obtenerse bombas de distintos valores de caudal máximo admisible, medido en ml/min.

3.4.3.3 Tubos.

Con cada bomba se suministran los tubos de distinto diámetro que pueden admitir, con las conexiones en sus extremos donde insertar los tubos de alimentación y descarga. Llevan normalmente un tubo flexible de silicona, que admite muchos fluidos y soluciones con una temperatura de hasta 100-250°C según los modelos de las distintas marcas comerciales. Los tubos pueden esterilizarse por vapor o por autoclave y pueden cortarse convenientemente a la longitud requerida y adaptarse con mucha facilidad a los montajes de la cabeza de bombeo. La estructura del rodillo accionado por muelles garantiza una vida útil máxima del tubo y la presión de los rodillos sobre el tubo está calculada para obtener la máxima eficacia y prolongar la vida del tubo.

Bajo demanda se pueden suministrar las bombas con tubos de otros materiales como:

- ✓ **FARMED:** Larga duración, grado FDA. Adecuado para altas presiones.
- ✓ **TYGON:** Gran resistencia a los productos químicos inorgánicos. No tóxico.
- ✓ **VITON:** Adecuado para ácidos y disolventes. Soporta 300 °C.
- ✓ **PVC:** Resistente a los productos químicos. Autoclavable. No tóxico.
- ✓ **FLUROSILICONA:** Resistente a los derivados del petróleo.

3.4.3.4 Clasificación.

Se dispone de dos familias de bombas peristálticas:

✓ **Bomba peristáltica de flujo fijo.**

Se fabrican con motores de distintas revoluciones según los modelos comerciales de bombas peristálticas. Estas bombas se caracterizan porque se pueden obtener varios caudales fijos según el tubo elegido.

✓ **Bomba peristáltica de flujo variable.**

En este caso, para una bomba concreta con un motor determinado, no se obtiene un caudal fijo según el tubo elegido, si no que para un mismo diámetro se pueden conseguir distintos caudales según una tensión de control, por lo que una misma bomba puede proporcionar una amplia gama de flujos. Esta tensión de control se recibe por una entrada adicional que tienen las bombas de flujo variable para tal propósito, pudiendo ser tanto analógica como digital. Existen bombas peristálticas más avanzadas, dotadas de mando para la inversión del flujo, un pulsador para obtener el máximo caudal sin modificar la regulación establecida y conector posterior para control remoto (pedal o interruptor de pie).

En la implementación de la máquina de Langendorff optamos por un modelo de flujo variable para tener un extenso rango de valores de flujos disponibles y así poder obtener cantidades muy precisas de cada uno de los baños, tales que la disolución total tenga las características de temperatura y concentración que deseamos.

3.4.4 TARJETAS DE ADQUISICIÓN DE DATOS.

En la máquina de Langendorff implementada, se dispone de una tarjeta de adquisición de datos instalada en el PC. Esta tarjeta está basada en un bus PCI y dispone de una serie de canales analógicos de salida. Estos canales son empleados para establecer y mantener unos valores de tensión, que sirvan de entrada de control a las bombas peristálticas, controlando así su flujo mediante tensión. Por tanto, a la hora de asentar los fundamentos técnicos del proyecto, es necesario aclarar el funcionamiento y utilidad de las tarjetas de adquisición de datos, así como aclarar el concepto de bus PCI.

3.4.4.1 Visión general de una tarjeta de adquisición de datos.

Existen tarjetas de adquisición de datos denominadas de bajo coste que disponen de salidas analógicas, entradas/salidas digitales y ocasionalmente entradas analógicas, ideales para aplicaciones que requieren capacidades de control y de múltiples salidas D/A. Estas tarjetas suelen admitir distintas configuraciones, tienen un número bajo de entradas y salidas aunque suficiente en múltiples aplicaciones, desde 4 hasta 64 canales suelen ser valores típicos de número de entradas y salidas tanto de naturaleza analógica como digital. Las salidas analógicas suelen tener una resolución de 12 o 16 bits, los puertos digitales suelen tener 8 o 12 líneas, y según el modelo pueden ir acompañados o no de reloj o contadores. Por tanto existen muchas variaciones dentro del modelo más básico de una tarjeta de adquisición de datos y según el modelo pueden estar dotadas o no de mecanismos de temporización, pueden programarse interrupciones por la detección de cambio del valor de un bit de algún puerto digital de entrada para monitorizar señales críticas, etc...



Fig.12 Tarjeta de adquisición de datos.

Pueden utilizar varios tipos de bus, siendo el uso del bus PCI el más frecuentemente empleado por las tarjetas de adquisición de datos.

3.4.4.1.1 Conversión Analógica-Digital A/D.

Las tarjetas de adquisición de datos son una ayuda para medir la información del mundo real, representada por señales analógicas. Las señales analógicas vienen de sensores y transductores que convierten temperatura, presión, sonido o luz en voltaje. El muestreo electrónico de señales analógicas es llamado conversión A/D o conversión de analógica a digital (ver figura 13, página 3-25). Dicha conversión cambia los voltajes analógicos en códigos digitales para su procesamiento y almacenamiento en un ordenador.

3.4.4.1.2 Conversión Digital-Analógica D/A.

El proceso complementario es la conversión D/A o conversión de digital a analógica, encargándose de cambiar los datos digitales a voltajes analógicos de salida (ver figura 13, página 3-25). Esto permite al ordenador trabajar con amplificadores de audio, actuadores u otros dispositivos que requieran una tensión analógica de control.

Este es el caso en el que se encuentra la máquina de Langendorff. Tanto en el prototipo de control independiente de temperatura y concentración con 4 bombas como en el prototipo de control exclusivo de la temperatura con 2 bombas, el problema es el mismo: en el sistema existen unas bombas cuyos caudales han de ser controlados mediante valores de tensión. Gracias a los convertidores D/A de la tarjeta de adquisición de datos, se consigue tener las tensiones de control necesarias en los canales analógicos de salida de la tarjeta, y basta conectar cada uno de dicho canales con la entrada de control analógico que posee cada bomba peristáltica empleada.

Muchas tarjetas de adquisición de datos tienen tanto convertidor A/D como D/A. Estos permiten trabajar con medidas computarizadas, realizar control de procesos industriales, experimentos de laboratorio y manipulación de señales de audio.

3.4.4.1.3 Entradas-Salidas Digitales (I/O digitales).

Para comunicarse con un dispositivo digital, muchas tarjetas disponen de entradas-salidas digitales (I/O digitales). Las I/O digitales pueden configurarse para operaciones de entrada o salida, agrupadas en los llamados puertos, frecuentemente formados por ocho líneas digitales. (Ver figura 13, página 3-25).

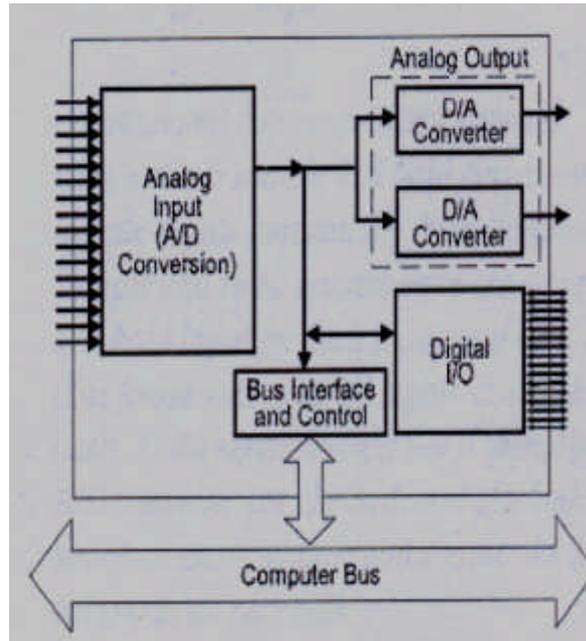


Fig.13 Esquema de una tarjeta de adquisición de datos multifunción con entradas analógicas, salidas analógicas y subsistemas I/O digitales.

3.4.4.1.4 Rangos de entrada.

Una de las primeras consideraciones a realizar al elegir un sistema de adquisición de datos es el rango de tensiones a medir. En primer lugar, se escoge un tipo de sensor o sensores: un indicador de tensión, un termopar, un micrófono o un transductor de presión, por ejemplo. Después se determina el rango de voltajes de tensión que puede suministrar este sensor, a menudo siendo esta información facilitada por el fabricante del sensor.

El rango de tensiones de entrada de una tarjeta de adquisición de datos es un dato facilitado en los catálogos. Puede ser unipolar (entre 0 y 10 voltios solamente, por ejemplo, admitiendo valores solo positivos) o bipolar (± 10 V, por ejemplo, admitiendo tanto tensiones positivas como negativas). Se selecciona una tarjeta que cubra el rango de valores de tensión que se desee medir, tan poco solapadamente como sea posible, para que haya cierto margen superior en el rango que admite la tarjeta, respecto a los valores que mediremos. Así, pequeñas fluctuaciones en las cotas máximas y mínimas de los valores a medir, serán también recogidas.

Muchas tarjetas de adquisición de datos ofrecen múltiples rangos de entrada al usar amplificadores de ganancia, programables por software. Así se puede elegir alguno de los valores posibles para la ganancia, teniendo así un rango u otro para los valores analógicos de entrada con una misma tarjeta. El inconveniente de requerir una instrucción software adicional es que puede bajar la rápida velocidad de adquisición de los datos.

3.4.4.1.5 Tipos de entradas.

El número disponible de canales de entrada determina el número de dispositivos que se puede conectar a una tarjeta con entradas analógicas. El número de canales oscila, según los modelos, de 4 a 64 canales, aunque en el mercado existen ciertos accesorios llamados paneles de expansión que usados conjuntamente con tarjetas compatibles, permiten la conexión de hasta 256 entradas.

Las entradas pueden ser:

✓ **Single-ended.**

- Es una entrada de 1 hilo.

✓ **Differential.**

- Es una entrada de 2 hilos.
- Ofrecen un tipo de inmunidad al ruido llamada rechazo al modo común (CMRR), medida en decibelios o dB. Las entradas diferenciales responden muy bien a las diferencias en los niveles de tensión entre los dos hilos de señal y mejoran la precisión cuando se emplean cables de gran longitud, rangos de tensión de entrada muy bajos (por ejemplo, cuando la escala completa se encuentra por debajo de 1 voltio) o convertidores de alta resolución (por encima de los 16 bits). También es recomendado su uso cuando las señales de entradas procedentes de distintos dispositivos están a diferente potencial de tierra.

✓ **Pseudo-diferencial.**

- Conecta los dos hilos de cada entrada para mejorar el CMRR pero a diferencia de las entradas diferenciales, sólo una de las señales es realmente muestreada por el convertidor analógico-digital.
- Ofrecen un mayor rechazo al modo común en los diseños donde no hay suficiente espacio o energía para una circuitería de entrada verdaderamente diferencial.

3.4.4.1.6 Velocidad. Throughput.

La velocidad es una de las principales consideraciones a realizar al escoger una tarjeta de adquisición de datos. En audio, radar, tests u otras aplicaciones de alta velocidad, la tasa a la cual los datos puedan ser muestreados es frecuentemente el factor más importante al elegir una tarjeta. Dicha tasa se conoce con el nombre de throughput y se mide en mega y kilomuestras por segundo (MS/s y kS/s); por ejemplo una tarjeta con un convertidor A/D de throughput 250 KS/s, puede muestrear 250.000 veces por segundo y transferir los datos resultantes a la memoria del sistema.

3.4.4.1.7 Salidas analógicas.

La mayoría de los circuitos de salida analógicos tienen un convertidor D/A separado y un buffer de datos distinto para cada canal. Esto permite que las salidas sean actualizadas una cada vez o simultáneamente. Cuando dos convertidores D/A son actualizados a la vez, el throughput total puede ser el doble del throughput de un canal simple.

El principal componente en el throughput de un D/A es el tiempo de establecimiento. Aunque la salida de un D/A comienza a cambiar tan pronto como recibe un nuevo valor de datos, la salida es válida sólo después de que la circuitería analógica se haya estabilizado. El tiempo de establecimiento es el periodo que un D/A necesita para alcanzar precisión después de recibir un cambio en la salida, este tiempo aumenta cuando la diferencia entre el valor anterior y el actual es pequeña y disminuye cuando la diferencia entre los valores es grande. El tiempo de establecimiento es del orden de microsegundos.

Para tener una señal de salida analógica más limpia de ruido, algunas tarjetas emplean un circuito adicional que hace que los convertidores D/A produzcan glitches: rápidos pulsos de alta energía causados por las diferencias de sincronización en los interruptores de datos de los convertidores. El circuito mantiene constante la salida durante un breve período, después conecta de nuevo la salida del D/A cuando el glitch ha pasado.

Otra forma de reducir el ruido indeseado en una salida analógica es pasar la salida a través de un filtro de reconstrucción de paso bajo. Algunas tarjetas construyen la señal de salida analógica usando un filtro de interpolación seguido de un conversor oversampling, consiguiendo con este método interpolar automáticamente entre puntos de datos para suavizar la señal resultante, dando el efecto de tener una resolución mucho más alta.

3.4.4.1.8 Método de transferencia de datos.

Para la adquisición de datos a altas velocidades, el método de transferencia de datos es tan importante como la velocidad de los convertidores A/D y D/A. El método de transferencia se refiere a los medios por los cuales los datos son transferidos entre la tarjeta y la memoria del ordenador. Esta transferencia dependerá del tipo de bus implementado en la tarjeta.

Hay una gran cantidad de componentes complejos en un ordenador, que necesitan comunicarse entre sí de una manera rápida y eficiente para que cada componente individual, al ser integrado con el resto, no pierda su velocidad y sus capacidades. Esa es justamente la función del bus, esencialmente es un canal o camino entre los componentes de un ordenador. Existen distintos tipos de buses, basados en distintas tecnologías.

3.4.4.1.8.1 Bus ISA.

El bus ISA (Industry Standard Architecture) está presente en la mayoría de los ordenadores que se venden en la actualidad. Estos ordenadores aceptan tarjetas de adquisición de datos desarrolladas para el PC IBM a principio de la década de los 80.

- ✓ Las tarjetas dotadas de bus ISA utilizan un método DMA (Direct Memory Access) que adapta la velocidad a la que los datos son transferidos a la velocidad de los convertidores.
- ✓ Establece una relación directa entre una tarjeta de adquisición de datos y la memoria del sistema host (sistema en el cual se encuentra instalada.). Una vez instalada, las transferencias de la DMA ocurren sin intervención de la CPU del sistema host.



Fig.14 Modelo comercial DT2811 del fabricante Data Translation. Es una tarjeta de adquisición de datos que integra el bus ISA.

3.4.4.1.8.2 Bus PCI.

El bus PCI (Peripheral Component Interconnect) es el idóneo para aplicaciones que requieren altas velocidades, ya que sus rutas de datos de 32 bits son más de un orden de magnitud más rápidas que las del bus ISA.

- ✓ Es un bus suficientemente rápido para que todos los subsistemas de la tarjeta (convertidor D/A, convertidor A/D y I/O digitales) puedan operar simultáneamente sin interrupción, hasta los límites de la memoria disponible en el sistema.
- ✓ Simplifica la instalación hardware, ya que las tarjetas con bus PCI son Plug&Play (una vez instalada la tarjeta en su slot correspondiente, el ordenador la detecta automáticamente cada vez que es encendido y arranca).

- ✓ Los accesos directos a la memoria se realizan a través del controlador PCI del sistema. Esto permite a la tarjeta de adquisición de datos acceder a la memoria del sistema directamente y a la velocidad completa del bus PCI, usando rápidas operaciones I/O programadas, sin requerir del coste de hardware especial DMA.

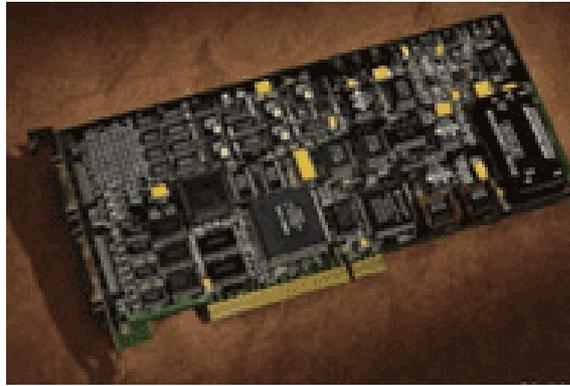


Fig. 15 Modelo comercial de tarjetas de adquisición de datos con bus PCI integrado. Modelo DT3010 del fabricante Data Translation.



Fig. 16 Modelo DT3155 del fabricante Data Translation. Otro ejemplo de tarjeta de adquisición de datos con bus PCI integrado

En vista de las altas prestaciones de velocidad que ofrecen las tarjetas de adquisición de datos con bus PCI en la transferencia de datos, éste es el modelo de tarjeta que se ha elegido para instalar en el ordenador que controla la máquina de Langendorff. Esa es la razón por la que se hace necesario un estudio más detallado de las características del bus PCI para completar el recorrido por los fundamentos técnicos del prototipo de la máquina, por lo que se volverá más adelante a mencionar el bus PCI, para hacer un estudio más exhaustivo de sus características y posibilidades.

3.4.4.1.8.3 PC Card Bus.

La Asociación Internacional de Tarjetas de Memoria para Ordenador Personal (Personal Computer Memory Card International Association, PCMCIA) ha definido un estándar para las tarjetas externas de Plug&Play extremadamente compactas (del tamaño de una tarjeta de crédito) que añaden funcionalidad y capacidades a los ordenadores host que alojan ese tipo de tarjeta.

- ✓ Estas tarjetas se instalan en unas ranuras (slots), disponibles en esas reducidas dimensiones en el ordenador host.
- ✓ Estas tarjetas de PC Card Bus fueron diseñadas inicialmente para usarlas en ordenadores portátiles, que suelen tener dos slots PCMCIA.
- ✓ Mientras que los dispositivos PCMCIA están diseñados para ser Plug&Play bajo el sistema operativo Windows, muchas tarjetas PCMCIA requieren que se sustituya una parte del software del sistema, Card and Socket Services, con una versión de cliente que soporte sólo el dispositivo añadido. Por tanto, al intercambiar los dispositivos PCMCIA hay que cambiar el software.



Fig. 17 Modelos comerciales de tarjetas PCMCIA de adquisición de datos.

3.4.4.2 Bus PCI.

En el ordenador que controla la máquina de Langendorff se instala una tarjeta de adquisición de datos comercial. El modelo por el que se opta, tiene una interfaz de funciones digitales que utiliza el bus PCI, el cual proporciona al sistema unas altas prestaciones en la velocidad y transferencia de datos. Para completar el estudio de los fundamentos técnicos relativos al hardware y en concreto a la tarjeta, que hacen realizable el prototipo de la máquina de Langendorff, tan sólo queda profundizar en las características y posibilidades que ofrece el bus PCI dentro del sistema en el que está integrado.

PCI es el acrónimo de Peripheral Component Interconnect, un estándar de bus local desarrollado por Intel Corporation. La mayoría de los actuales ordenadores PCs incluyen un bus PCI además de un bus de expansión ISA más general. PCI también es usado en las versiones recientes de los ordenadores Macintosh.

PCI es un bus de 64 bits, aunque normalmente está implementado como bus de 32 bits. Puede funcionar a velocidades de reloj de 33 y 66 MHz. Por ejemplo a 32 bits y 33 MHz, su rendimiento es de una tasa (throughput) de 133MBps.

Aunque PCI fue desarrollado por Intel, PCI no está vinculada a ninguna familia particular de microprocesadores.



Fig. 18 Tarjeta típica PCI.

Los buses han crecido y han evolucionado a lo largo de los años en un esfuerzo de coordinar la funcionalidad de todos los componentes de un ordenador. A pesar de eso, la evolución de los buses ha sido sorprendentemente lenta comparada a la evolución de otras tecnologías. La mayoría de los ordenadores que se venden actualmente, todavía tiene un bus ISA.

Hay varias razones para esta longevidad de los buses:

- ✓ Hay una necesidad de compatibilidad a largo plazo con un gran número de fabricantes de hardware.
- ✓ Antes de la aparición de la multimedia, pocos periféricos hardware utilizaban completamente la velocidad del bus.

Un ordenador típico tiene dos buses:

- ✓ Bus del sistema o bus local.
 - Conecta el microprocesador (unidad central de proceso) y la memoria del sistema.
- ✓ Otros buses, como los buses ISA y PCI.
 - Se conectan al bus del sistema a través de un puente, que es parte del chip del ordenador y actúan regulando el flujo de datos, integrando e incorporando los datos procedentes de otros buses al bus del sistema.

Como la velocidad de las unidades centrales de procesamiento (CPUs) y de la memoria volátil RAM ha incrementado, se vuelve más importante la necesidad de aislar el camino entre el procesador y la memoria. Se creó un bus llamado **DIB** (Dual Independent Bus) para sustituir el bus de sistema estándar. DIB sustituye el bus de sistema simple por un bus doble, formado de un bus delantero (Frontside Bus) y un bus trasero (Backside Bus):

✓ **Backside Bus:**

Proporciona un rápido canal directo entre la CPU y el nivel 2 de memoria Caché.

✓ **Frontside Bus:**

A través del controlador de memoria:

- Conecta la memoria del sistema a la CPU .
- Conecta los buses a la CPU y a la memoria del sistema.

En la figura 19 (pág.3-5) se observan más claramente estas relaciones entre los distintos buses y la CPU, la memoria volátil y otros dispositivos.

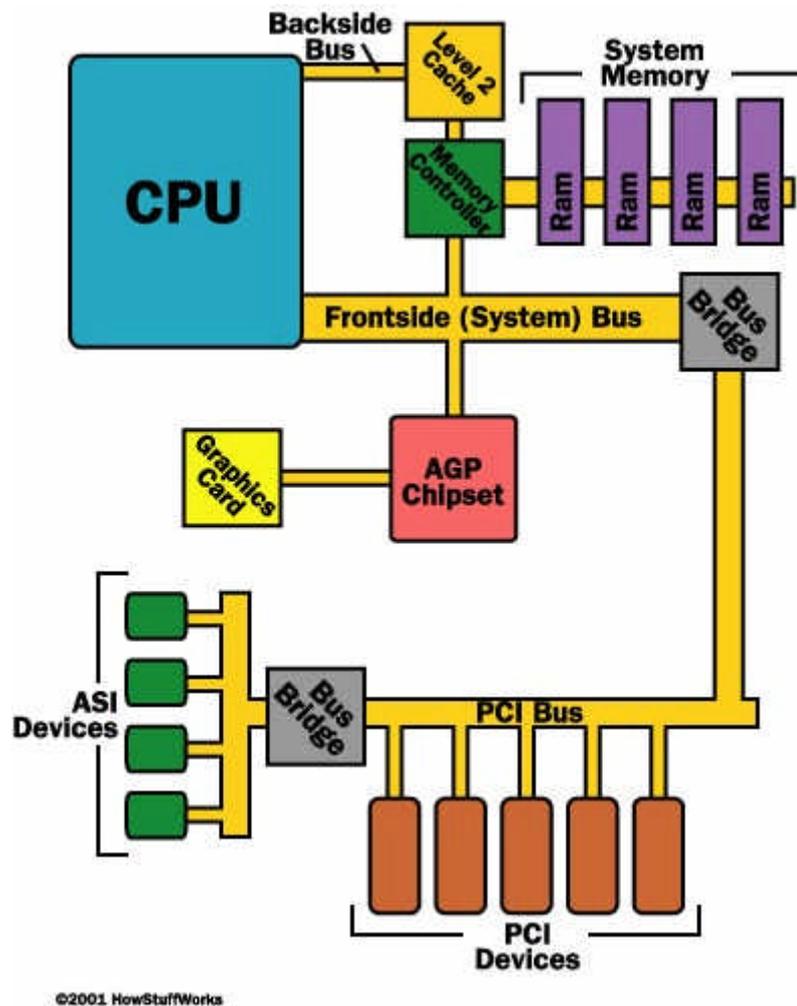


Fig. 19 Esquema de la conexión de varios buses a la CPU.

El otro bus principal, el Bus Compartido (Shared Bus) sirve para conectar componentes adicionales al ordenador. Recibe el nombre de Bus Compartido porque permite a múltiples dispositivos acceder a la CPU y a la memoria del sistema a través de las mismas líneas digitales. Estos dispositivos son por ejemplo: disco duro, módem, tarjeta gráfica, tarjeta de sonido, tarjeta controladora, scanner, etc...

El primer bus de PC funcionaba a 4.77 MHz (millón de ciclos por segundo) y tenía un ancho de 8 bits, por lo que podía procesar 8 bits de datos en cada ciclo. En 1982 fue mejorado hasta conseguir un ancho de 16 bits y una frecuencia de 8 MHz, conociéndose entonces como ISA. Este diseño de bus es capaz de transferir datos a una tasa de hasta 16MBps (megabytes por segundo), suficientemente rápida incluso para algunas aplicaciones actuales.

A medida que la tecnología avanzaba, aparecieron también otros buses como EISA (Extended Industry Standard Architecture) de 32 bits y 8 MHz, y VL-Bus (Vesa Local Bus), también conocido como VESA, ya que Video Electronics Standards

Association creó el estándar. VL-Bus era un bus de 32 bits y operaba a la velocidad del bus local, que normalmente era la velocidad del propio procesador. Esto se conseguía porque el VL-Bus accede directamente a la CPU, lo cual funcionaba correctamente para uno o dos dispositivos, pero al conectar más de dos dispositivos al VL-Bus, se introducía la posibilidad de interferencia con la ejecución de la CPU. Por ello, este bus fue empleado sólo para conectar una tarjeta gráfica, un componente que realmente se beneficia de un acceso de alta velocidad a la CPU.

Durante la primera parte de la década de los 90, Intel introdujo el nuevo estándar de bus PCI, como un híbrido de tipos entre ISA y VL-Bus. Proporciona acceso directo a la memoria del sistema para dispositivos conectados, pero usa un puente para conectarse al Bus Frontside y por tanto a la CPU. Básicamente, esto significa que es capaz de incluso una ejecución más rápida que VL-Bus además de que elimina la fuente de interferencias con la CPU. El puente regula la velocidad del bus PCI independientemente de la velocidad de la CPU, lo que da un mayor grado de fiabilidad.

PCI puede conectar más dispositivos que VL-Bus, hasta 5 componentes externos. Cada uno de los 5 conectores para un componente externo puede ser sustituido por dos dispositivos fijos a la placa madre. También pueden instalarse más de una tarjeta PCI en el mismo ordenador, aunque no es una práctica habitual.

PCI inicialmente operaba a 33MHz usando rutas de 32 bits. Posteriormente se ha conseguido incrementar la velocidad a 66MHz y las rutas a 64 bit. Actualmente PCI-X proporciona transferencias de 64 bits a una velocidad de 133MHz, consiguiendo la sorprendente tasa de transferencia de 1 GBps (gigabyte por segundo).

Tipo de Bus	Rutas de Datos	Velocidad	Tasa de Transferencia
ISA	16 bits	8 MHz	16 MBps
EISA	32 bits	8 MHz	32 MBps
VL-bus	32 bits	25 MHz	100 MBps
VL-bus	32 bits	33 MHz	132 MBps
PCI	32 bits	33 MHz	132 MBps
PCI	64 bits	33 MHz	264 MBps
PCI	64 bits	66 MHz	512 MBps
PCI	64 bits	133 MHz	1 GBps

Fig. 20 Comparativa entre distintos tipos de buses.

Las tarjetas PCI usan 47 pines para conectarse (49 pines para una tarjeta maestra, que puede controlar el bus PCI sin intervención de la CPU). El bus PCI es capaz de trabajar con un número tan bajo de pines gracias a la multiplexación hardware que implementa, que implica que un dispositivo envía más de una señal por el mismo pin. PCI es compatible con dispositivos que usan 5 o 3.3 voltios.



Fig.21 Pines de conexión de la tarjeta con bus PCI.

Aunque Intel propuso el estándar PCI en 1991, no alcanzó popularidad hasta la llegada del sistema operativo Windows 95 en 1995. Este repentino interés en PCI fue debido al hecho de que Windows 95 soportaba la capacidad de Plug and Play.

3.4.5 HERRAMIENTAS DE DESARROLLO SOFTWARE.

La tarjeta de adquisición de datos tiene capacidad para controlar y monitorizar dispositivos externos, capturar señales, enviar y transmitir señales datos y señales de control. Las acciones concretas que realice la tarjeta dependerán de cómo el programador diseñe la aplicación que a su vez controla la tarjeta. En esa aplicación es donde se codificará la secuencia de acciones que se desean y las capacidades que se quieren aprovechar de las disponibles en una tarjeta de adquisición de datos. Para el diseño y posterior codificación de la aplicación se requerirán unas herramientas de desarrollo software compatibles con los drivers de la tarjeta, para que la aplicación se pueda traducir e interpretar en comandos a nivel hardware que actúan sobre la tarjeta, donde estos comandos dependerán de los drivers concretos de cada modelo de cada tarjeta y serán transparentes al usuario, que sólo percibirá el nivel de aplicación.

Las tarjetas de adquisición de datos son compatibles con una gran variedad de productos software, destinados a un amplio rango de usuarios. Para asegurar la integridad de los datos, los fabricantes desarrollan paralelamente las tarjetas y el software adecuado, creando entornos de programación visuales que soportan operación continua y transferencia de datos sin espacios muertos entre la memoria y el disco duro. Se han desarrollado muchas herramientas para coordinar y satisfacer simultáneamente a los distintos buses del PC, las diferentes arquitecturas y los requerimientos de velocidad y transferencia.

Estas herramientas de desarrollo software permiten crear aplicaciones con capacidad de transferir flujos de datos de longitud arbitraria desde la memoria al disco duro y viceversa, a altas velocidades, hasta el máximo throughput de la tarjeta. La adquisición de datos usando estas herramientas de desarrollo software está típicamente limitada en duración sólo por la cantidad de memoria disponible o espacio en el disco duro. Para asegurar que no se ha perdido ningún valor de datos, la mayoría de las tarjetas con operación continua están dotadas de un circuito adicional de aviso de error, que se activa cuando un nuevo valor de datos se escribe encima de un valor previo.

3.4.5.1 Entorno de programación: HP VEE Y DT VPI

En el prototipo de máquina de Langendorff se emplea como herramienta de desarrollo software el entorno de programación formado por el lenguaje visual de programación HP VEE y DT VPI, que proporcionan capacidades para la adquisición de datos, el análisis y la monitorización. Este entorno de programación funciona bajo el sistema operativo Windows.

Este paquete es recomendado para ingenieros y científicos por el fabricante Data Translation, para llevar a cabo tests de fabricación o medidas complejas. Este fabricante ofrece distintas posibilidades de herramientas de desarrollo software, que engloba bajo el nombre general de arquitectura de capas abiertas.

Este entorno de programación visual aísla la aplicación software de los comandos específicos hardware, haciéndolos transparentes al usuario:

- ✓ DT VPI hace las funciones de interfaz e intérprete entre la tarjeta como componente hardware y HP VEE como componente software del sistema. Añade funciones a HP VEE específicas de la tarjeta de adquisición instalada, en función de las capacidades reales que ésta tiene y de la información extraíble de sus drivers.
- ✓ HP VEE es un entorno de programación gráfica, permite construir una aplicación usando una intuitiva interfaz de usuario gráfica. La más reciente versión, HP VEE 6.0 trae incorporado MATLAB, por lo que tiene adicionales capacidades para el procesamiento de la señal, teniendo en un único entorno gráfico, capacidades de visualización y análisis.

3.4.5.1.1 Arquitectura de capas abiertas.

Nos centramos en dos niveles de las siete posibles capas que podemos distinguir según el estándar OSI en la arquitectura de un sistema:



Fig. 22 Simplificación de la arquitectura de capas abiertas.

En el sistema de la máquina de Langendorff, podemos identificar cada uno de estos dos niveles:

- ✓ A nivel de aplicación está el programa desarrollado para controlar la máquina, codificado usando el entorno de programación formado por el lenguaje visual de programación HP VEE y DT VPI. Este programa también lo llamamos aplicación.
- ✓ A nivel físico están los comandos hardware que actúan directamente sobre la tarjeta, ordenándole acciones concretas.

Las herramientas de desarrollo software proporcionadas por el fabricante Data Translation aseguran el aislamiento entre la aplicación que se diseña con su entorno de programación (HP VEE y DT VPI) y los comandos específicos hardware de la tarjeta.

Como resultado del aislamiento entre la aplicación y los comandos específicos hardware, se asegura automáticamente la completa portabilidad del código de la aplicación desarrollada, entre tarjetas de adquisición de datos compatibles, aunque cada una de las tarjetas tenga sus drivers específicos.

Este es el sentido de una arquitectura de capas abiertas: a pesar de cambiar el nivel inferior de programación (nivel físico), podríamos conservar el código del nivel superior de programación (nivel de aplicación). A pesar de instalar los drivers de un dispositivo hardware distinto, y que por tanto cambien los comandos que actúen sobre la tarjeta a nivel físico, las funciones de HP VEE quedan completamente aisladas de la ejecución concreta de los comandos del hardware y por tanto la aplicación es reutilizable. Esta independencia del nivel de aplicación respecto del nivel físico del hardware permite que se actualice el hardware sin necesidad de reprogramar, por lo que cualquier inversión en tiempo y dinero que hagamos en desarrollo del software quedará protegida.

3.4.5.1.2 Características de HP VEE.

- ✓ Entorno gráfico único, que maneja tanto medidas y recogida de datos como análisis matemático.
- ✓ Integra en un único entorno lo que antes solía requerir 2 paquetes software separados, uno para recoger datos y realizar medidas y otro para el análisis matemático.
- ✓ Compatible con cualquier tarjeta de PC o instrumento del mercado líder.
- ✓ Compatible con cualquier equipo o robot mediante el uso de Actives.
- ✓ Compatible con cualquier aplicación software (browsers, Excel, Word, MATLAB).
- ✓ Compatible con lenguajes de programación (Visual Basic, Visual C++, LabVIEW).
- ✓ Puede ser usado como programa aislado o puede servir para interactuar con un instrumento o un dispositivo y así proporcionar los resultados del análisis y las medidas.
- ✓ Código portable a cualquier sistema en que el hardware funcione también con DT VPI como interfaz.
- ✓ Se puede emplear con ilimitado número de instrumentos.

- ✓ Ilimitadas ejecuciones del programa sin que caduque la licencia del programa.
- ✓ Reutiliza código escrito en C/C++ o Visual Basic, por lo que aprovecha inversiones en programación realizadas previamente.

3.4.5.1.3 Características de DT VPI.

- ✓ Funciona de interfaz e intérprete entre la tarjeta como componente hardware y HP VEE como componente software del sistema.
- ✓ Añade menús de adquisición de datos que se integran con el resto de menús mostrados por HP VEE.
- ✓ Añade funciones a HP VEE específicas de la tarjeta de adquisición instalada, en función de las capacidades reales que ésta tiene y de la información extraíble de sus drivers.
- ✓ Añade funciones y controles para configurar y programar fácilmente las tarjetas de Plug&Play del fabricante Data Translation.
- ✓ Capacidad de control sobre tarjetas cuya funcionalidad sea tanto de alto como de bajo nivel.

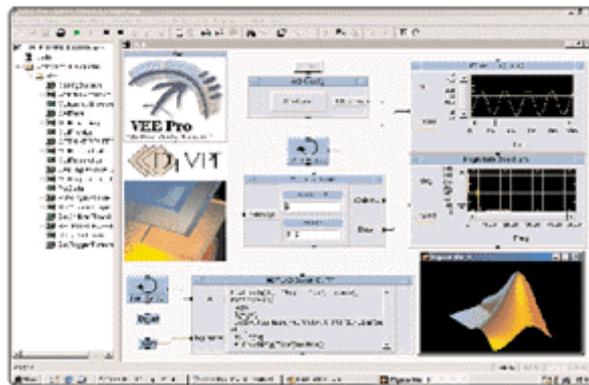


Fig. 23 Ejemplo de pantalla con HPVEE y DT VPI.

3.4.5.1.4 Requerimientos del sistema.

Para poder instalar y ejecutar el entorno de programación formado por HP VEE y DT VPI, son necesarios unos recursos mínimos:

- ✓ PC compatible con un procesador Pentium 120 MHz como mínimo.
- ✓ Unidad de CD-ROM.
- ✓ Al menos 24 MB de RAM o más, recomendada para Windows 95/98.
- ✓ Al menos 48 MB de RAM o más, recomendada para Windows NT/2000.
- ✓ Al menos 25 MB libres de disco duro.
- ✓ Sistema operativo Windows (válido 95, 98, NT 4.0 ó 2000)
- ✓ Drivers apropiados de la tarjeta de adquisición de datos.

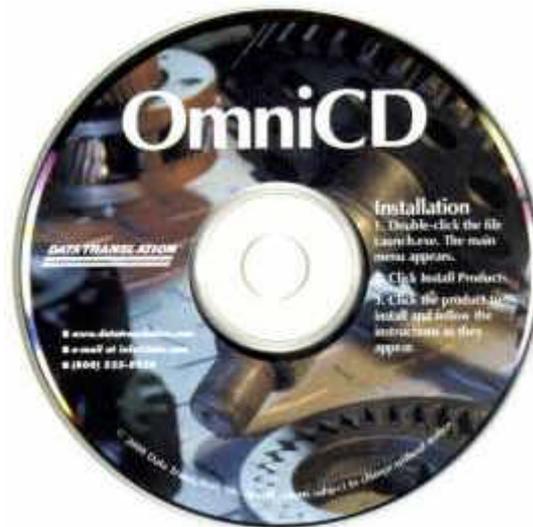


Fig. 24. Los drivers de la tarjeta PCI suelen administrarse en un CD.

4 DESCRIPCIÓN GLOBAL DE LA SOLUCIÓN.

4.1 INTRODUCCIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.

A continuación se hace un recorrido cualitativo por la implementación del proyecto y la solución adoptada para crear una máquina de Langendorff que facilite las tareas de criopreservación de órganos.

La finalidad del presente capítulo es tan sólo extraer y ofrecer una idea general y clara de los objetivos perseguidos y facilitar la comprensión del consiguiente diseño que se ha desarrollado para conseguir tales propósitos.

Se presenta la organización del sistema total en subsistemas, sin entrar en tecnicismos ni detalles de cómo estos subsistemas están implementados, tan sólo se atenderá a su funcionalidad, su interrelación y el papel que desempeñan estos bloques menores, una vez integrados en el sistema total que constituye el prototipo de la máquina.

4.1.1 DESCRIPCIÓN DE OBJETIVOS.

Desde el punto de vista técnico, la máquina de Langendorff tiene como objetivo conseguir en cada instante la inyección de una disolución de unas determinadas características en un corazón expuesto a tal perfusión. Estas características vienen determinadas por un perfil que introduce el usuario como dato de entrada en la aplicación que gestiona y controla la máquina completa.

- ✓ En el caso del prototipo de máquina de Langendorff con control independiente de concentración y temperatura:
 - El perfil está formado por dos funciones: la función matemática que representa la temperatura frente al tiempo como variable independiente y la función matemática que representa la concentración frente al tiempo, donde el tiempo es de nuevo la variable independiente.
- ✓ En el caso del prototipo de máquina de Langendorff con control exclusivo de temperatura:
 - El perfil es la función matemática que representa la temperatura frente al tiempo como variable independiente.

Por tanto, a lo largo del tiempo que dura el proceso de criopreservación, cada instante está asociado a una concentración y una temperatura (en el primer caso), o tan sólo una temperatura (en el segundo caso). En cada instante, la disolución total ha de cumplir las características asociadas a ese tiempo.

El procedimiento será muy similar en ambos prototipos, porque para tener el prototipo con control independiente de concentración y temperatura, el montaje hardware sólo requiere la ampliación de utilizar dos canales analógicos más de la tarjeta de adquisición de datos para controlar dos bombas adicionales idénticas a las ya instaladas. La variación será mayor en la aplicación software que controla la máquina, presentándose en el presente proyecto ambas versiones de la aplicación diseñada.

4.1.1.1 Control independiente de concentración y temperatura

La disolución inyectada en el corazón es el resultado de que se mezclen cuatro cantidades distintas de fluidos. Dicha disolución tiene en cada instante unos valores de temperatura y concentración independientes entre sí.

4.1.1.1.1 Especificación de temperatura.

A continuación se expone cómo se consigue que la disolución cumpla la **especificación de temperatura**:

- ✓ Dos de las cuatro cantidades mezcladas para conseguir la disolución son de agua, bombeadas por sendas bombas peristálticas de dos baños que contienen agua a distintas temperaturas.
 - Un baño de agua está a temperatura T2.
 - Un baño de agua está a temperatura T3.

- ✓ Las otras dos cantidades a mezclar son anticongelante, que de igual manera han sido bombeadas por otras dos bombas independientes, de dos baños separados que se encuentran a diferente temperatura.
 - Un baño de anticongelante está a temperatura T1.
 - Un baño de anticongelante está a temperatura T4.

- ✓ Resumidamente, disponemos de cuatro baños, y la disolución está formada por cuatro cantidades, que han sido extraídas de un baño independiente, por una bomba peristáltica independiente. (Ver fig.25, pág.4-3).

- ✓ En cada instante deseamos que la disolución total tenga una temperatura concreta y una concentración determinada. Ambos valores son totalmente independientes y no están ligados entre sí, de manera que al elegir una temperatura en un instante determinado para la mezcla total, no se fuerza ningún valor de la concentración, lo cual sí ocurrirá para el prototipo construido con dos bombas.

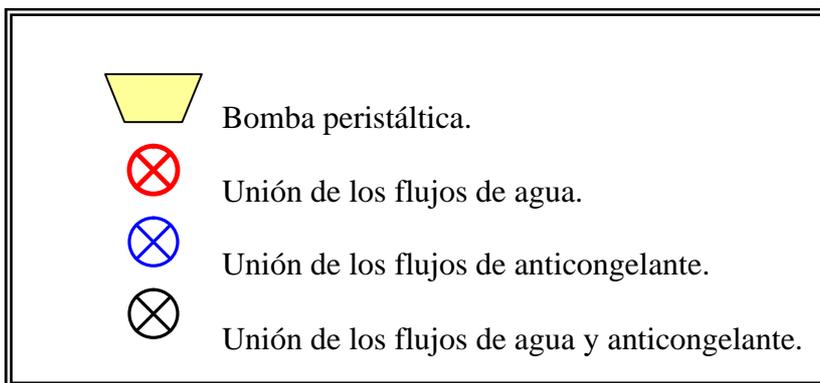
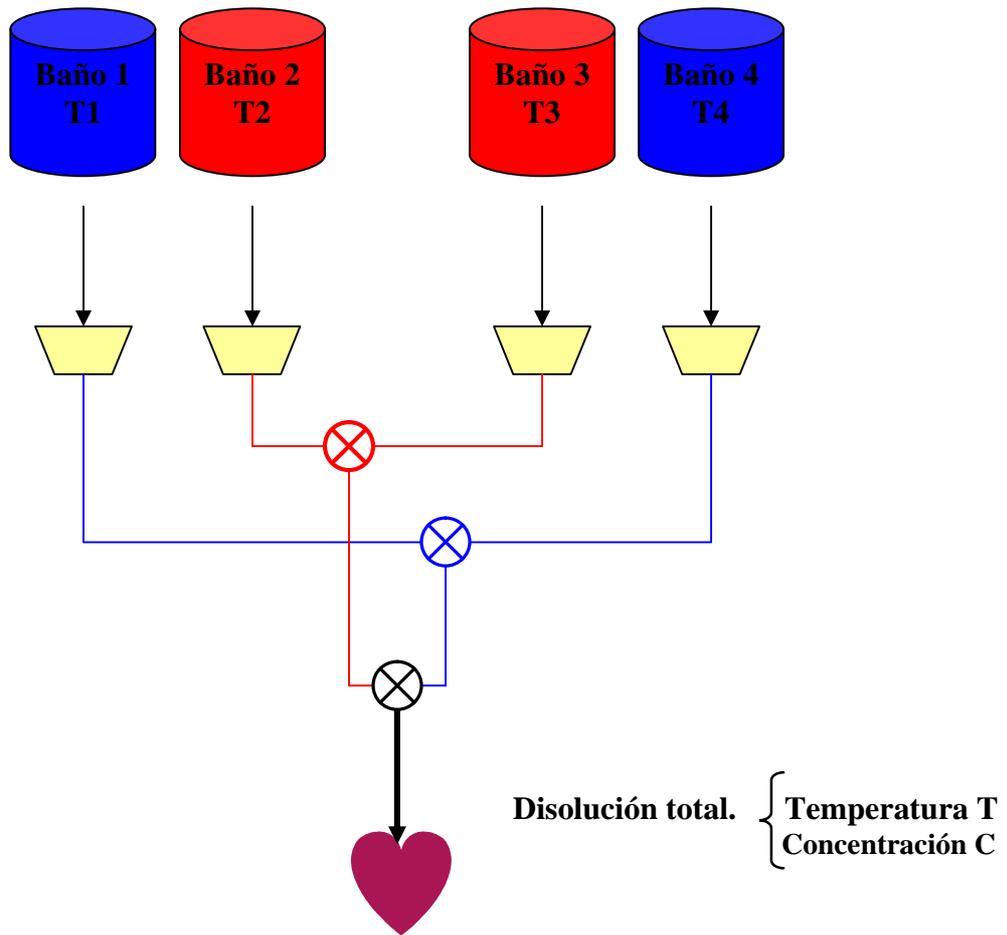


Fig.25 Esquema de temperaturas de los 4 fluidos que forman la disolución en una máquina de Langendorff con control independiente de temperatura y concentración.

- ✓ Este control independiente de la concentración y la temperatura es posible debido a que se disponen de dos baños a distinta temperatura de una misma sustancia.
- ✓ Si la disolución total en un instante de tiempo tiene que estar a una temperatura **T**, se va a forzar que el flujo total de agua, resultado de mezclar lo que bombearon las bombas peristálticas de los dos baños de agua, esté a temperatura **T**.
 - Las dos cantidades de agua que se mezclan entre sí, deben ser tales que el flujo total de agua se encuentre a la temperatura **T**, sabiendo que se mezcla una cantidad de agua a temperatura T_2 y otra cantidad a temperatura T_3 .
- ✓ De igual modo se obliga a que el flujo total de anticongelante, consecuencia de la unión de los caudales proporcionados por las dos bombas asociadas a sendos baños de anticongelante, esté a temperatura **T**.
 - Las dos cantidades de anticongelante que se mezclan entre sí, deben ser tales que el flujo total de anticongelante se encuentre a la temperatura **T**, sabiendo que mezclo una cantidad de anticongelante a temperatura T_1 y otra cantidad a temperatura T_4 .
- ✓ Por tanto, en la unión de ambos caudales, agua y anticongelante, se mantiene idealmente la temperatura **T** porque se están mezclando dos cantidades de fluidos de densidad prácticamente igual y que están a la misma temperatura, por lo que no debe haber intercambio de calor.

4.1.1.1.2 Especificación de concentración.

A continuación se expone cómo se consigue que la disolución cumpla la **especificación de concentración**:

- ✓ Deseamos tener dos cantidades mezcladas de agua o dos cantidades mezcladas de anticongelante, con temperatura resultante **T** para la mezcla de ambas. Sabiendo que mezclamos dos líquidos iguales pero de temperaturas distintas, habría muchas soluciones posibles, en las que las dos cantidades mezcladas guardarían cierta proporcionalidad.
 - Sea un baño de temperatura T_x del que tomamos cierta cantidad **X** y un baño de temperatura T_y del que también cogemos cierto volumen **Y** para tener una mezcla total a temperatura **T**.

La ecuación que refleja el intercambio de calor realizado entre ambas cantidades y cómo se igualan sus temperaturas sería:

$$T_x \cdot X + T_y \cdot Y = T(X + Y)$$

donde $(X+Y)$ es el volumen total de la mezcla.

- ✓ Infinitas combinaciones de valores (X,Y) serían posibles siempre que ambas cantidades estuviesen disponibles en los baños. Queda por tanto un grado de libertad libre y que se aprovechará para imponer la condición de concentración en la disolución total.
 - La concentración es la proporción que existe entre dos cantidades mezcladas, por lo que establece una relación entre X y Y . Esta proporción, unida a la anterior relación de temperaturas, fijaría completamente los caudales empleados.

4.1.1.1.3 Especificación de volumen.

A parte de las consabidas especificaciones de temperatura y concentración, existe una tercera especificación, es una **especificación de volumen**:

Esta especificación sólo depende del tipo de órgano a perfundir y exige que la cantidad de disolución total no tome cualquier valor porque para existe cierto límite, por encima del cual el volumen de líquido que perfunde el órgano ejercería una excesiva presión al ser inyectado y dañaría los tejidos irremediamente.

Por tanto la suma de los cuatro caudales que se mezclan no puede sobrepasar un volumen máximo que se fijará en un valor concreto para cada tipo de órgano y que aumentará a medida que el órgano objeto de la criopreservación aumente también de tamaño. Un corazón de cerdo soporta mayores volúmenes de inyección de disolución crioprotectora (del orden de 50 ml/min) que un corazón de conejo,(del orden de 5 ml/min). Esta especificación fijará un valor que será invariable para todos los experimentos que se realicen sobre un órgano de la misma naturaleza, sea cual sea el perfil elegido por el usuario para la disolución.

4.1.1.1.4 Modelado.

Estas especificaciones sobre el volumen máximo admisible, la temperatura y la concentración de la disolución total, se modelan con cuatro ecuaciones, que se detallarán más adelante, dentro del subsistema en el que se resuelven. Cada una de las incógnitas es la cantidad de flujo (ml/min) que se bombea de cada baño, para que la mezcla total cumpla con las condiciones requeridas.

El proyecto engloba un desarrollo teórico de ciertos conceptos relativos a la Criopreservación, un sencillo modelado matemático de la máquina mediante un sistema de ecuaciones, la instalación de la tarjeta de adquisición de datos y las bombas

peristálticas disponibles y fundamentalmente, la parte más extensa del proyecto es el desarrollo de la aplicación software que controla las bombas y hace de sencilla interfaz gráfica entre el usuario de la máquina y el sistema total.

Se utilizará como herramienta principal de trabajo el entorno de programación HP VEE y DT VPI, para diseñar la aplicación software que sirva de programa de usuario, presentando una sencilla interfaz visual, y a la vez, controle la tarjeta de adquisición de datos. Consiguiendo un control de la tarjeta, controlamos indirectamente las bombas peristálticas, ya que las salidas analógicas de la tarjeta están conectadas directamente con las entradas de tensión de control analógico de la velocidad del rotor de las bombas. Al controlar la velocidad del cabezal de las bombas, tenemos total control sobre el flujo que dispensan y por tanto sobre la disolución total, que resulta de mezclar los 4 flujos. Al controlar los flujos, podemos controlar la temperatura y la concentración de la mezcla total, en virtud de las ecuaciones que modelan el problema.

Para el desarrollo de la aplicación, será necesario medir la función de transferencia tensión / caudal de las bombas para utilizarla en el subsistema correspondiente. Así mismo será imprescindible crear un mecanismo de medición del tiempo, para que en tiempo real se pueda ejecutar el perfil de temperaturas y concentraciones seleccionado por el usuario, a pesar de trabajar con una tarjeta que carece de relojes, contadores o temporizadores. La única referencia de reloj que podemos usar es la propia referencia del ordenador que aloja la tarjeta.

4.1.1.2 Control exclusivo de temperatura.

El prototipo de 2 bombas sigue idéntico procedimiento de diseño e implementación que el prototipo con control independiente de la temperatura y la concentración, con algunas simplificaciones ya que se trata de una versión reducida de la máquina de Langendorff de 4 bombas.

En este caso, la disolución resulta de mezclar tan sólo dos cantidades, una de agua y otra de anticongelante, que han sido extraídas de un baño independiente, por una bomba peristáltica independiente; veamos qué similitud guarda con el prototipo de 4 bombas:

- ✓ Debe cumplir la misma **especificación de volumen máximo**.
Las suma de las dos cantidades mezcladas no pueden superar un valor máximo que garantiza que el volumen de inyección no ejercerá una presión nociva para el órgano criopreservado.
- ✓ No existe la especificación de concentración.
- ✓ Debe cumplir la misma **especificación de temperatura**, en cada instante deseamos que la disolución total tenga una temperatura concreta **T**. A continuación se expone cómo se consigue que la disolución cumpla este requerimiento:

- Una de las dos cantidades mezcladas para conseguir la disolución es un volumen X de agua, bombeado por una bomba peristáltica de un baño que contiene agua a temperatura T_x .
- La otra cantidad a mezclar es un volumen Y de anticongelante, que de igual manera ha sido bombeado por otra bomba independiente, de otro baño separado que se encuentra a diferente temperatura T_y .
- La ecuación que rige el equilibrio térmico es:

$$T_x \cdot X + T_y \cdot Y = T(X + Y)$$

donde $(X+Y)$ es el volumen total de la mezcla.

- Infinitas combinaciones de valores (X,Y) serían posibles siempre que ambas cantidades estuviesen disponibles. Este grado de libertad libre desaparece al unir esta ecuación a la que resulta de la especificación de volumen máximo.

4.1.1.2.1 Modelado.

Estas especificaciones sobre el volumen máximo admisible y la temperatura, se modelan con dos ecuaciones, que se detallarán más adelante, dentro del subsistema en el que se resuelven. Cada una de las incógnitas es la cantidad de flujo (ml/min) que se bombea de cada baño, para que la mezcla total cumpla con las condiciones requeridas.

Las mayoría de las tareas a realizar son idénticas a la descritas para el prototipo con 4 bombas:

- ✓ Es necesario el mismo desarrollo teórico de ciertos aspectos de interés de la Criopreservación.
- ✓ Es necesario el modelado matemático de la máquina mediante un sistema de ecuaciones, que resulta aún más sencillo que en el caso anterior ya que no es más que una simplificación del sistema de ecuaciones que describe el prototipo con control independiente de tensión y temperatura.
- ✓ Tienen en común la tarea de instalación de la tarjeta de adquisición de datos y conexionado de las bombas peristálticas disponibles a los canales analógicos de salida.
- ✓ Tienen en común las medidas de la función de transferencia tensión / caudal de las bombas, ya que se utilizan bombas idénticas en ambos montajes.

- ✓ Tienen en común la creación de un mecanismo de medición del tiempo, para que en tiempo real se pueda ejecutar el perfil de temperaturas seleccionado por el usuario.

- ✓ Fundamentalmente la diferencia entre ambos proyectos estriba en la aplicación software que controla las bombas y que hace de sencilla interfaz gráfica entre el usuario de la máquina y el sistema total. De igual forma se usará el entorno de programación HP VEE y DT VPI.

4.2 SOLUCIONES ALTERNATIVAS Y ANTECEDENTES GENERALES.

4.2.1 PROCEDIMIENTOS ANTERIORES: TÉCNICAS DE HIPOTERMIA.

Anteriores a las técnicas de criopreservación, en sus variantes de procesos de congelación-descongelación y vitrificación, se han venido aplicando técnicas de hipotermia para preservar el corazón. Antes de proceder a aplicar técnicas de hipotermia, se proporciona al órgano un pretratamiento, en el que se le administran ciertos agentes farmacológicos, tales como glucosa, lidocaína o adenosina, para incrementar la tolerancia miocárdica a la isquemia. La isquemia es el estado patológico en el que las células se quedan sin oxígeno y nutrientes, debido a que los tejidos no reciben riego sanguíneo por una obstrucción de las arterias.

A principio de la década de los 70, se comenzó a aplicar técnicas de hipotermia, en las que se perfundían corazones en máquinas de Langendorff, inyectando en ellos unas soluciones cardiopléjicas cristaloides, cuyas concentraciones en potasio conseguían preservar el miocardio. El éxito de la cardioplejia dependía de la concentración de potasio, la temperatura de la solución, los aditivos y la duración del intervalo isquémico. La hipotermia reduce la tasa metabólica de los tejidos por encima del 99%. Inmediatamente después de la inyección de una solución cardiopléjica, sin periodo de almacenamiento, se puede esperar más del 99% de la recuperación de la respuesta funcional del corazón, si la solución contiene polietilenglicol (PEG). En cualquier caso, con las soluciones cardiopléjicas, sólo se conseguían períodos transitorios de almacenamiento.

4.2.2 PROTOTIPOS DE SISTEMAS ANTERIORES.

A continuación se mencionan algunos prototipos de máquinas y sistemas que ya se han aplicado con anterioridad en la conservación de órganos. Algunos sirven de antecedente al prototipo que se ha diseñado en el presente proyecto y otros presentan soluciones alternativas para resolver el problema de la preservación de órganos:

- ✓ Waters Inc. y Belzer utilizaron bombas de perfusión intra-abdominal, encontrándose que la perfusión continua producía formación de edemas y una prolongada exposición a niveles altos de oxígeno, la cual aumenta la susceptibilidad del corazón a los ataques de los radicales libres.
- ✓ Una técnica de perfusión alternativa, la microperfusión, se empleó por Susuki para experimentar con corazones de perros, utilizando una bomba de goteo con un flujo de 20ml/100g por hora, que le permitió preservar los órganos con éxito durante 24 horas.

- ✓ Wicomb, Portnoy y Collins diseñaron un dispositivo de perfusión tipo jeringa con un flujo de 10-15ml/100g por hora, (fig. 26). Este dispositivo se empleó para perfundir corazones de conejos, consiguiendo que después de 24 horas de almacenamiento la formación de edemas resultara insignificante y la recuperación de la funcionalidad fuera cercana a los valores de control.

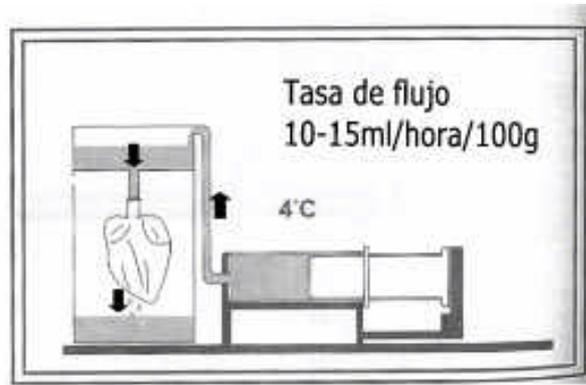


Fig.26. Microperfusión con un dispositivo de perfusión tipo jeringa.

- ✓ En 1981 se preservó por perfusión el primer corazón humano, usando una bomba con puente de aire. Los corazones fueron almacenados entre 4 y 16 horas, siendo transplantados a personas, en los que se observó una buena funcionalidad, tanto inmediata como a largo plazo.
- ✓ En 1989 en San Francisco, se preservaron 22 corazones utilizando PEG 20M, 8 de los cuales recibieron microperfusión y fueron almacenados entre tres horas y cinco horas y media. Esos corazones fueron transplantados posteriormente, consiguiendo en todos los casos más de 6 años de vida en el receptor.

4.3 DESCRIPCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE LA SOLUCIÓN ADOPTADA. ANÁLISIS DE LA SOLUCIÓN.

Una vez definida la situación y estudios que han precedido al presente proyecto, podemos describir los bloques fundamentales que lo constituyen:

- ✓ Estudio teórico de la Criopreservación.
- ✓ Desarrollo hardware de la máquina de Langendorff.
- ✓ Desarrollo software de la máquina de Langendorff.

4.3.1 ESTUDIO DE LA CRIOPRESERVACIÓN.

4.3.1.1 Principios de la Criobiología.

La preservación del corazón puede realizarse mediante **enfriamiento criogénico**, para intentar alcanzar un tiempo indefinido de conservación y almacenamiento del órgano, hasta que se produzca su trasplante. Al enfriar, se forma hielo entre las células que conforman el interior de un órgano, produciendo un daño irreparable, por lo que este enfriamiento que sí es bueno para una población aislada de células, debe estar mucho más controlado si se quiere aplicar no sólo a una población sino a un órgano completo.

Este estudio completo a nivel fisicoquímico, biofísico y biológico de la formación de hielo durante la criopreservación de tejidos debe realizarse en el comienzo del proyecto, apoyándonos en estudios previos y documentándonos adecuadamente con publicaciones y artículos de última hora, extractos de importantes Congresos de Criobiología y revistas de vanguardia que recogen las últimas investigaciones y descubrimientos.

Este estudio debe permitirnos extraer información sobre cómo un proceso de criopreservación altera los tejidos, ya que a temperaturas bajo -0.6°C , el agua biológica bajo condiciones isotónicas se vuelve inestable termodinámicamente y favorece el estado cristalino. Dada la abundancia de agua en los sistemas biológicos, la fase de transición sólido-líquido (hielo-agua) es un fenómeno crítico en la criopreservación y su estudio debe servirnos para extraer conclusiones sobre el perfil adecuado de temperaturas al que someteremos al corazón en nuestra máquina, el anticongelante más adecuado para criopreservarlo, las concentraciones idóneas y otro tipo de condicionamientos que pueden modelar la implementación física y real de la máquina de Langendorff que desarrollamos en este proyecto.

4.3.1.1.1 Estudios fisicoquímicos de la formación de hielo.

La fase sólido-líquido en una solución acuosa es termodinámicamente favorable sólo a temperaturas por debajo del punto de fusión. Cuando el hielo se forma en tal solución sobreenfriada, los solutos no se incorporan a la estructura de hielo creciente y la fracción de solución no congelada se vuelve cada vez más concentrada. Así los solutos bajan la temperatura de equilibrio de fusión de la solución no congelada y el grado de sobreenfriamiento incrementa. Cuando la fracción no congelada no es capaz de sobreenfriarse más, la cristalización cesa y la fase de hielo está en equilibrio termodinámico con la solución líquida. La concentración de equilibrio final de la fracción no congelada es sólo una función de la temperatura, que viene determinada por el diagrama de fase de la solución. Por otro lado, la cantidad total de hielo que se forma a una temperatura dada es una función de la composición inicial de la solución. Así el equilibrio termodinámico entre el hielo y agua sirve como mecanismo regulador para el volumen de solución que permanece sin helarse y la composición química de esta disolución.

Bajo especiales circunstancias, la cantidad de hielo formada podría estar gobernada por condiciones cinéticas, más que por termodinámicas. La formación de hielo en una disolución sobreenfriada es inicialmente debida a una agregación estocástica de moléculas de agua en una constelación estable termodinámicamente a partir de la cual, los cristales de hielo pueden crecer. Tanto dicha agregación como el crecimiento posterior de cristales dependen de la Cinética y ambos procesos ocurren más lentamente a medida que la viscosidad de la disolución aumenta, por lo que podemos concluir que la formación de hielo disminuye con la temperatura. Al aumentar la viscosidad, la solución no congelada permanece en un estado metaestable con una estructura amorfa y no cristalina. Ya que la formación de hielo puede darse a cualquier temperatura por debajo del punto de equilibrio de fusión pero por encima de la temperatura de transición cristalina, la cantidad total de hielo que se forme durante la congelación puede ser modulada controlando el tiempo que se usa para enfriar la solución, desde el punto de fusión hasta el punto de transición cristalina. Por ejemplo, usando tasas de enfriamiento muy altas, la cantidad de hielo que se forma antes de alcanzar la temperatura de transición cristalina puede ser reducido significativamente.

Con las crecientes concentraciones de soluto en la disolución, aumentará la viscosidad de la misma, reduciendo así las tasas de agregación estocástica de moléculas de agua y crecimiento de cristales, la vitrificación puede darse a tasas de enfriamiento más bajas en las disoluciones concentradas.

4.3.1.1.2 Estudios biofísicos de la formación de hielo.

Debido a que una muestra biológica es enfriada hasta temperaturas por debajo de su punto de fusión de equilibrio, el hielo se forma en el líquido extracelular tanto de forma espontánea, debido a que se rompe el estado metaestable de la solución sobreenfriada, o de forma deliberada si tocamos la muestra con una aguja enfriada. Esta fase de hielo extracelular juega el mayor papel en la respuesta biofísica de las células en un proceso de criopreservación porque altera el ambiente químico de las células,

mecánicamente las fuerza y las deforma, y puede inducir la formación de hielo dentro de las células.

Una de las consecuencias más importantes de la presencia del hielo en el medio externo es el efecto en la composición de la fracción de la solución extracelular que no está helada. Como la solución extracelular cada vez está más concentrada en solutos a medida que la temperatura disminuye y la fase de hielo crece, aparece un desequilibrio potencial químico entre el citoplasma y la fracción de solución externa no congelada. Este desequilibrio aumenta la fuerza conductora que transporta por difusión los solutos hacia dentro de la célula y un flujo de agua hacia fuera de la célula. Sin embargo, al ser la permeabilidad de la membrana citoplasmática para el agua significativamente mayor que la permeabilidad correspondiente al soluto a bajas temperaturas, la membrana efectivamente se comporta como una membrana semipermeable, en las escalas de tiempo relevantes para la criopreservación. Consecuentemente, la célula responde a la creciente tonicidad del medio externo durante la congelación expulsando agua de su interior via osmosis. Existen varios modelos matemáticos para describir la cinética de la deshidratación celular durante la congelación, entre ellos el modelo matemático de Mazur, que asume que el transporte de agua desde el medio intracelular al extracelular está limitado en el tiempo por el transporte transmembranal y no por la difusión a y desde la membrana. Esto es válido sólo para células de membranas con muy alta permeabilidad, como los eritrocitos, o a muy bajas temperaturas.

De este modo, la tasa del flujo de agua es proporcional a la magnitud de la fuerza conductora, es decir, a la diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana, y a la permeabilidad de la membrana citoplasmática al agua. La permeabilidad de la membrana es fuertemente dependiente de la temperatura y es comúnmente descrita por la relación de Arrhenius que sigue:

$$L_p(T) = L_{pg} \exp \left[-\frac{E_{Lp}}{R} \left(\frac{1}{T} - \left(\frac{1}{T_{ref}} \right) \right) \right]$$

donde $L_p(T)$ es la permeabilidad al agua de la membrana; T es la temperatura; L_{pg} es la permeabilidad a la temperatura de referencia (T_{ref}); E_{Lp} es la energía de activación para el transporte de agua; y R, la constante del gas. La cinética de la deshidratación de la célula durante la congelación es por tanto sensible a los valores de E_{Lp} y L_{pg} . Como estos parámetros pueden variar considerablemente entre diferentes tipos de célula, es esperable una correspondiente variabilidad en la respuesta de varias células al mismo protocolo de congelación.

El hielo que rodea las células también actúa como una fuerza mecánica, y puede causar deformación celular e incrementar la proporción de medio extracelular que solidifica. Sin embargo, debido a que la morfología del cristal del hielo es extremadamente sensible a las condiciones experimentales, los efectos mecánicos del hielo en las células ha resultado difícil de caracterizar cuantitativamente. De todas formas, como las células normalmente permanecen en canales de solución líquida en medio de cristales de hielo, la fracción de la solución extracelular que permanece sin congelar ha sido usada como medida de la cantidad del volumen de líquido disponible para las células. Se han medido directamente el ancho de los canales de líquido no

congelado entre los cristales de hielo, y se ha observado que los diámetros de los canales disminuyen con la temperatura y que las células confinadas en los canales se deforman a medida que el ancho del canal se decrementa hasta las dimensiones de una célula. Tondorf encontró que la fuerza de adhesión entre liposomas del tamaño de una célula y una interfaz plana de hielo es significativa. Aunque una similar investigación de la adhesión entre oocitos y hielo no observó el efecto de la fuerza adhesiva, los resultados de Tondorf indican la importancia de una interacción mecánica directa significativa entre hielo y células.

Además de influenciar el ambiente químico y mecánico de la célula, se piensa que el hielo extracelular está directamente implicado en causar el inicio de la formación de hielo dentro de las células. Comparaciones experimentales de la formación de hielo en células congeladas en la presencia y en la ausencia de hielo extracelular han mostrado que la formación de hielo intracelular ocurre a temperaturas significativamente más altas cuando el hielo extracelular está presente, lo que sugiere que el hielo externo induce o cataliza dicha formación de hielo en el interior de la célula. Aunque el mecanismo exacto de la formación de hielo intracelular y el papel del hielo externo en este proceso no son conocidos, existen varias hipótesis para explicar la formación de hielo en las células, y han servido de estructura de trabajo para modelos matemáticos que predicen la formación de hielo intracelular.

La aproximación de Toner asume que el hielo se forma dentro de la célula por nucleación en las zonas intracelulares catalíticas. Toner señala la formación de unas constelaciones, parecidas al hielo, de moléculas de agua a partir de las cuales los cristales de hielo crecen, tal y como defiende la teoría de la nucleación. Partiendo de esta aproximación, se obtiene un modelo matemático que ha tenido éxito en predecir la formación de hielo intracelular en un amplio rango de diversos tipos de células. Este modelo formula una expresión para la tasa de formación de esas constelaciones de moléculas de agua, y en ella se observa que la tasa de nucleación depende fuertemente de la temperatura de sobreenfriamiento del citoplasma:

$$J(T) = \Omega \exp[-kT^{-3}\Delta T^{-2}]$$

donde J es la tasa de nucleación; ΔT , el sobreenfriamiento; Ω y k , los coeficientes cinéticos y termodinámicos respectivamente, que son distintos para cada tipo de célula. La nucleación es un proceso estocástico, por lo que esta ecuación puede ser usada para calcular la probabilidad de formación de hielo en una población de células dada, sometida a criopreservación, asumiendo células idénticas. En la práctica, las condiciones de congelación cuyo resultado en la formación de hielo intracelular típicamente tienen asociada una temperatura de nucleación característica a la cual la probabilidad de la formación de hielo sube abruptamente de 0 a 1. Sin embargo, la teoría de la nucleación no es suficiente para predecir por completo el alcance de la cristalización intracelular, ya que sólo predice el principio de la formación del hielo. Recientemente, se ha propuesto que la velocidad del crecimiento del cristal es proporcional a la difusión del agua intracelular y el sobreenfriamiento del citoplasma, que a su vez dependen de las propiedades instantáneas de la solución intracelular, por lo que la dinámica de la formación de hielo dentro de las células está modulada por el proceso de deshidratación. Debido al transporte de agua durante la congelación, la composición y el volumen del citoplasma están cambiando continuamente, afectando así a las tasas de nucleación y crecimiento del cristal. El agua intracelular que se

convierte en sobreenfriada durante la congelación puede conseguir el equilibrio termodinámico tanto por dejar la célula y formar hielo extracelular, como por formar una nueva fase de hielo dentro de la célula. Ocurrirá una cosa u otra dependiendo de las magnitudes relativas de la tasa de agua transportada y la tasa de nucleación. Cuando las células son enfriadas lentamente, la tasa del flujo de agua a través de la membrana es suficientemente alta para prevenir niveles excesivos de sobreenfriamiento, y así la deshidratación es favorecida frente a la formación de hielo intracelular. Por el contrario, a velocidades rápidas de enfriamiento, la deshidratación es lenta comparada con la tasa a la que la solución intracelular se sobreenfría, por lo que se favorece la formación de hielo dentro de la célula. Usando un modelo matemático del proceso de transporte de agua, junto con modelos de la nucleación intracelular y el crecimiento de cristales de hielo, es posible predecir qué proporción de una población de células formará hielo intracelular durante la congelación y qué fracción del líquido intracelular cristalizará.

4.3.1.1.3 Estudios biológicos de la formación de hielo.

Tal y como demuestran los estudios biofísicos realizados previamente, las células están sujetas a fuerzas mecánicas, cambios químicos y térmicos durante la criopreservación, los cuales pueden afectar seriamente sus funciones biológicas. Aunque la suspensión del metabolismo y otras reacciones a temperaturas criogénicas es beneficioso para el almacenamiento a largo plazo de los biomateriales, los procesos de congelación y descongelación son a menudo agresivos para los tejidos. Debido a la complejidad de los sistemas biológicos, los mecanismos exactos del daño celular durante la criopreservación no han sido aún aclarados. Sin embargo, la supervivencia medida en células como una función de la tasa de enfriamiento, parece ser cualitativamente similar para todos los tipos de células (ver fig.28, pág. 4-16). La supervivencia de la célula es baja tanto con tasas de enfriamiento muy rápidas como con tasas de enfriamiento muy lentas. Hay una tasa intermedia de velocidad de enfriamiento que presenta el óptimo rendimiento en cuanto a la supervivencia de las células criopreservadas. Incluso cuando la tasa de enfriamiento óptima y el ancho de la curva puede variar en algunos órdenes de magnitud para distintos tipos de células, el comportamiento cualitativo parece ser universal.

Basándose en esta observación, se ha llegado a la conclusión de que hay dos mecanismos independientes de daño celular durante la congelación, según sea velocidad de enfriamiento lento o rápida. En el caso de tasas de enfriamiento altas, las células se ven dañadas por la formación de hielo intracelular, aunque la ruptura de la membrana debida a flujos osmóticos ha sido también propuesta como causa de daño celular para las velocidades altas. Para las velocidades lentas de enfriamiento, las células se ven deterioradas por los efectos de la exposición a las altas concentraciones de las soluciones intracelulares y extracelulares y a las interacciones mecánicas entre las células y el hielo extracelular.

A continuación se presenta una gráfica de la tasa de supervivencia de una célula hipotética, mostrando los tipos de daños que podría sufrir tanto con velocidades altas como bajas de enfriamiento, y se muestra el comportamiento de la curva de supervivencia celular para velocidades óptimas, subóptimas y supraóptimas de enfriamiento.

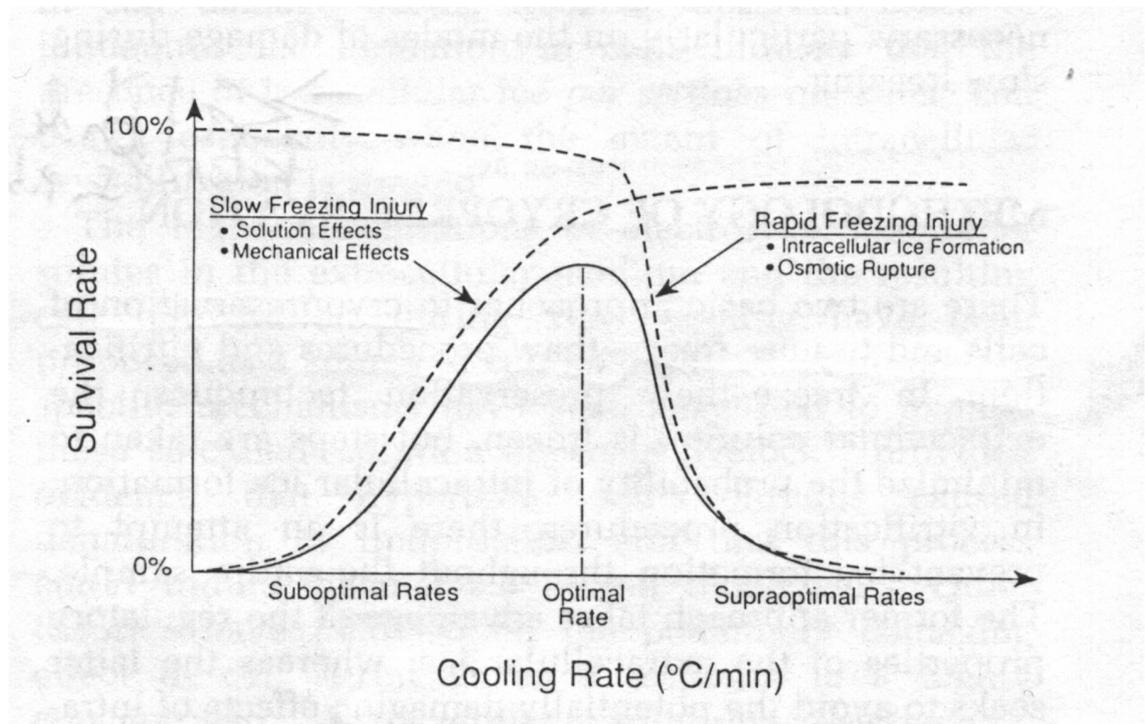


Fig.27 Tasa de supervivencia de una célula frente a la velocidad de enfriamiento.

También se han propuesto otros orígenes no mecánicos para el daño celular, como la inducción de la formación de una burbuja de gas por el hielo intracelular durante el calentamiento. A pesar de la evidencia de que la formación de hielo intracelular está envuelta en el daño de la célula durante la congelación, se han observado casos de formación inocua de hielo en células, lo cual indica que la presencia de hielo por sí misma no causa muerte celular, especialmente cuando la extensión de la cristalización intracelular está controlada. Este será un gran fundamento para el desarrollo del presente proyecto, ya que con el anticongelante diluido que la máquina de Langendorff inyecta en el órgano, no evitaremos la formación de pequeños cristales en algunas partes del corazón, porque sin dañar los tejidos, al perfundir es difícil conseguir una difusión perfecta y homogénea del anticongelante que llegase hasta la última célula del corazón, pero lo que sí se excluye con esta perfusión es el crecimiento de esos cristales de hielo, que serían los que dañarían irreversiblemente los tejidos.

Las altas concentraciones de electrolitos y otros solutos en el medio extracelular y la resultante deshidratación celular durante los enfriamientos lentos han sido propuestos como fuente de daño para las células criopreservadas. Lovelock ha demostrado que las soluciones hipertónicas salinas causan desnaturalización en la lipoproteínas y este proceso podría inducir hemólisis en los glóbulos rojos. Meryman propuso la existencia de un mínimo volumen celular crítico, por debajo del cual, la célula iba a deteriorarse, mientras que Steponkus mostró que los lípidos de la membrana celular podían desaparecer durante la deshidratación osmótica y que el daño ocurre durante la rehidratación si no hay suficiente material membranoso para que la célula recupere su volumen isotónico. El flujo de agua que atraviesa la membrana celular por ósmosis también ha sido propuesta como fuente potencial de daño.

Además de los efectos de las soluciones y concentraciones, también se consideran las interacciones mecánicas entre el hielo extracelular y las células que han sido implicadas en la criopreservación, como posible fuente de daño celular a temperaturas de enfriamiento subóptimas. Esto se demostró cuando a temperaturas por debajo de -10°C , la hemólisis de eritrocitos no podía atribuirse únicamente a la alta concentración de electrolitos, y se concluyó en que los efectos mecánicos eran un factor significativo en el daño celular. Hubel encontró que a bajas velocidades de enfriamiento, el deterioro que se producía en las células estaba relacionado con la presencia de ramas de dendritas de hielo secundarias, observando que se producían fuerzas mecánicas que tenían un efecto cortante debido a la basta forma de las dendritas.

4.3.1.2 Metodología de la criopreservación.

Para criopreservar células y tejidos podemos elegir procedimientos de congelación-descongelación o vitrificación. En las técnicas de preservación de congelación-descongelación, la solución extracelular sufre congelación, pero se toman medidas para minimizar la probabilidad de formación de hielo intracelular. En los procedimientos de vitrificación, se intenta prevenir la formación de hielo en la muestra entera.

Los procedimientos de congelación-descongelación aprovechan las propiedades del hielo extracelular, mientras que la vitrificación busca evitar los efectos dañinos del hielo intracelular y extracelular. Ambas técnicas suministran a la muestra productos químicos crioprotectores y después enfrían la muestra hasta la temperatura a la cual será almacenada. En la congelación, pero no en la vitrificación, la formación de hielo es inducida en la solución extracelular antes de comenzar el enfriamiento. Cuando la muestra se va a retirar del almacenamiento, es descongelada y las sustancias químicas crioprotectoras son eliminadas del sistema por dilución.

4.3.1.2.1 Sustancias crioprotectoras.

Las sustancias químicas crioprotectoras se pueden dividir en dos categorías:

- ✓ Penetrantes, como el glicerol o el dimetil-sulfóxido (DMSO), que atraviesan la membrana celular.
- ✓ No penetrantes, como los polímeros, que no pueden entrar en las células.

Los mecanismos por los que estos agentes protegen las células durante la criopreservación no son conocidos, pero se piensa que los crioprotectores penetrantes reducen los daños celulares debidos a los efectos de reducir la concentraciones de electrolitos en la célula. Los crioprotectores también estabilizan entropicamente las proteínas si éstas han perdido su cobertura de hidratación, y hay evidencias que las sustancias polares tales como DMSO estabilizan la membrana mediante interacciones electroestáticas. También la protección contra la formación de hielo celular ha sido atribuida a los efectos coligativos de los agentes crioprotectores. En altas concentraciones, aumentan la viscosidad de las soluciones existentes dentro y fuera de la célula, y así reducen drásticamente las tasas de hielo por nucleación y el crecimiento

de los cristales, por lo que los protocolos de vitrificación emplean grandes concentraciones de estas sustancias químicas para suprimir la formación de hielo durante la criopreservación.

A pesar de la protección que aportan a las células, también pueden dañarlas si se usan muy concentrados. Se puede reducir la toxicidad disminuyendo el tiempo o la temperatura de la exposición de las células al crioprotector o usando menores concentraciones del aditivo. Paradójicamente, hay pruebas de que la presencia de estos agentes puede causar mayor retención del citoplasma y aumentar la probabilidad de la formación de hielo dentro de la célula, causando así daño celular. A esto se añade que la adición y posterior eliminación de los crioprotectores antes y después de la criopreservación pueden dañar las células debido a fuerzas osmóticas excesivas. Debido a que los agentes típicamente entran y salen de la célula a una tasa menor que el agua, la respuesta inicial de una célula expuesta a una solución crioprotectora es perder agua a través de su membrana, hacia fuera de la célula. De igual forma, una célula conteniendo solutos crioprotectores se hinchará inicialmente cuando se sitúe en un ambiente isotónico, cuando el agua entre en la célula por ósmosis. Aunque el volumen de la célula volverá a su valor isotónico cuando el crioprotector penetre la membrana celular y la equilibre, excesivas excursiones volumétricas y altos flujos osmóticos de agua pueden ser negativos.

Por tanto, estos agentes son usualmente añadidos y eliminados gradualmente, cambiando la concentración de la solución celular en pasos sucesivos. Sin embargo, los objetivos de una lenta y escalada inyección del crioprotector deben ser equilibrar y llegar a compromiso con los efectos negativos de una exposición alargada al crioprotector. Un modelo matemático del transporte de agua y crioprotector fue usado por Levin y Miller para predecir teóricamente los protocolos óptimos para añadir y eliminar estos agentes químicos. La máquina de Langendorff posee un potente software en el que el usuario puede introducir como entrada de datos esos hitos significativos en el tiempo, en los que se cambia la concentración del crioprotector y permite ejecutar automáticamente en tiempo real esos valores sucesivos y escalados de la inyección del agente, sin que el usuario tenga que controlar nada más, una vez que especificó las variaciones graduales de la concentración que desea, en el tiempo también especificado por él. La concentración de crioprotector que se inyecta en el corazón irá variando hacia los valores programados y en los instantes precisos de tiempo para los que se programaron dichos cambios de concentración.

4.3.1.2.2 Enfriamiento.

La velocidad de enfriamiento hasta la temperatura final de almacenamiento puede afectar profundamente en el éxito o fracaso de la muestra biológica congelada. El efecto de la velocidad de enfriamiento en el contenido en agua de la célula y en la característica de temperatura de la formación de hielo intracelular se puede ver en la figura 28, pág.4-19. Esta gráfica corresponde a hepatocitos congelados en presencia de DMSO con valor de la molaridad 1.33 M. Con velocidades de enfriamiento rápidas, el volumen de agua intracelular permanece casi constante durante el enfriamiento hasta los -80°C , porque el tiempo es insuficiente para que el agua abandone la célula.

Las líneas continuas muestran el contenido de agua intracelular, normalizado a condiciones isotónicas. Los puntos muestran la temperatura a la que el 50 % de la población de células sufre formación de hielo intracelular, para cada tasa de enfriamiento.

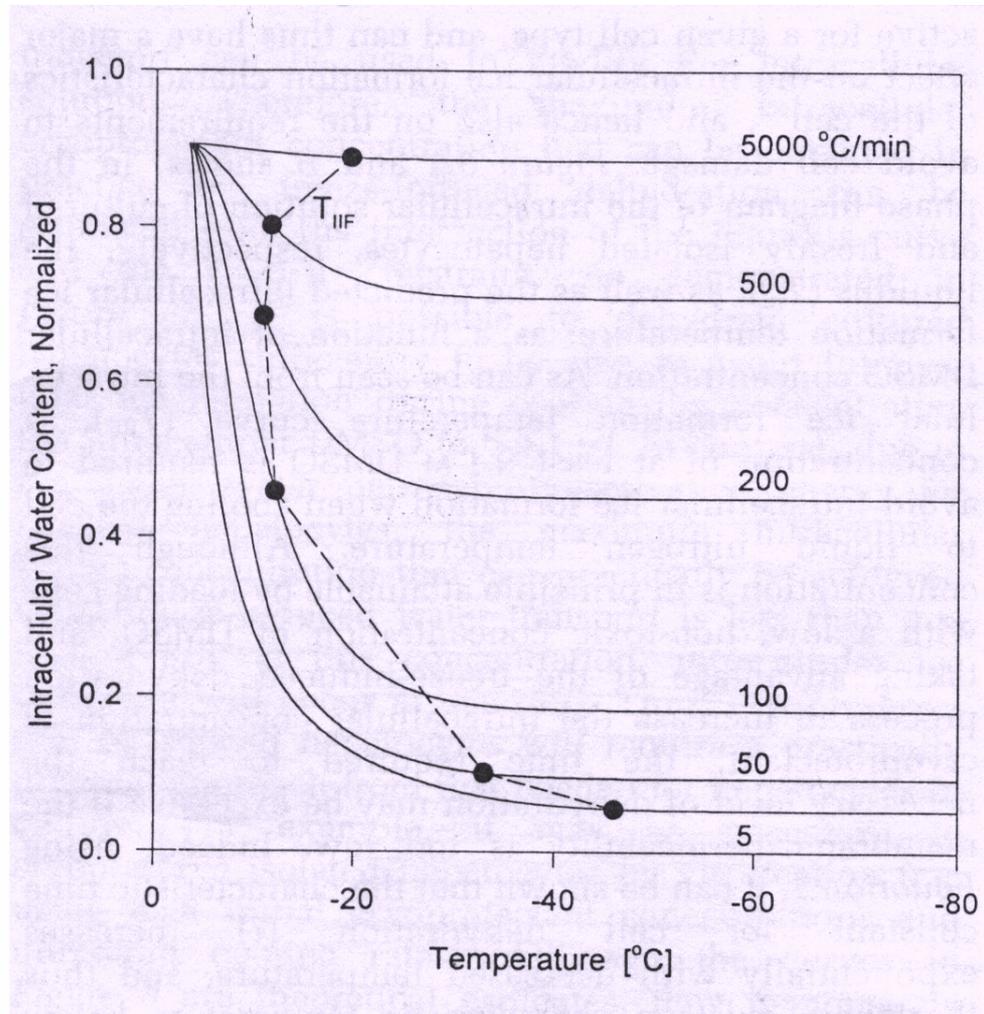


Fig.28 Cinética del transporte de agua y la formación de hielo intracelular.

Con velocidades bajas, el agua de dentro de la célula puede abandonar el equilibrio con el hielo extracelular y se producen altos niveles de deshidratación con el incremento consiguiente de la concentración de soluto. Cuando las concentraciones de los solutos intracelulares aumentan, incrementan la viscosidad del citoplasma y bajan el punto de fusión de equilibrio de la solución, disminuyendo así el sobreenfriamiento del citoplasma. Como resultado, la característica de temperatura de la formación de hielo intracelular (a la cual, el 50% de las células han generado hielo intracelular) es significativamente disminuida con velocidades bajas de enfriamiento. Por el contrario, cuando las velocidades son altas, el sobreenfriamiento del citoplasma se incrementa rápidamente y la formación de hielo intracelular aparece a temperaturas relativamente altas. Sin embargo, para tasas extremadamente altas (por ejemplo, más de 200°C/min para los hepatocitos cultivados), la formación de hielo dentro de la célula se ve disminuido debido a los efectos cinéticos. La dependencia de la deshidratación con la tasa de

enfriamiento es de uso práctico, ya que tanto bajas como intermedias velocidades de enfriamiento pueden ser usadas para controlar la concentración y el volumen de la solución intracelular. Obsérvese, sin embargo, que para todas las velocidades de enfriamiento, la deshidratación de la célula se detiene a una temperatura característica, por ejemplo a -40°C para los hepatocitos cultivados que referenciamos en la figura anterior. Esto es consecuencia de la dependencia con la temperatura de la permeabilidad al agua de la membrana celular, reflejada en la relación de Arrhenius anteriormente mencionada; a temperaturas suficientemente bajas, la membrana de la célula se vuelve impermeable. Así, el estado termodinámico de la solución intracelular puede ser manipulada por deshidratación únicamente dentro de un rango de temperaturas finito.

Se ha demostrado que los protocolos que establecen varios pasos sucesivos y escalados en las temperaturas de enfriamiento obtienen mayor rendimiento que los métodos que usan un simple enfriamiento lineal. De todas formas el diseño software de la máquina de Langendorff, tanto en su prototipo de 2 bombas como de 4 bombas, está preparada para albergar ambos modelos de protocolo, porque deja una entrada de datos de temperaturas completamente abierta al usuario, que puede seleccionar tanto temperaturas espaciadas en el tiempo que conformen una recta, como pasos de temperatura que se interpolen formando un perfil total de tramos rectos de distinta pendiente unidos entre sí, que han sido los que se han empleado en los experimentos de validación de la máquina.

Los protocolos que introducen distintos tramos rectos de temperatura, en pasos escalados, en los que la velocidad de enfriamiento cambia continuamente con el tiempo reciben el nombre de protocolos no lineales. Ofrecen el inconveniente de que es necesario optimizar un alto número de parámetros para alcanzar unas tasas aceptables de supervivencia tras la congelación. Sin embargo, hay recientes avances en la predicción de los efectos de los posibles protocolos de criopreservación usando modelos matemáticos y esto permite una optimización de los protocolos no lineales.

4.3.1.2.3 Almacenamiento.

A pesar de que las temperaturas por debajo de -80°C son generalmente requeridas para preservar durante largo tiempo las células y los tejidos, la vida durante el almacenamiento aumenta drásticamente cuando la temperatura de almacenamiento es reducida. A -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) hay insuficiente energía térmica para las reacciones químicas y el único deterioro posible es un daño en el ADN por radiación y rayos cósmicos. La vida de células almacenadas en temperaturas del nitrógeno líquido se ha estimado del orden de los 1000 años.

4.3.1.2.4 Calentamiento.

Además de la velocidad de enfriamiento, también es un factor muy importante la tasa a la cual las muestras congeladas son recalentadas. Durante el calentamiento, la muestra se desvitrifica, y en el tiempo necesario para conseguir el punto de fusión de equilibrio, pueden ocurrir la nucleación y el crecimiento de cristales. Incluso, partículas de hielo intracelular pequeñas e inocuas que se pueden haber formado durante la congelación pueden convertirse en cristales mayores y dañinos durante el

calentamiento, mediante un proceso conocido como recristalización. La recristalización es más probable en células que fueron rápidamente enfriadas, porque tienen un alto grado de citoplasma sobreenfriado y son más propensas a contener pequeñas constelaciones de moléculas de agua fácilmente cristalizables por nucleación. Para minimizar el daño debido a la desvitrificación y a la recristalización, se utilizan velocidades de calentamiento rápidas. Sin embargo, en algunos casos las tasas de calentamiento rápidas obtienen menor rendimiento que las lentas, especialmente cuando las células habían sido congeladas con una tasa de enfriamiento lenta. El daño que produce un calentamiento rápido es debido a las tensiones osmóticas que pueden ocurrir durante la rápida rehidratación de la célula, y es menos probable que ocurra en células rápidamente enfriadas porque éstas no se deshidratan significativamente durante el enfriamiento. Por tanto, las velocidades de calentamiento altas son beneficiosas para las muestras que fueron enfriadas rápidamente, mientras que las velocidades de calentamiento bajas son preferibles para las muestras que fueron enfriadas lentamente.

4.3.1.3 Criopreservación de tejidos.

Se ha demostrado que conseguir reversibilidad en el almacenamiento criogénico de tejidos complejos es un difícil problema, cuyo éxito requiere un cuidadoso control de cada paso del proceso criogénico. La respuesta de las células a la criopreservación es diferente si las células son parte de un tejido o si están aisladas, además de que las células si son parte de un sistema mayor, introducen nuevos problemas relativos a la transmisión del calor y masa y nuevos peligros de ser dañadas, que no se producían en poblaciones aisladas de células.

4.3.1.3.1 Diferencias intrínsecas entre células cultivadas y aisladas.

Cuando las células no están aisladas, sino inmersas en un tejido, nos encontramos con el problema de que no hay técnicas prácticas para medir directamente los parámetros del transporte de agua : la permeabilidad al agua de la membrana celular L_{pg} y la energía de activación en el transporte de agua E_{Lp} , ya que los métodos convencionales para determinar L_{pg} requiere medidas directas de los cambios volumétricos de las células que se producen como respuesta a las variaciones osmóticas.

Hepatocitos de rata cultivados en un gel de doble colágeno muestran una mayor tendencia a la formación de hielo intracelular que cuando están aislados, es decir que el hielo se forma dentro de la célula a temperaturas más altas y con velocidades de enfriamiento más lentas. Esto indica que los parámetros biofísicos que gobiernan el transporte de agua y la dinámica de nucleación intracelular durante la congelación son diferentes si las células están aisladas o son parte de un tejido, habiéndose encontrado que los parámetros L_{pg} y E_{Lp} son un orden de magnitud mayor para células aisladas, es decir aunque los hepatocitos aislados se deshidratan más rápido a altas temperaturas que las células cultivadas, la permeabilidad de las células aisladas decrece más rápidamente cuando la temperatura se ve disminuida. Los parámetros de la nucleación Ω y k eran también elevados en los hepatocitos aislados si los comparamos con hepatocitos cultivados, indicando así que la formación de hielo intracelular requiere mayores grados de enfriamiento citoplasmático pero que la cinética de la nucleación es más rápida. Las

interacción célula-célula y célula-matriz se han propuesto como posibles factores en la diferencia entre células aisladas y cultivadas, así como que el proceso de aislar células de un tejido cambie las propiedades biofísicas de las células.

Todo ello nos lleva a tener gran cautela en la extrapolación de los resultados obtenidos con células aisladas criopreservadas, ya que congelar células cultivadas va a requerir diferentes estrategias de las empleadas con células aisladas. Por ejemplo, la energía de activación para el transporte de agua E_{Lp} es un valor que varía según sean células aisladas y cultivadas, y es un parámetro que determina el rango de temperaturas a la cual el proceso de deshidratación celular se produce para un tipo de células dado, y así puede tener un distinto efecto en las características de formación de hielo intracelular, y por tanto en los peligros de daño celular, según sea un caso de células cultivadas o aisladas.

- ✓ Un cultivo de hepatocitos puede deshidratarse y así evitar la formación de hielo intracelular durante el enfriamiento, añadiendo como agente crioprotector DMSO con concentraciones mayores a los 9.1M. En un principio esta concentración se conseguiría administrando a las células una concentración baja y no tóxica de DMSO, y aprovecharía la deshidratación para aumentar la concentración intracelular del crioprotector. El tiempo requerido para alcanzar el nivel necesario de deshidratación podría ser excesivo si la permeabilidad de la membrana es demasiado baja. El tiempo necesario para la deshidratación de la célula aumenta exponencialmente con las bajas temperaturas y así se requeriría larga duración y sobreexposición de la muestra biológica a soluciones concentradas, tardándose aproximadamente 1 hora en conseguir el 95% de la deshidratación celular.
- ✓ En comparación, debido a la alta energía de activación E_{Lp} en las células aisladas, en hepatocitos aislados con una concentración de DMSO menor a 4M, el hielo intracelular se formaría aproximadamente a -25°C , por lo que necesitarían distinto tratamiento que los hepatocitos en cultivo, pudiendo ser necesario criopreservar los hepatocitos aislados mediante vitrificación, es decir, usando inicialmente altas concentraciones de crioprotector y tasas ultrarrápidas de enfriamiento.

4.3.1.3.2 Limitaciones en el transporte de masa en la criopreservación de tejidos.

En la criopreservación de células y tejidos se producen dos procesos de transporte de masa de crítica importancia: la adicción y la eliminación de las sustancias químicas crioprotectoras antes y después del congelado, y la redistribución del agua biológica durante la congelación y descongelación. Si bien estos procesos estaban gobernados por un transporte de agua limitado por la membrana en el caso de células individuales, deben considerarse los procesos difusivos y las interacciones célula-célula para comprender el comportamiento de los tejidos multicelulares durante la criopreservación.

Levin estudió la respuesta osmótica de una colección unidimensional de células durante la congelación, con el esfuerzo que el agua debe difundir secuencialmente de una célula a la vecina, sin permitir transporte paralelo a través del espacio intersticial. De este modo, mientras las células de la capa superficial responderían a los cambios osmóticos inducidos por la congelación como células en suspensión, las células interiores se deshidratarían sólo como respuesta a la creciente tonicidad intracelular de las superficies deshidratadas. Consecuentemente, durante la congelación las células interiores perderían agua a una tasa más lenta que las células de la superficie y contendrían más agua al final del proceso de congelación.

Diller y Raymond han desarrollado recientemente un modelo de transporte de agua en tejido, incluyendo múltiples capas celulares así como una matriz intersticial a través de la cual el agua podría fluir. Aunque es un modelo más realista de tejido, obtuvo resultados cualitativamente similares a los de Levin, en los que las células interiores se deshidrataban más lentamente que las superficiales. Este comportamiento es esperado principalmente en los tejidos densamente poblados. En tejidos con escasa población celular, como el cartílago, el hielo se intercalaría con la matriz extracelular altamente hidratada, y así las células interiores estarían en comunicación directa con el hielo extracelular, esperándose retrasos en la respuesta osmótica. De un modo similar, en tejidos altamente vascularizados como el hígado, las células interiores pueden intercambiar agua directamente con el hielo en la vascularizaciones. En contraste, durante la congelación de tejidos multicapa tales como la piel, las capas de células interiores tienden a retener más que las células superficiales.

Además del transporte de agua en los tejidos, se debe considerar la dinámica de la difusión del crioprotector dentro y fuera del tejido durante la adición y eliminación del agente antes y después de la congelación, para apreciar el efecto de estos procedimientos en la supervivencia de la muestra. Borel Rinkes realizó un análisis de la difusión de DMSO a través de una matriz de colágeno de un cultivo de hepatocitos en doble gel, y empleando las ecuaciones que desarrolló Schreuders para describir la difusión acoplada de múltiples sustancias químicas a través de una matriz intersticial, determinó la constante de tiempo para la difusión de DMSO dentro de una matriz de colágeno que contenía una capa de hepatocitos, encontrando que a 22°C, se necesitaba una exposición a DMSO de 15 min para conseguir un equilibrio del 95% del tejido con el crioprotector.

La penetrabilidad de los crioprotectores en los tejidos y órganos ha sido medida directamente con espectroscopia y resonancia magnética o con cromatografía. Se ha observado un comportamiento bifásico en la cinética de la penetrabilidad de los agentes, sugiriendo la existencia de separados compartimentos de difusión en el tejido con distintas constantes de tiempo de difusión. Estas constantes de tiempo depende de la composición y la geometría del tejido y pueden variar desde el orden de minutos hasta el orden de horas.

Exponer durante largos tiempos el tejido al crioprotector tiene mayores probabilidades de toxicidad, produce un incremento gradual de la concentración de solutos extracelulares, pero también ofrece como ventajas que reduce las tensiones osmóticas y elimina la necesidad de una adicción incremental del crioprotector. Además, las limitaciones de transporte de masa en muestras de tejido macroscópicas aumentan los gradientes espaciales en la concentración, produciéndose diferencias

significativas de concentración de crioprotector entre la superficie y el interior del tejido. En consecuencia, se puede dar la situación en la que las células superficiales deban estar expuestas a concentraciones tóxicas de crioprotector para conseguir la concentración mínima necesaria de este agente en el tejido interior. Por el contrario, si se toma precaución para no dañar las células exteriores durante la administración de la sustancia criopreservadora, las células interiores podrían tener unas concentraciones del agente demasiado bajas y no estar suficientemente protegidas del frío.

4.3.1.3.3 Limitaciones en el transporte de calor en la preservación de tejidos.

Debido al mayor tamaño de un órgano y su conductividad térmica finita, es más difícil conseguir tasas rápidas de enfriamiento y descongelación con tejidos que con suspensiones de células. Se producen grandes gradientes térmicos desde la superficie al interior del sistema, esas diferencias de temperatura implican tasas no uniformes de enfriamiento en el tejido, con menores tasas de temperatura en el interior de la muestra comparado con la superficie. Para la vitrificación, el enfriamiento lento en el interior del tejido necesita el uso de concentraciones muy altas de los aditivos crioprotectores, que pueden resultar dañinos. La distribución espacial no uniforme de las tasas de enfriamiento es un problema debido a la alta sensibilidad de la supervivencia a la tasa de enfriamiento, ya que si la diferencia en las tasas de enfriamiento entre el interior y el exterior es mayor que el ancho de la curva de supervivencia, el tejido se dañaría.

Sin embargo, debido al transporte de agua más lento de las células interiores de los tejidos densamente poblados, esas células requieren menores tasas de enfriamiento que las superficiales para conseguir los niveles de deshidratación suficientes para prevenir la formación de hielo intracelular. Por tanto, durante el enfriamiento del tejido, este cambio en la tasa óptima de enfriamiento podría compensar parcialmente las tasas reducidas de enfriamiento que se pueden alcanzar en las partes más internas de la muestra.

4.3.1.3.4 Daños de la congelación en los tejidos.

Aparecen nuevas fuentes posibles de deterioro exclusivas de la preservación de los tejidos que no aparecían durante la criopreservación de células aisladas, debidas a las dimensiones físicas macroscópicas de un órgano, que provocan unas limitaciones en el transporte de calor y masa que son las que originan estos nuevos motivos de daño por criogenización.

- ✓ El crioprotector al tener una distribución irregular en el tejido, hay regiones que no resultan suficientemente protegidas y otras son dañadas por sobreexposición al crioprotector.
- ✓ Las tasas de cambio de temperatura al no ser uniformes en el tejido, las tasas óptimas de enfriamiento y calentamiento no se alcanzan en grandes secciones del tejido.

- ✓ Los gradientes de temperatura inducen fuerzas mecánicas debidas a la desigual expansión o contracción en el tejido, pudiendo causar fracturas en la muestra biológica que queríamos criopreservar.
- ✓ Los órganos al tener una composición heterogénea de tejido biológico, los distintos tipos de tejido tienen diferentes propiedades termofísicas, por ejemplo distinto valor de sus coeficientes de expansión térmica, pueden aparecer fuerzas termoelásticas que dañen el tejido incluso bajo condiciones uniformes de enfriamiento y calentamiento.
- ✓ También derivado de la composición heterogénea de los tejidos aparece el problema de que es imposible satisfacer simultáneamente los requerimientos óptimos de enfriamiento para todas las células del tejido, ya que es sabido que la tasa de enfriamiento necesaria para la óptima supervivencia oscila en varios órdenes de magnitud entre diferentes tipos de células. Sin embargo, los crioprotectores pueden aumentar el ancho de la curva de supervivencia, incrementando así la probabilidad de conseguir simultáneamente altos niveles de supervivencia en células con distintas tasas de enfriamiento óptimo.
- ✓ La geometría tridimensional de los tejidos propicia la aparición de fuerzas mecánicas generadas por el hielo extracelular. En los tejidos con un sistema vascular se produce un daño estructural debido a que el hielo extracelular se forma preferentemente en el espacio intravascular. Consecuentemente, la deshidratación del tejido colindante hace que el agua se acumule y se congele en el sistema vascular, causando finalmente una excesiva distensión y ruptura de los vasos sanguíneos.

4.3.2 DESARROLLO HARDWARE DE LA MÁQUINA DE LANGENDORFF

4.3.2.1 Montaje de laboratorio hospitalario.

El prototipo diseñado de la máquina de Langendorff, tanto en su versión de control independiente de la temperatura y la concentración, tanto en su versión de control exclusivo de la temperatura, consta de un sencillo montaje hardware.

En las primeras implementaciones del prototipo, empleamos un congelador doméstico, tipo arcón, con la puerta en la parte superior. Se hacen distintas particiones del espacio disponible en el interior del congelador, con planchas de material aislante. Dentro de cada partición, se coloca una nevera de menor tamaño que hace el papel de baño. El modelo que se emplea para estas neveras menores es el de una sencilla nevera de plástico y sin motor, que no enfría pero sí consigue aislar térmicamente su contenido del exterior.

En cada uno de estos baños improvisados se coloca una bomba de efecto Peltier que permite modificar la temperatura del líquido que se encuentre dentro del baño. Esta bomba es totalmente variable y permite control manual. Gracias a un mando de control se permite seleccionar, girando una rueda, el valor de la temperatura a la que deseamos que enfríe el líquido en el que está sumergida. Así se modifica la temperatura que se puede conseguir en el baño alojado dentro de cada partición del congelador, con independencia de la temperatura a la que se encuentre el arcón.

El hecho de que los baños (neveras) se encuentren encerrados dentro de un sistema mayor (congelador) hace que estén aislados del exterior y sea más fácil que mantengan su temperatura constante. La tapa del congelador estará cerrada, aunque queda una pequeña ranura abierta a través de la cual sale un tubo de silicona por cada baño instalado en una partición. Este tubo de silicona es el encargado de extraer el fluido de ese baño, ya que servirá de tubo de entrada a la bomba peristáltica correspondiente.

En cada uno de estos baños se sumerge el extremo de un tubo de silicona diferente. El otro extremo de cada tubo va conectado directamente a la entrada de flujo de una bomba peristáltica independiente. Cuando el motor se mueva y los rodillos consiguen hacer la ligera presión sobre el tubo colocado en el cabezal de la bomba, el líquido procedente de cada baño se bombea y saldrá por el tubo de silicona de salida de flujo que tiene la bomba.

Los tubos de salida de las bombas se fusionan en un único conducto, en el que se coloca una pequeña llave, para poder elegir si se desea todo el caudal disponible o se quiere derivar parcialmente el flujo total a otra parte y quedarse con un menor volumen de la disolución, antes de inyectarla en el corazón. En el conducto en el que se fusionan los tubos de salida, se coloca de forma permanente el sensor de un termómetro digital para ver la temperatura a la que se encuentra la mezcla total de agua y anticongelante.

En el punto de inyección, en paralelo hay colocada una jeringuilla, que hace la función de un atrapador de burbujas, evitando que entre aire al corazón. A parte de este mecanismo, antes de los experimentos se limpia el circuito de aire, pasando líquido varias veces.

Existe un soporte metálico que sostiene un recipiente de cristal en el cual se alojará el órgano a perfundir. El tubo de salida resultado de la fusión de los tubos que derivaban de cada bomba peristáltica es el que contiene la disolución total, que se inyectaría finalmente en el corazón a través de una cánula de aorta. Este recipiente está dotado de un orificio cerca de su base, por el que se elimina el excedente de líquido, ya que el órgano no retiene todo el flujo que le es inyectado y filtra parte a través de sus tejidos.

4.3.2.1.1 Definición de las bombas empleadas.

- ✓ Bomba de efecto Peltier.

Son dispositivos termoelectricos de semiconductores que funcionan por el efecto Peltier. Cuando se les suministra una corriente eléctrica adecuada, pueden enfriar o calentar. Los dispositivos más grandes se usan a veces para enfriar o controlar la temperatura de sub-montajes.

- ✓ Bomba peristálticas.

El principio peristáltico se basa sobre la presión de dos rodillos impulsores que giran y aplastan progresivamente un elemento tubular. La alternancia entre la compresión y el aflojamiento del elemento tubular genera una depresión y por consiguiente una aspiración continua del fluido y un flujo constante durante la impulsión. El producto que se encuentra dentro del elemento tubular se traslada íntegro sin sufrir el mínimo daño.

Será necesario realizar medidas sucesivas para obtener experimentalmente la función de transferencia tensión / caudal de estas bombas.



Fig.29 Principio de funcionamiento de una bomba peristáltica.

4.3.2.1.2 Elementos adicionales de una máquina de Langendorff.

La adición de los siguientes elementos de forma permanente no sólo es posible si no que mejorarían el montaje del prototipo:

- ✓ Monitor adicional y montaje adecuado que permita realizar electrocardiogramas al órgano bajo experimento.
- ✓ Marcapasos.
- ✓ Intercambiador de calor.
- ✓ Registrador isovolumétrico de presión.

4.3.2.2 Montaje electrónico.

Se debe instalar la tarjeta de adquisición de datos en el ordenador, instalar sus drivers, instalar el lenguaje de programación visual HP VEE y después, instalar el programa DT VPI para añadir las funciones adicionales específicas del modelo de tarjeta de adquisición de datos instalado.

Se utiliza un panel para reunir las salidas analógicas disponibles en la tarjeta de adquisición de datos y presentarlas de forma unificada al usuario. En el panel existe un conector por cada canal analógico, por lo que resulta fácil el acceso a los canales analógicos.

Se conectan las bombas peristálticas a la red eléctrica, y se conecta además su entrada de control analógico de flujo a un canal analógico disponible en el panel, mediante un cable dotado de los conectores adecuados. El conexionado de las bombas con los canales analógicos de la tarjeta de adquisición de datos resulta extremadamente sencillo, es un sencillo cableado debido a que los niveles de tensión son compatibles, coincidiendo el rango de voltaje que proporciona un canal analógico con el rango de tensiones de entrada de control analógico que admite la bomba peristáltica. Por tanto no se requiere circuitería adicional que adaptase los niveles de tensión y acondicionase las señales.

Las bombas peristálticas disponen de un interruptor para encenderlas, y cuando además reciban por su entrada de tensión de control un valor no nulo y por encima de su tensión mínima umbral de funcionamiento, su rotor comenzará a dar vueltas y empezarán a funcionar extrayendo líquido de los baños.

4.3.3 DESARROLLO SOFTWARE DE LA MÁQUINA DE LANGENDORFF.

En la máquina de Langendorff se consigue el control independiente de la temperatura y la concentración, en el caso del prototipo con 4 bombas, y el control exclusivo de la temperatura, en el caso del prototipo de 2 bombas, gracias al software diseñado. Este software corre sobre un ordenador en el que instalamos la tarjeta de adquisición de datos que controlará las bombas peristálticas, cuyos flujos aunados se inyectan finalmente en el corazón objeto de la criopreservación.

Las bombas pueden dar un flujo variable, por lo que necesitan unas tensiones de control que serán generadas desde la tarjeta de adquisición de datos. Para controlar la tarjeta es necesario usar alguna herramienta de programación, que sea compatible con sus drivers y su interfaz. Una vez encontrado este lenguaje de programación, que será visual en nuestro caso, es necesario desarrollar la aplicación concreta para nuestra tarea de criopreservar órganos.

Para organizar el diseño y desarrollo de la aplicación, se siguen las habituales directrices de la programación, que aconsejan dividir el subsistema software en distintos módulos, con funcionalidad bien definida y con unas entradas y salidas compatibles con el resto de módulos, de modo que la integración de todos ellos sea sencilla y cualquier cambio en la aplicación se reduzca a acceder al módulo concreto que nos interesa modificar, sin necesidad de retocar el resto del programa.

✓ En rasgos generales, las tareas que debe cubrir la aplicación son:

- Sincronización.

El programa que controla la tarjeta de adquisición de datos debe ocuparse de la sincronización, ya que la tarjeta de adquisición de datos disponible no incorpora reloj, ni contadores, ni temporizadores, por lo que la aplicación diseñada debe emular el funcionamiento de una fuente de sincronismo para el control del tiempo.

- Captura de datos.

El software debe ofrecer unas tablas donde el usuario de la máquina de Langendorff pueda especificar el perfil de temperaturas y concentraciones que desea en el tiempo para la disolución crioprotectora inyectada en el corazón. Ofrecerá una interfaz visual con el usuario, construyendo una gráfica a partir de esos datos, para dar una visión más intuitiva del perfil que se va a ejecutar, representando los puntos significativos y las rectas que se construyen al interpolar entre dichos valores.

- Monitorización de datos.

Así mismo la aplicación diseñada ofrecerá también algunas gráficas y valores de interés, que permitan al usuario tener una idea más exacta de lo que se está ejecutando en cada módulo, haciendo el programa más sencillo de interpretar.

- Muestreo de datos.

Una vez que el usuario ha introducido el perfil deseado para la criopreservación, la aplicación toma la curva continua de la temperatura frente al tiempo y debe muestrear esa función. Como resultado del muestreo, debe almacenar una cantidad de valores que se encuentren suficientemente cercanos entre sí en la gráfica, para así seguir cualquier variación que tenga la curva, pero suficientemente lejanos para que sea realizable, y la velocidad de cambio de temperatura demandada no sea mayor al tiempo de respuesta del sistema.

- Cálculo de flujos.

En función de la temperatura y la concentración, deseadas en cada momento para la disolución crioprotectora, la aplicación tiene que calcular el flujo que debe suministrar cada una de las bombas para cada instante de tiempo, de modo que las cuatro cantidades mezcladas como disolución final cumplan las condiciones especificadas.

- Cálculo de voltajes.

Cada bomba peristáltica recibe como entrada un valor de tensión, en función del cual, su motor se moverá con una velocidad distinta y por tanto el movimiento de los rodillos bombeará una cantidad de fluido diferente para cada voltaje, permitiendo así un control por tensión del flujo. Estas tensiones son suministradas por la tarjeta de adquisición de datos, que a su vez son controladas por la aplicación. Por tanto, el software debe traducir los flujos ya calculados (cantidades medidas en mililitros por minuto), en los valores de tensión que alimentarán a las bombas peristálticas, basándose en los resultados experimentales que nos permiten ajustar la función de transferencia tensión/caudal en cada una de las bombas.

- Configuración de convertidores D/A.

Una vez conocida la tensión que debe llegar a cada entrada de control analógico de flujo en cada una de las bombas peristálticas, la aplicación deberá configurar los parámetros y características del convertidor Digital/ Analógico (convertidor D/A) correspondiente al canal analógico con el que la tarjeta va a suministrar ese nivel de tensión.

✓ Partiendo de la máquina de Langendorff como un Sistema Total, se puede subdividir en un Subsistema Hardware, cuya descripción global se ha referido anteriormente, y en un Subsistema Software, que a su vez se divide y se organiza en varios subsistemas menores llamados Módulos, que se citan a continuación:

- Módulo Interfaz.

- Módulo Muestreo.

- Módulo Caudal.

- Módulo Salida Analógica.

A continuación, se presentará tan sólo una visión general de los objetivos perseguidos en cada uno de los Módulos, para facilitar la comprensión del consiguiente diseño que se ha desarrollado para conseguir tales propósitos.

Se presenta la organización del software en subsistemas (Módulos), sin entrar en tecnicismos ni detalles de cómo estos Módulos están implementados. En el presente capítulo tan sólo se atenderá a la funcionalidad, la interrelación y el papel que desempeñan estos bloques menores, una vez integrados en el sistema total que constituye la aplicación diseñada. Se parte del diseño de la aplicación para el montaje con 4 bombas, y cuando procede, se detallan las simplificaciones a realizar en el diseño cuando se particulariza la aplicación al montaje con 2 bombas.

4.3.3.1 Módulo Interfaz.

En la máquina de Langendorff se somete al órgano a la inyección de una disolución crioprotectora, que previene de la formación de cristales de hielo durante el proceso de enfriamiento criogénico. La inyección es controlada, tanto en las cantidades, que no sobrepasan nunca el flujo máximo que es capaz de soportar el corazón, para no forzar los tejidos con un caudal mayor al que puede circular dentro de él normalmente, como es controlada en su temperatura y concentración. El conjunto de todas esas temperaturas y concentraciones para cada instante de tiempo es lo que se llama perfil de criopreservación.

4.3.3.1.1 Determinación del perfil de criopreservación.

El perfil de criopreservación se determina de la siguiente manera:

- ✓ Determinación de la **duración** del enfriamiento, que puede durar hasta horas.
- ✓ Dentro de esta duración, desde el inicio de la puesta en marcha de la máquina hasta el final del enfriamiento, establecemos **puntos de temporización**, es decir decidimos una cantidad suficiente de instantes de tiempo en los que las condiciones de la disolución van a cambiar. Se basa en la experiencia y profundos conocimientos fisiológicos, esta decisión de espaciar desigualmente momentos significativos a lo largo de la duración total del enfriamiento.
- ✓ Decidimos qué **temperatura** debe tener la disolución en cada uno de los instantes de tiempo significativos. La temperatura para cualquier instante intermedio entre dos puntos de temporización es el resultado de interpolar con una recta entre sus temperaturas.
- ✓ Decidimos qué **concentración** debe tener la disolución en cada uno de los instantes de tiempo significativos. La concentración para cualquier instante intermedio entre dos puntos de temporización es la misma que en el primer punto de temporización.

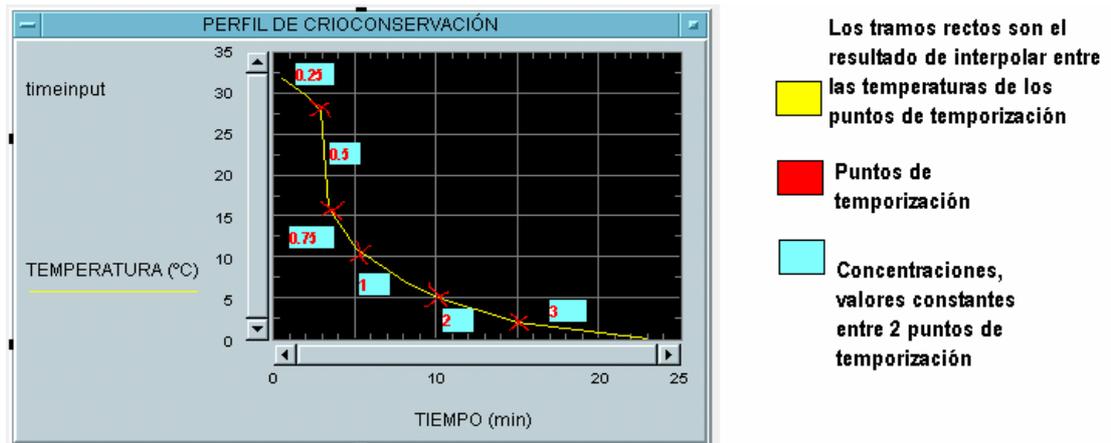


Fig. 30 Ejemplo de un perfil de criopreservación.

Después de definir el concepto de perfil de criopreservación, es lógico pensar que se definirá con tres tablas, una primera para especificar todos los puntos de temporización, consignando como último punto la duración total del enfriamiento criogénico, una segunda tabla para determinar la temperatura correspondiente a cada uno de esos puntos de temporización y una tercera tabla para especificar las concentraciones correspondientes a cada uno de esos instantes relevantes dentro de la duración total de la criopreservación. Cada punto de temporización lleva asociadas una temperatura y una concentración, que se interpolará con la siguiente temperatura especificada y se mantendrá constante, respectivamente, hasta llegar al siguiente punto de temporización.

4.3.3.1.2 Tareas a realizar.

La misión del Módulo Interfaz es cubrir las siguientes tareas:

- ✓ Capturar y procesar las tres tablas rellenas por el usuario como únicas entradas del programa, presentando de este modo una sencilla interfaz con el usuario, que ya queda despreocupado de introducir más datos.
- ✓ A partir de las tablas, el Módulo Interfaz construye una gráfica interpolando entre las temperaturas de los instantes significativos, para facilitar la comprobación del perfil con una simple mirada a un dibujo.
- ✓ Generar un reloj que sincronice la máquina, para suplir la carencia hardware de la tarjeta de adquisición de datos con programación software adicional.
- ✓ Garantizar el funcionamiento en tiempo real del sistema total. El Módulo Interfaz funcionará como reloj del sistema y el resto de Módulos estarán sincronizados porque dependen de éste y se sitúan tras él, en una disposición en cascada.
- ✓ Medir el tiempo para detectar **en tiempo real**, desde que comenzó el enfriamiento (instante cero), cada una de las llegadas de los puntos de temporización, y en ese preciso instante actualizar sus salidas:
 - Proporcionar al Módulo Caudal la concentración asociada a ese punto de temporización.
 - Proporcionar al Módulo Muestreo la temperatura asociada a ese punto de temporización y el valor en minutos del punto de temporización.
 - Proporcionar al Módulo Muestreo información adicional sobre el final del intervalo que acaba de comenzar: el valor en minutos del punto de temporización que sirve de instante final para el intervalo y la temperatura asociada a ese punto de temporización final.

4.3.3.1.3 Diseño conceptual

Se presenta seguidamente un esquema de bloques donde se indican las diferentes partes que componen el diseño conceptual propuesto para el Módulo Interfaz dentro del subsistema software.

✓ Entradas del Módulo Interfaz:

- Tabla de Tiempos.
- Tabla de Temperaturas.
- Tabla de Concentraciones.

✓ Salidas del Módulo Interfaz:

Se considera un intervalo el espacio de tiempo que transcurre entre dos puntos de temporización. En dicho intervalo, la concentración se mantiene constante y la temperatura es una recta de pendiente negativa. Las salidas del Módulo Interfaz se producen en tiempo real y cambian cada vez que llega el instante de inicio de un intervalo (instante que es detectado por el reloj que emula la aplicación). Después, sus salidas se mantendrán constantes hasta que transcurra el tiempo y se produzca de nuevo la llegada en tiempo real del principio de otro intervalo.

De este modo, las salidas del módulo son:

- Instante inicial del nuevo intervalo.
Es el punto de temporización en el que comienza el nuevo intervalo.
- Instante final del intervalo.
Es el punto de temporización en el que acaba el intervalo.
- Concentración.
Es el valor constante que tendrá la concentración durante el intervalo. Es el valor de concentración asociado al punto de temporización que sirve de instante inicial.

- Temperatura inicial de intervalo.

Es la temperatura asociada al punto de temporización que sirve de instante inicial del intervalo.

- Temperatura final del intervalo.

Es la temperatura asociada al punto de temporización que sirve de instante final del intervalo.

El valor de la concentración servirá de entrada al Módulo Caudal, que lo empleará como dato para calcular los volúmenes de agua y anticongelante que deben mezclarse, para tener una disolución total que cumpla ese valor de concentración.

El resto de valores de salida sirven de entrada al siguiente módulo, Módulo Muestreo, que a partir de los valores de temperatura inicial y final, construirá una recta de la temperatura y la muestreará para tener una colección de valores discretos, que describan la variación de la temperatura con el tiempo durante ese intervalo.

- ✓ Displays de ayuda del Módulo Interfaz:

En este módulo se construye un display de ayuda al usuario, que aporta información adicional que le facilitará la tarea de saber cómo va progresando la ejecución de la aplicación.

- Gráfica del perfil de criopreservación elegido.

Es construida automáticamente por el Módulo Interfaz, a partir de las tablas de datos rellenas por el usuario.

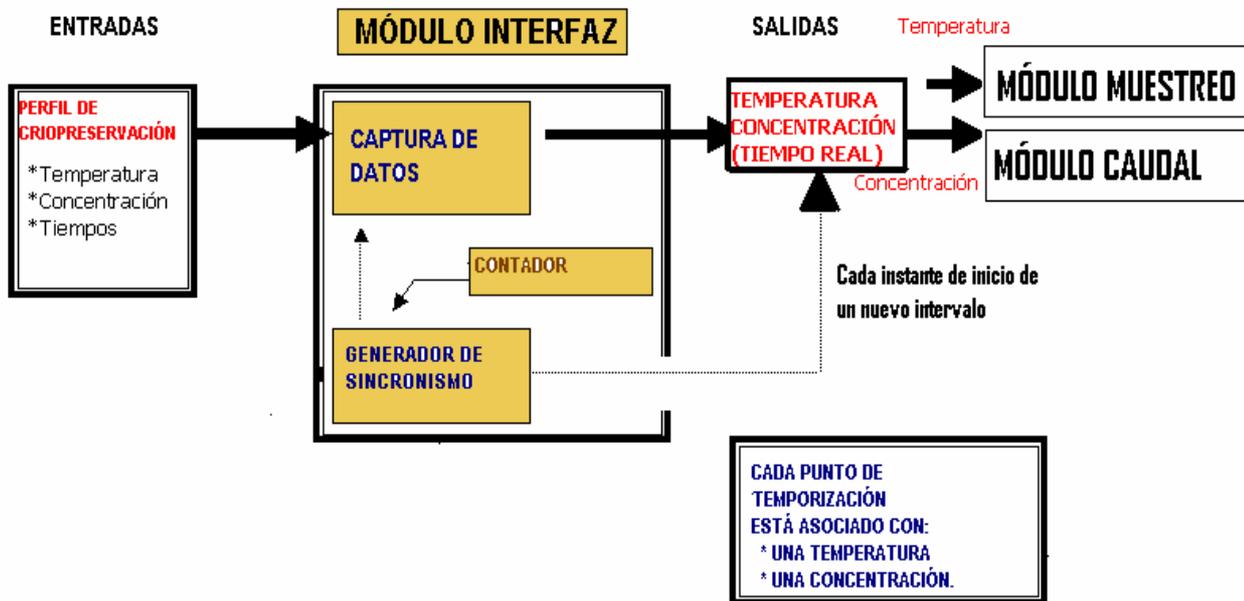


Fig.31 Esquema de bloques del Módulo Interfaz

4.3.3.1.4 Particularización.

El diseño propuesto para el Módulo Interfaz está pensado para el prototipo de máquina de Langendorff con control independiente de concentración y temperatura. En el caso de la máquina de Langendorff con control exclusivo de temperatura, mantenemos el mismo diseño, pero admite una simplificación.

En el prototipo con control exclusivo de temperatura, el perfil de criopreservación sólo es una función de la temperatura frente al tiempo y se suprime el parámetro de la concentración. La concentración tiene ya un valor fijado, una vez que se escoge una temperatura concreta para la disolución. Por tanto no es una variable libre seleccionable por el usuario y cada punto de temporización queda exclusivamente asociado a una temperatura.

El diseño queda simplificado porque prescindimos de la tabla de entrada asociada a las concentraciones, pero el resto del comportamiento queda igual. Cada punto de temporización lleva asociado únicamente una temperatura, que se interpolará con la temperatura especificada en el siguiente punto de temporización.

La misión del Módulo Interfaz en el prototipo de 2 bombas es la de cubrir las mismas tareas que en el prototipo de 4 bombas. En algunos casos, las tareas estarán aún más simplificadas:

- ✓ Capturar y procesar las tablas rellenas por el usuario como únicas entradas del programa, pero la diferencia es que se presentan sólo dos tablas al usuario: la tabla de los puntos de temporización y la tabla de las temperaturas. (Igual tarea, pero simplificada)
- ✓ A partir de las tablas, construye una gráfica interpolando entre las temperaturas de los instantes significativos, para facilitar la comprobación del perfil con una simple mirada a un dibujo.
- ✓ Generar un reloj que sincronice la máquina, para suplir la carencia hardware de la tarjeta de adquisición de datos con programación software adicional.
- ✓ Garantizar el funcionamiento en tiempo real del sistema total. El Módulo Interfaz funcionará como reloj del sistema y el resto de Módulos estarán sincronizados porque dependen de éste y se sitúan tras él, en una disposición en cascada.
- ✓ Detectar, en tiempo real, desde que comenzó el enfriamiento (instante cero), cada una de las llegadas de los puntos de temporización, y en ese preciso instante, proporcionar al Módulo Muestreo únicamente la temperatura asociada a ese instante, el valor de ese instante, el valor del instante que da fin al intervalo y la temperatura que lleva asociada. (Igual tarea, pero simplificada).

Es el mismo diseño que en el prototipo de 4 bombas, ignorando los hilos de flujo que gestionaban las concentraciones de la disolución. Por tanto, el Módulo Interfaz deja de tener relación directa con el Módulo Caudal, porque no existe el valor de concentración que debía pasarle.

4.3.3.2 Módulo Muestreo.

El perfil de criopreservación que selecciona el usuario puede descomponerse en un conjunto de intervalos temporales caracterizados por una concentración constante y una temperatura que sigue el comportamiento de una recta de pendiente negativa, entre un valor inicial y un valor final de temperatura. De este modo, el tiempo total que dura el enfriamiento criogénico puede verse como un conjunto de intervalos temporales de duración desigual que se suceden uno tras otro, cada uno con una velocidad distinta para el enfriamiento. (Ver figura.30, página 4-32).

Cada vez que el reloj del sistema, emulado por el Módulo Interfaz, detecta la llegada en tiempo real del punto de temporización equivalente al inicio de un nuevo intervalo, el Módulo Muestreo recibe como entradas el valor inicial y final de temperatura del nuevo intervalo. A partir de esos valores extremos de temperatura, construirá la recta de pendiente negativa que representa durante el nuevo intervalo que ha comenzado el comportamiento de la temperatura frente al tiempo. Esta recta no es más que la función de la temperatura frente al tiempo durante un intervalo de tiempo perteneciente a la duración total del enfriamiento criogénico. Esta recta será muestreada en el Módulo Muestreo con cierta frecuencia de muestreo.

Una vez que la recta haya sido muestreada, el Módulo Muestreo es el responsable de fijar en su salida el valor de cada uno de esos puntos muestreados, cada cierto tiempo y recorriendo sucesivamente la colección de los valores discretos obtenidos, hasta que todos hayan pasado por la salida. Este valor de salida del Módulo Muestreo sirve de entrada para el Módulo Caudal. Este tiempo debe coincidir con el período de muestreo para garantizar el funcionamiento en tiempo real.

Por la salida del Módulo Muestreo irán desfilando todos los valores resultado del muestreo de la recta de temperaturas, desde el primer valor al último, y el tiempo total que se requiere para que la salida tome todos esos valores coincidirá con el tiempo que dura ese intervalo concreto del perfil. Cuando en tiempo real, la duración del intervalo ha transcurrido, el valor que hay a la salida del Módulo Muestreo será la temperatura asociada al punto de temporización que marcaba el final de intervalo, por lo que es fácilmente comprobable su funcionamiento en tiempo real, ya que en el muestreo de la recta entre dos temperaturas, el primer punto del muestreo coincide con esa primera temperatura que da origen a la recta y el último punto del muestreo coincide con esa última temperatura que da final a la recta. Esto ha sido comprobado con la ayuda de un cronómetro, viendo que cada vez que llegaba el instante de un final de intervalo, la temperatura que se mostraba a la salida del Módulo Muestreo era justamente la asociada a ese punto de temporización, porque realmente el Módulo terminaba de sacar los valores muestreados en el momento final en el que acababa el intervalo temporal.

El Módulo Caudal recibe en tiempo real el valor constante de la concentración para un intervalo al inicio del mismo e irá recibiendo el valor de la temperatura correspondiente a cada instante, a lo largo del intervalo. En cada momento en el que cambia el valor de la temperatura, el Módulo Caudal recalcula el valor de sus salidas.

Los valores de temperatura y tiempo (puntos de temporización) asociados a un nuevo intervalo llegan al Módulo Muestreo en el instante de inicio del intervalo en tiempo real. Por tanto, si cada un tiempo igual al período de muestreo suministramos un valor de temperatura al Módulo Caudal, ese valor de temperatura le llega prácticamente en tiempo real porque las labores de construir la recta de temperaturas y muestrearla son prácticamente instantáneas debido a la alta capacidad computacional de HP VEE. El retraso neto, que podría acumularse por los escasos instantes que requiere dicho procesamiento en cada intervalo, se ha comprobado en sucesivas pruebas que sería del orden de segundos, para un experimento que durase por ejemplo treinta minutos.

4.3.3.2.1 Justificación de la necesidad de muestreo.

La disolución que se desea inyectar en el corazón y viene fijada por el perfil criogénico, debe tener unos valores de concentración y temperatura en cada instante. Cada par de valores de temperatura y concentración, mediante el sistema de ecuaciones que definen al sistema total y que se resuelven en el siguiente módulo, Módulo Caudal, determina unívocamente los volúmenes que han de mezclarse de cada baño para formar una disolución total que cumpla esas condiciones de temperatura y concentración.

Por tanto, si cada pareja de valores de temperatura y concentración marcan los volúmenes de fluidos de cada baño que han de mezclarse para formar la disolución, marcan también los niveles de tensión que ha de suministrar cada salida analógica a cada bomba, para que pueda extraer dicho volumen de su baño respectivo. La respuesta del sistema requiere un tiempo no nulo: el paso de tener unos valores de concentración y temperaturas en el programa a tenerlos en la disolución no es un paso instantáneo, requiere de un tiempo muy pequeño pero no insignificante.

El proceso requiere un tiempo de reacción, no es instantáneo si no que está limitado por el tiempo de respuesta del sistema:

- ✓ A partir de los valores de temperatura y concentración, se resuelven las ecuaciones y se obtienen los volúmenes a mezclar de agua y anticongelante. Este tiempo es prácticamente despreciable debido a la alta velocidad de operación del HP VEE.
- ✓ A partir de estos volúmenes, se ha de aplicar la función de transferencia de caudal/tensión de las bombas peristálticas pertinentes, para calcular la tensión que debe salir por el canal analógico asociado a cada bomba peristáltica si se desea que bombee cierto volumen. Este tiempo también es prácticamente despreciable debido a la alta velocidad de operación del HP VEE.
- ✓ Una vez calculada la tensión, el bloque de salida analógica hace que cada canal de salida de la tarjeta de adquisición de datos instalada en el ordenador establezca su nivel de tensión a un valor igual al calculado, alimentando así la entrada de control analógico de flujo de la bomba asociada a cada canal. Los canales analógicos de salida también necesitarán un tiempo de establecimiento mínimo de la señal analógica, para que el valor de tensión se estabilice. Este retraso sí es apreciable.
- ✓ Las bombas reciben esa señal analógica de control y deben responder, por lo que también existen las limitaciones temporales del pequeño tiempo de respuesta de la bomba y la inercia que evita que su motor cambie de velocidad instantáneamente. Este tiempo de respuesta de la bomba sí es significativo.

El hecho de que la respuesta del sistema ante unos valores de concentración y temperatura requiera un tiempo no nulo, nos lleva a pensar que alimentar el sistema con una curva continua de temperaturas no tiene sentido alguno. En una curva los puntos están infinitesimalmente juntos, si intentásemos decir el valor contiguo a otro valor, habría infinitos valores en medio. Por tanto, el Módulo Caudal para calcular los flujos que se requieren mezclar de los baños, debe recibir datos reales que se adapten al comportamiento real de la máquina. No puede recibir una curva que suponga una colección infinita de puntos, porque el sistema no responde en tiempo cero y no puede responder ante infinitos estímulos.

Por tanto la curva continua de temperaturas se muestrea para extraer una colección de puntos suficientemente grande para seguir el comportamiento de la función y por otro lado, suficientemente pequeña para no forzar al sistema. La frecuencia de muestreo deberá ser elegida convenientemente. Su inverso es el período de muestreo, que es el tiempo que transcurre entre la toma de dos valores discretos sucesivos de la función continua. La frecuencia de muestreo deberá ser tal que el período de muestreo esté por encima del valor del tiempo de respuesta de sistema.

4.3.3.2 Reloj local.

El Módulo Muestreo queda despreocupado de la tarea de **generación de sincronismo** porque el Módulo Interfaz ya genera un reloj que sincronice la máquina, para suplir la carencia hardware de la tarjeta de adquisición de datos con programación software adicional. Como el Módulo Interfaz lleva el control del tiempo, suministra a su salida los valores de tiempo, temperatura y concentración característicos de un intervalo, justo en el momento en el que empieza el nuevo intervalo. Como el Módulo Muestreo se activa siempre que cambien sus entradas, se activa siempre que comienza un nuevo intervalo, por lo que este módulo ya se encuentra sincronizado gracias a su situación en cascada con el Módulo Interfaz.

El Módulo Muestreo en cambio no queda exento de la tarea de **generación de un reloj local** al módulo. Una vez que ha construido y muestreado la recta, debe fijar en su salida el valor de cada uno de los puntos muestreados, cada cierto tiempo y recorriendo sucesivamente la colección de los valores discretos hasta completarla. Esta salida cumple dos restricciones:

- El tiempo que transcurre entre que la salida del Módulo Muestreo toma el valor de un punto muestreado y el valor del siguiente, debe coincidir con el período de muestreo para garantizar el funcionamiento en tiempo real.
- El tiempo que tarda la salida en tomar el valor de todos los puntos muestreados debe coincidir con la duración total del intervalo.

Por tanto, aunque gracias al Módulo Interfaz se encuentra sincronizado y es automáticamente activado cuando comienza un nuevo intervalo, después durante la duración del intervalo el Módulo Muestreo debe llevar un control local del tiempo que le permita detectar el transcurso de un tiempo igual al tiempo de muestreo, para activar su salida en el momento preciso. De nuevo debe idearse mediante programación un

mecanismo sustitutorio que emule el control del tiempo que se podría conseguir fácilmente con una tarjeta de adquisición de datos dotada de un reloj, un temporizador o un contador.

4.3.3.2.3 Tareas a realizar.

La misión del Módulo Muestreo es cubrir las siguientes tareas:

- ✓ Detectar, en tiempo real los valores de temperatura y tiempo que le proporciona el Módulo Caudal.
- ✓ Debe activarse cada vez que cambien los valores de sus entradas.
- ✓ Cada vez que cambian los valores de entrada del Módulo Muestreo, construye una nueva recta entre el valor inicial y final de las temperaturas que el Módulo Interfaz le proporciona.
- ✓ Cada vez que cambian los valores de entrada del Módulo Muestreo, muestrea esta recta que construye a partir de los nuevos valores de temperatura.
- ✓ Facilitar al usuario la tarea de saber en qué intervalo se encuentra el experimento y saber cual es la pendiente para la velocidad de enfriamiento que se está empleando en cada momento. Esto se consigue gracias a que en tiempo real, al inicio de un nuevo intervalo el Módulo Muestreo debe refrescar la gráfica que representa el comportamiento que tiene la temperatura frente al tiempo durante ese intervalo.
- ✓ Ofrecer flexibilidad. En cada intervalo no se muestrea la recta de temperaturas característica del intervalo para conseguir un numero fijo de puntos, sino que el número de puntos depende de la duración del intervalo.
- ✓ Elección de la frecuencia de muestreo.
- ✓ Debe mostrar los puntos muestreados. Debe aportar la visualización del número de puntos y el valor de los puntos que se han obtenido del muestreo.
- ✓ Proporcionar al Módulo Caudal la temperatura que sea desea para la disolución en cada instante.
 - El Módulo Muestreo debe fijar en su salida el valor de cada uno de los puntos muestreados, cada cierto tiempo y recorriendo sucesivamente la colección de los valores discretos hasta completarla.

- Este valor de salida del Módulo Muestreo sirve de entrada para el Módulo Caudal.
 - El tiempo que transcurre entre que la salida del Módulo Muestreo toma el valor de un punto muestreado y el valor del siguiente debe coincidir con el período de muestreo para garantizar el funcionamiento en tiempo real.
 - El tiempo que tarda la salida en tomar el valor de todos los puntos muestreados debe coincidir con la duración total del intervalo.
- ✓ Generación de un reloj local al módulo.
 - ✓ Determinar constante de equivalencia entre el tiempo real y el tiempo que transcurre en el PC en el que reside la aplicación de la máquina de Langendorff.
 - ✓ Queda eximido de las tareas de generación de sincronismo porque el Módulo Interfaz genera un reloj que sincroniza el sistema completo.

4.3.3.2.4 Diseño conceptual.

Se presenta seguidamente un esquema de bloques donde se indican las diferentes partes que componen el diseño conceptual propuesto para el Módulo Interfaz dentro del subsistema software.

- ✓ Entradas del Módulo Muestreo:

Las siguiente entradas son suministradas por el Módulo Interfaz, que conecta cuatro de sus salidas a estas cuatro entradas.

- Instante inicial del intervalo.
- Instante final del intervalo.
- Temperatura inicial del intervalo.
- Temperatura final del intervalo.

La otra entrada queda fijada a un valor constante que se determina experimentalmente, una vez que se realizan las calibraciones pertinentes para conseguir el funcionamiento en tiempo real de la máquina de Langendorff. Es un valor que se fija en el diseño de la aplicación, y que por tanto no se presenta como entrada a rellenar al usuario. Se trata de una constante de equivalencia que equipara el tiempo real que se mide en un cronómetro con

el tiempo que transcurre en la ejecución de la aplicación en el PC en el que reside la aplicación de la máquina de Langendorff. Un cambio de PC supondría una nueva calibración del tiempo, teniéndose que calcular una constante de equivalencia válida para las actuales condiciones del sistema.

- Constante de tiempo.

✓ Salidas del Módulo Interfaz:

- Temperatura deseada para la disolución en cada instante.

Se trata de un valor perteneciente a los posibles valores que se obtienen de interpolar entre la temperatura inicial del intervalo y la temperatura final del intervalo.

Este valor de temperatura de salida sirve de entrada al siguiente módulo, Módulo Caudal, que a partir de él y el valor de la concentración que le facilita el Módulo Interfaz, calculará el flujo que debe extraerse de cada baño para que al mezclarse formen una disolución que cumpla en ese instante dichas condiciones de temperatura y concentración.

✓ Displays de ayuda del Módulo Interfaz:

En este módulo se construye un display de ayuda al usuario, que aporta información adicional que le facilitará la tarea de saber cómo va progresando la ejecución de la aplicación.

- Gráfica del perfil de temperaturas que existe en el presente intervalo.

Con la ayuda de este display el usuario puede saber en qué intervalo concreto se encuentra la ejecución del programa y ver cual es la pendiente que se está aplicando durante esos instantes a la velocidad de enfriamiento. Esta gráfica es construida automáticamente por el Módulo Muestreo, interpolando la temperatura inicial y final del intervalo, que le proporciona el Módulo Interfaz. Esta gráfica se refresca en tiempo real cada vez que comienza un nuevo intervalo y que por tanto cambian las temperaturas inicial y final del intervalo.

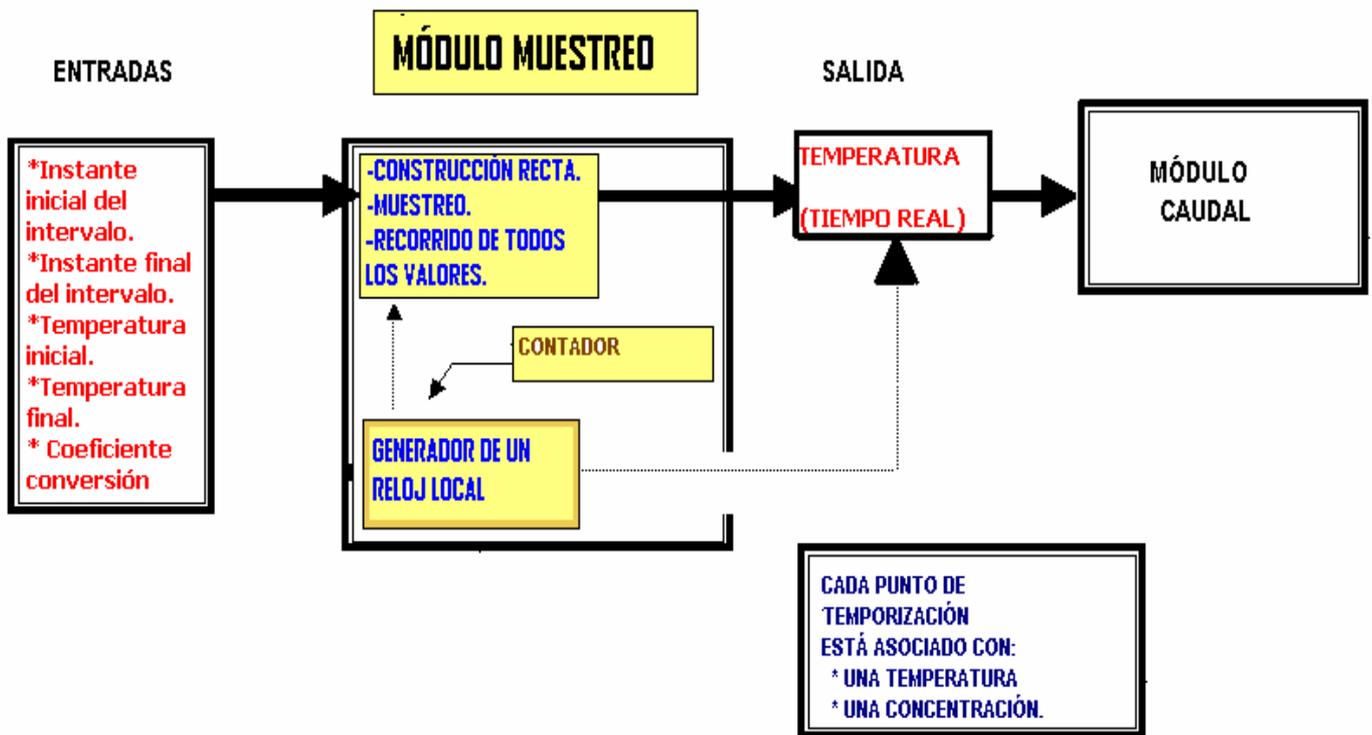


Fig. 32 Esquema de bloques del Módulo Muestreo.

4.3.3.2.5 Particularización.

El diseño propuesto para el Módulo Muestreo está pensado para el prototipo de máquina de Langendorff con control independiente de concentración y temperatura. En el caso de la máquina de Langendorff con control exclusivo de temperatura, mantenemos el mismo diseño, sin variación alguna.

Sirve el mismo bloque en ambos casos, lo cual refuerza la idea de la eficacia de planificar el desarrollo software del proyecto como un sistema que se divide en módulos de menor tamaño, de modo que la programación gane portabilidad, permita la reutilización de módulos en otras aplicaciones y los cambios se puedan realizar más fácilmente, accediendo tan sólo a un determinado módulo de interés, que funciona como una caja negra respecto al resto del programa.

La constante de tiempo que equipara el tiempo real que mide un cronómetro con el tiempo que transcurre en la ejecución de la aplicación en el PC, tiene el mismo valor, porque depende de la frecuencia de reloj del PC concreto donde reside la aplicación y no de la carga computacional que conlleve la complejidad del programa.

De igual modo, al inicio de un nuevo intervalo, el Módulo Interfaz proporciona al Módulo Muestreo los valores de instante inicial, instante final, temperatura inicial y temperatura final del intervalo. Construye la recta que definirá el comportamiento de la temperatura frente al tiempo, la muestreará e irá recorriendo la colección de puntos discretos obtenidos, para ir tomando secuencialmente uno a uno todos esos valores y presentarlos en su salida, cada cierto tiempo.

4.3.3.3 Módulo Caudal.

La disolución debe cumplir en cada momento unas condiciones de temperatura y concentración, que están determinadas por el perfil que introduce el usuario en la aplicación. La disolución es el resultado de mezclar cuatro cantidades de líquidos: un volumen de agua a temperatura T2, un volumen de agua a temperatura T3, un volumen de anticongelante a temperatura T1 y un volumen de anticongelante a temperatura T4.

El volumen que tomamos en cada instante de cada uno de los cuatro baños disponibles ha de ser tal que la mezcla total de las cuatro cantidades satisfaga las especificaciones de temperatura y concentración de ese instante. Esta es la labor que debe cubrir el Módulo Caudal: a partir de sus dos entradas, que son la temperatura y la concentración deseadas para la disolución total en un determinado momento, tiene que calcular el flujo que cada bomba peristáltica debe extraer de su baño correspondiente.

Se recuerda que se puede dividir el perfil criogénico en intervalos, cada uno caracterizado por una velocidad de enfriamiento distinta y una concentración constante en cada intervalo. Un intervalo del proceso de enfriamiento criogénico está limitado en el tiempo por un instante inicial y final, tiene una velocidad de enfriamiento lineal marcada por una temperatura inicial y final, y el valor de la concentración permanece constante durante todo el intervalo.

El Módulo Caudal recibe el valor de la concentración del Módulo Interfaz. En tiempo real, en el instante de inicio de un nuevo intervalo, el Módulo Interfaz actualiza su salida para mostrar un nuevo valor de la concentración. Este es el valor de concentración asociado al punto de temporización que sirve de instante inicial al intervalo y se mantendrá constante durante el nuevo intervalo que ha comenzado. Por tanto, el Módulo Caudal recibe cambios en su entrada de concentración tan sólo al principio del intervalo.

El Módulo Caudal recibe el valor de la temperatura del Módulo Muestreo. Esta es la única salida del Módulo Muestreo y está conectada directamente a la entrada de temperatura del Módulo Caudal. Esta entrada cambiará frecuentemente, cambiará cada vez que transcurra un tiempo igual al período de muestreo que hemos establecido. Por tanto, durante el transcurso de un intervalo, esta entrada del Módulo Caudal sufrirá

numerosos cambios, mientras que la entrada de concentración no sufrirá cambio alguno durante el transcurso del intervalo, ya que sólo se actualizó su valor en el instante de inicio del intervalo.

Cada vez que el Módulo Caudal detecta cambios en sus entradas, vuelve a calcular de nuevo el flujo necesario de cada baño, por tanto actualiza sus valores de salida. Resuelve un sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas para determinar el caudal que debe aportar cada bomba peristáltica a la disolución total.

4.3.3.3.1 Sistema de ecuaciones para el cálculo de caudales.

El Módulo Caudal ha de resolver un sistema determinado de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas para calcular el caudal que debe aportar cada bomba. Los cuatro volúmenes extraídos de los baños al mezclarse deben cumplir las condiciones impuestas a la disolución total. A continuación se detallan las incógnitas y las ecuaciones que definen el sistema:

✓ Incógnitas:

- Caudal que debe proporcionar la bomba 1 asociada al baño 1, que contiene anticongelante. Este caudal se denota f_1 y se medirá en mililitros por minuto.
- Caudal que debe proporcionar la bomba 2 asociada al baño 2, que contiene agua. Este caudal se denota f_2 y se medirá en mililitros por minuto.
- Caudal que debe proporcionar la bomba 3 asociada al baño 3, que contiene agua. Este caudal se denota f_3 y se medirá en mililitros por minuto.
- Caudal que debe proporcionar la bomba 4 asociada al baño 4, que contiene anticongelante. Este caudal se denota f_4 y se medirá en mililitros por minuto.

✓ Ecuaciones:

Para conseguir concordancia en las unidades y mayor facilidad en la resolución del sistema, se toma una duración de 1 minuto como referencia de tiempo para resolver estas ecuaciones y así permite utilizar los mililitros como unidades de las incógnitas $f_i \forall i = 1,2,3,4$.

Las ecuaciones derivan de las especificaciones de volumen máximo, concentración y temperatura que debe cumplir la disolución:

- Especificación sobre el volumen máximo admisible.

La suma de los cuatro caudales no puede superar un volumen máximo V .

$$f_1 + f_2 + f_3 + f_4 = V$$

- Especificación sobre la concentración.

La disolución total, resultado de mezclar dos cantidades de agua f_2 y f_3 , con dos cantidades de anticongelante f_1 y f_4 , debe tener en cada instante una concentración determinada C , indicada en el perfil criogénico definido.

Expresamos la concentración C como litros de soluto divididos entre litros de disolución, tomando el agua como disolvente y el anticongelante como soluto. Resulta la ecuación:

$$C = \frac{f_1 + f_4}{f_1 + f_2 + f_3 + f_4}$$

- Especificación sobre la temperatura.

La disolución total, resultado de mezclar dos cantidades de agua f_2 y f_3 , con dos cantidades de anticongelante f_1 y f_4 , debe tener en cada instante una temperatura determinada T , indicada en el perfil criogénico definido.

Forzamos que las dos cantidades de agua que se mezclan entre sí sean de tal cuantía que su unión se encuentre a temperatura T .

$$T_2 \cdot f_2 + T_3 \cdot f_3 = (f_2 + f_3) \cdot T$$

De igual modo, se fuerza que las dos cantidades de anticongelante que se mezclan entre sí sean tales que la mezcla de ambos fluidos tenga una temperatura T .

$$T_1 \cdot f_1 + T_4 \cdot f_4 = (f_1 + f_4) \cdot T$$

Así, al mezclar finalmente el agua y el anticongelante, la disolución debiera estar a temperatura T , ya que no existe intercambio de calor ni variación de temperatura cuando se mezclan dos líquidos que se encontraban separadamente a la misma temperatura.

4.3.3.3.2 Resolución del sistema de ecuaciones.

La versión 6.0 del lenguaje de programación visual HP VEE está equipado con MATLAB, una de las mejores herramientas software matemáticas de las que se dispone en la actualidad. Con esta versión, el Módulo Caudal se reducía a un único bloque, que se seleccionaba de una librería y cuya función era la resolución de sistemas de ecuaciones. Se ha dispuesto de una versión de evaluación pero no permite almacenar programas cuyo número de elementos visuales supere cierto límite, por lo que se ha optado por emplear HP VEE 5.01, versión de la cual sí se posee la licencia e igualmente es compatible con el programa interfaz DT VPI.

La ventaja de que HP VEE sea un lenguaje de programación visual es que los programas se crean conectando iconos entre sí, utilizando el ratón. En cambio, en un lenguaje textual se utilizan una serie de palabras reservadas para codificar el programa, siguiendo unas reglas de sintaxis. La ventaja de usar HP VEE consiste en que el programa es un diagrama de flujo de datos, que resulta más sencillo de usar y entender que las tradicionales líneas de código. Por el contrario, al ser menos frecuente la utilización de lenguajes visuales, exige un cambio de mentalidad a la hora de abordar la programación.

Para suplir la carencia de MATLAB de HP VEE 5.01, hay que idear un conjunto de iconos conectados, donde cada uno tenga una función específica pero el diagrama de flujo de datos resultante sirva para la resolución de sistemas de ecuaciones. Esta versión del programa sí permite realizar operaciones básicas tales como productos, divisiones, sumas y multiplicaciones, así como permite la definición de matrices. Con las herramientas disponibles, la resolución del sistema de ecuaciones se enfoca de la siguiente manera:

Un sistema tradicional de ecuaciones permite una formulación matricial como la que sigue:

$$\bar{A} \cdot \bar{x} = \bar{b}$$

donde \bar{A} es la matriz de los coeficientes, \bar{x} es el vector de las incógnitas y \bar{b} es el vector de los términos independientes. Por tanto, para resolver el sistema de ecuaciones y obtener los valores de las incógnitas, la operación matricial a realizar es la siguiente:

$$\bar{x} = \bar{A}^{-1} \cdot \bar{b}$$

Los distintos bloques del Módulo Caudal tendrán que crear una matriz \bar{A} con las dimensiones adecuadas. Tendrá que rellenar algunos de sus elementos con un valor constante y dejar abierto el valor de algunos elementos, que dependen de la temperatura y la concentración, por lo que actúan como variables, que reciben su valor de las entradas que tenga en cada instante el Módulo Caudal.

Por tanto hay que definir las matrices de un modo particular, que permita el cambio automático del valor de algunos de sus elementos.

Del mismo modo el Módulo Caudal define un vector \bar{b} y rellena el valor de todos sus elementos, ya que son valores constantes que no dependen de la temperatura o la concentración deseadas para la disolución en cada instante. Uno de los elementos del vector \bar{b} depende de la especificación de volumen máximo y toma el valor del caudal total máximo admisible para la inyección en el órgano profundido. Este valor V es ya conocido y fijado al inicio del experimento, por lo que al arrancar el programa el valor de este elemento del vector se actualiza con el valor consignado y el vector \bar{b} no sufre modificaciones durante la ejecución del programa.

El Módulo Caudal se encargará de invertir la matriz \bar{A} y multiplicarla por un vector \bar{b} , que se ha definido previamente. Después tendrá que acceder separadamente a cada elemento del vector para colocarlo en salidas separadas.

4.3.3.3 Tareas a realizar.

- ✓ Presentar iconos accesibles al usuario, donde pueda consignar la temperatura de cada baño, por si decide cambiar dichos valores de los predeterminados en el diseño de la aplicación.
- ✓ Presentar un icono accesible al usuario, donde pueda consignar el caudal máximo V , en mililitros por minuto, que el tipo de órgano objeto de la criopreservación puede soportar sin que suponga un exceso de presión que le provoque daños tisulares.
- ✓ Capturar la entrada que le proporciona el Módulo Interfaz y almacenar el valor de la concentración que recibe.
- ✓ Capturar la entrada que le proporciona el Módulo Muestreo y almacenar el valor de la temperatura que recibe.
- ✓ Debe activarse cada vez que alguna de sus entradas cambie, para realizar el procesamiento adecuado y actualizar sus salidas.
- ✓ Crear un vector \bar{b} de dimensión 4x1 y rellenar sus elementos, teniendo en cuenta que uno de ellos toma su valor del icono accesible al usuario en el que consignó el caudal total máximo admisible.
- ✓ Crear una matriz \bar{A} de dimensión 4x4 y rellenar los elementos que tengan valor constante.

- ✓ Refrescar con los valores de entrada de temperatura y concentración de cada instante los elementos correspondientes de la matriz \bar{A} .
- ✓ Realizar las operaciones matriciales que suponen resolver el sistema de ecuaciones.
- ✓ Separar el vector solución \bar{x} en cuatro salidas independientes, cada una destinada a una bomba.

Una vez calculados los caudales, se inicia la ejecución de 4 hilos de programación en paralelo. A partir del caudal deseado de cada baño, se calculará el nivel de tensión de control necesario y se fijará ese voltaje en su respectivo canal analógico. Esto ocurrirá para cada bomba, y se realizará en paralelo el procesamiento para cada una de ellas.

4.3.3.3.4 Diseño conceptual.

Se presenta seguidamente un esquema de bloques donde se indican las diferentes partes que componen el diseño conceptual propuesto para el Módulo Caudal dentro del subsistema software:

- ✓ Entradas:
 - Temperatura.
Recibe la única salida del Módulo Muestreo como una de sus entradas.
 - Concentración.
Este valor era una de las salidas del Módulo Interfaz.
- ✓ Salidas:
 - Caudal Bomba1.
Es el caudal en mililitros por minuto (ml/min) que debe extraerse el baño etiquetado como baño1, a través de su bomba peristáltica correspondiente.
 - Caudal Bomba2.

Es el caudal en mililitros por minuto (ml/min) que debe extraerse el baño etiquetado como baño 2 a través de su bomba peristáltica correspondiente.

- Caudal Bomba3.

Es el caudal en mililitros por minuto (ml/min) que debe extraerse el baño etiquetado como baño 3 a través de su bomba peristáltica correspondiente.

- Caudal Bomba4.

Es el caudal en mililitros por minuto (ml/min) que debe extraerse el baño etiquetado como baño 4 a través de su bomba peristáltica correspondiente.

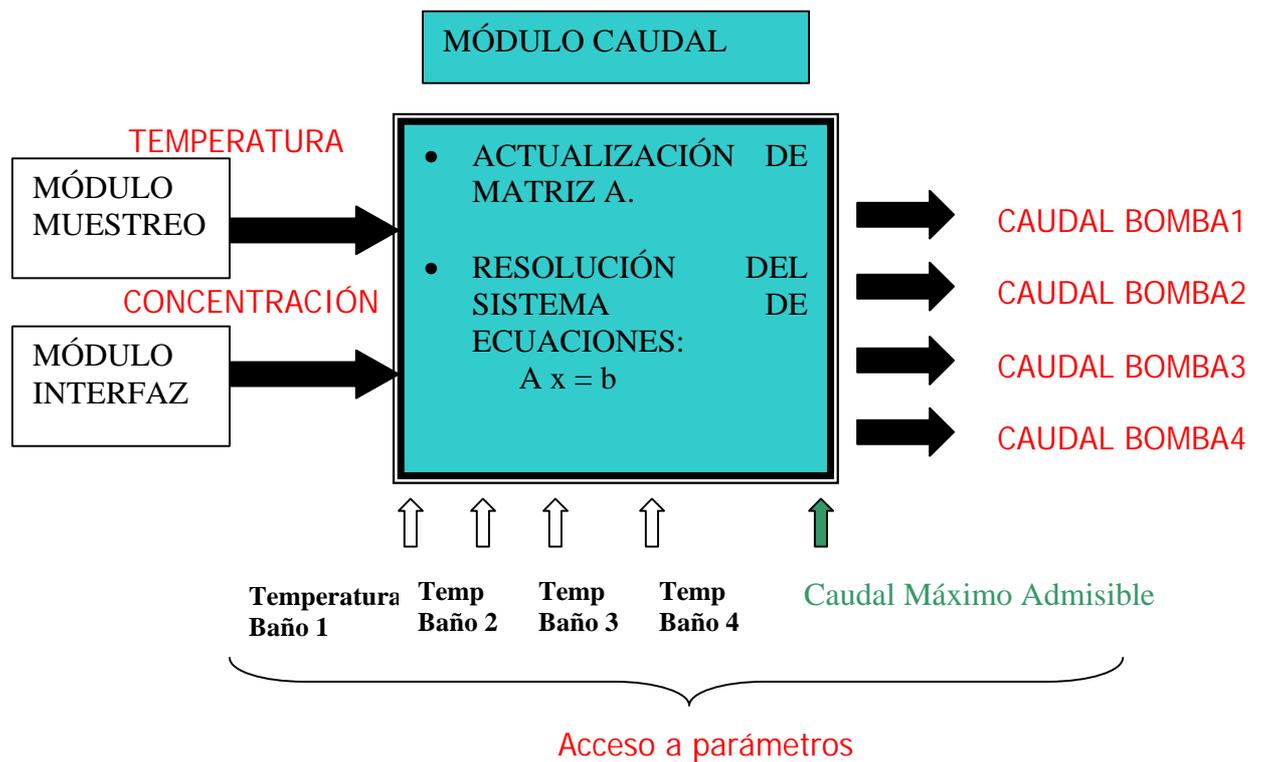


Fig.33 Esquema de bloques del Módulo Caudal.

✓ Variables accesibles:

- Temperatura del Baño1.
- Temperatura del Baño2.
- Temperatura del Baño3.
- Temperatura del Baño4.
- Caudal total máximo admisible.

Por defecto, la aplicación del programa se ha diseñado con unos valores determinados para la temperatura de cada uno de los cuatro baños. La aplicación admite total flexibilidad, permitiendo al usuario de la máquina cambiar externamente la temperatura de los baños con los que desea realizar los experimentos y después reflejar estos cambios en la aplicación que controla la máquina, para que todo el procesamiento que se realiza al ejecutar el programa tome estos nuevos valores reales.

El Módulo Caudal es el lugar donde están accesibles estos parámetros y se podrán modificar manualmente los valores antes de iniciar el proceso de enfriamiento.

De igual modo se ha elegido un caudal máximo admisible en la aplicación, teniendo en cuenta que los experimentos van a realizarse con corazones de cerdo. Si se prefiere experimentar con corazones de rata o cualquier otro animal, habrá que modificar el valor de este caudal antes de ejecutar la aplicación e introducir un caudal que se adecue más exactamente a las características de tamaño y forma del nuevo órgano a criopreservar, para que la disolución inyectada no dañe sus tejidos por un exceso de presión.

4.3.3.3.5 Particularización.

En la máquina de Langendorff con 2 bombas la disolución no está sujeta a restricciones acerca de su concentración, tan sólo existe un valor de temperatura en cada instante que sí debe cumplir. La disolución es el resultado de mezclar una cantidad de agua de temperatura T1 y otra cantidad de anticongelante a temperatura T2.

Este Módulo admite mayores simplificaciones que los anteriores cuando está integrado en la aplicación que reside en la máquina de Langendorff con control exclusivo de la temperatura. El diseño obedece a la misma línea conceptual, pero el procesamiento experimenta una simplificación al trabajar con matrices y vectores de menor dimensión. La razón es que el cálculo del caudal que tiene que proporcionar cada bomba es el resultado de resolver un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas. Una ecuación deriva de la especificación de temperatura y la otra se obtiene de la especificación de volumen máximo.

4.3.3.3.5.1 Sistema de ecuaciones para el cálculo de caudales.

El Módulo Caudal ha de resolver un sistema determinado de dos ecuaciones con dos incógnitas para calcular el caudal que debe aportar cada bomba. Los dos volúmenes extraídos de los baños al mezclarse deben cumplir las condiciones impuestas a la disolución total. A continuación se detallan las incógnitas y las ecuaciones que definen el sistema:

✓ Incógnitas:

- Caudal que debe proporcionar la bomba 1 asociada al baño 1, que contiene agua. Este caudal se denota f_1 y se medirá en mililitros por minuto.
- Caudal que debe proporcionar la bomba 2 asociada al baño 2, que contiene anticongelante. Este caudal se denota f_2 y se medirá en mililitros por minuto.

✓ Ecuaciones:

Para conseguir concordancia en las unidades y mayor facilidad en la resolución del sistema, se toma una duración de 1 minuto como referencia de tiempo para resolver estas ecuaciones y así permite utilizar los mililitros como unidades de las incógnitas $f_i \forall i = 1,2,3,4$.

Las ecuaciones derivan de las especificaciones de volumen máximo y temperatura que debe cumplir la disolución:

- Especificación sobre el volumen máximo admisible.

La suma de los cuatro caudales no puede superar un volumen máximo V .

$$f_1 + f_2 = V$$

- Especificación sobre la temperatura.

La disolución total, resultado de mezclar una cantidad de anticongelante f_2 con una cantidad de agua f_1 , debe tener en cada instante una temperatura determinada T , indicada en el perfil criogénico definido.

$$T_1 \cdot f_1 + T_2 \cdot f_2 = (f_1 + f_2) \cdot T$$

4.3.3.3.5.2 Simplificación en la definición de matrices.

El Módulo Caudal tendrá que crear una matriz \bar{A} de dimensiones 2x2, rellenar dos de sus elementos con un valor constante y dejar abierto el valor de los otros dos elementos, que dependen de la temperatura. Por tanto en la matriz hay dos elementos que actúan como variables, recibiendo su valor de la entrada que tenga en cada instante el Módulo Caudal.

El vector \bar{b} será de dimensión 2x1 y sus elementos serán independientes del valor de temperatura deseado en cada instante para la disolución. Igual que en el diseño para cuatro bombas, un elemento del vector \bar{b} depende de la especificación de volumen máximo y toma el valor del caudal total máximo admisible V para la inyección en el órgano perfundido.

4.3.3.3.5.3 Tareas a realizar.

- ✓ Presentar iconos accesibles al usuario, donde pueda consignar la temperatura de cada baño, por si decide cambiar dichos valores de los predeterminados en el diseño de la aplicación.
- ✓ Presentar un icono accesible al usuario, donde pueda consignar el caudal máximo, en mililitros por minuto, que el tipo de órgano objeto de la criopreservación puede soportar sin que suponga un exceso de presión que le provoque daños tisulares.
- ✓ No recibe ningún valor de entrada de concentración, por lo que el Módulo para dos bombas queda exento de capturar ese valor y almacenarlo.
- ✓ Capturar la entrada que le proporciona el Módulo Muestreo y almacenar el valor de la temperatura que recibe.
- ✓ Debe activarse cada vez que cambie el valor de la temperatura que recibe como entrada al Módulo, para realizar el procesamiento adecuado y actualizar sus salidas.
- ✓ Crear un vector \bar{b} de dimensión 2x1 y rellenar sus elementos, teniendo en cuenta que uno de ellos toma su valor del icono accesible al usuario en el que consignó el caudal total máximo admisible.
- ✓ Crear una matriz \bar{A} de dimensión 2x2 y rellenar los elementos que tengan valor constante.
- ✓ Refrescar con los valores de entrada de temperatura los elementos correspondientes de la matriz \bar{A} .

- ✓ Realizar las operaciones matriciales.
- ✓ Separar el vector solución en dos salidas independientes, cada una destinada a una bomba.

En este prototipo, una vez calculados los caudales, se inicia la ejecución de 2 hilos de programación en paralelo. Igual que ocurría en la máquina de 4 bombas, a partir del caudal a extraer de cada baño, se calculará el nivel de tensión de control necesario y se fijará ese voltaje en su respectivo canal analógico. Esto ocurrirá para cada bomba, y se realizará en paralelo el procesamiento para cada una de ellas.

4.3.3.3.5.4 Diseño conceptual.

Se presenta seguidamente un esquema de bloques donde se indican las diferentes partes que componen el diseño conceptual propuesto para el Módulo Caudal dentro del subsistema software de la máquina de Langendorff para dos bombas:

- ✓ Entradas:
 - Temperatura.
Recibe la única salida del Módulo Muestreo como su única entrada.
- ✓ Salidas:
 - Caudal Bomba1.
Es el caudal que debe extraerse el baño 1 a través de su bomba peristáltica correspondiente, medido en mililitros por minuto (ml/min).
 - Caudal Bomba2.
Es el caudal que debe extraerse el baño 2 a través de su bomba peristáltica correspondiente, medido en mililitros por minuto (ml/min).
- ✓ Variables accesibles:
 - Temperatura del Baño1.
 - Temperatura del Baño2.

- Caudal total máximo admisible.

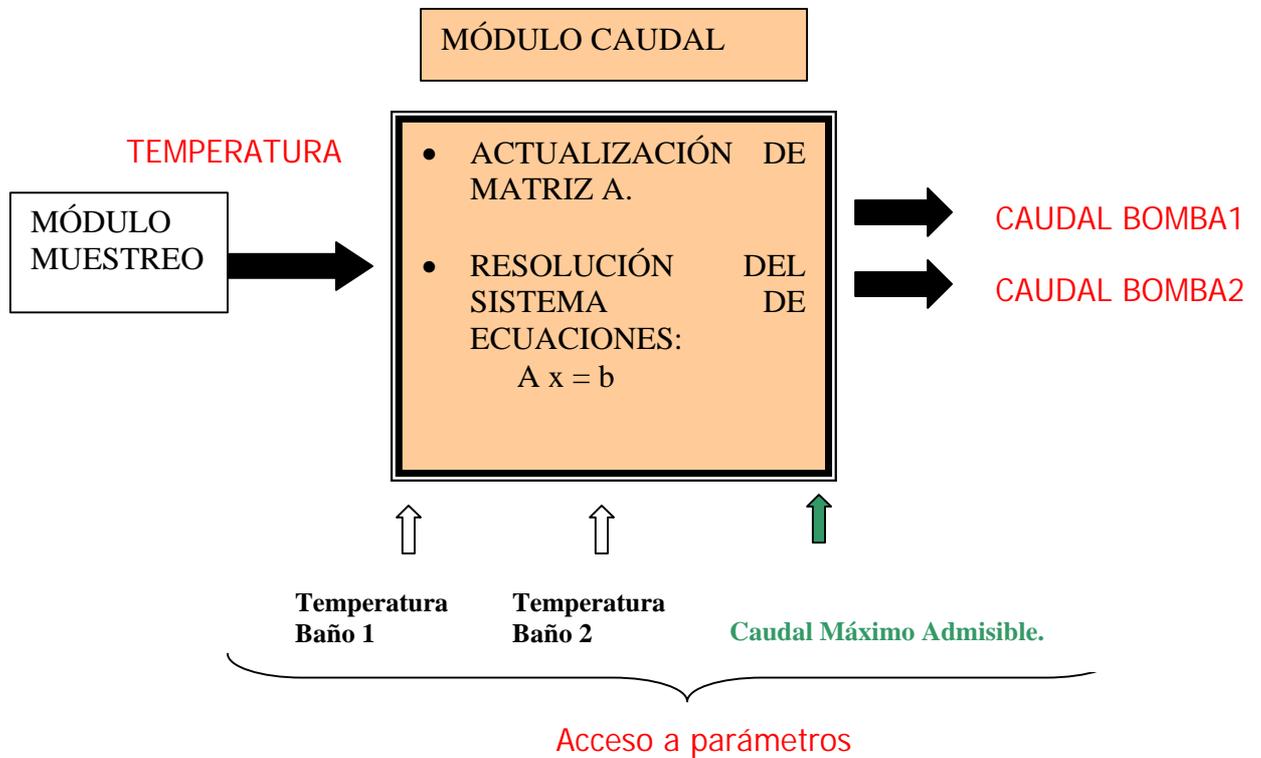


Fig.34 Esquema de bloques del Módulo Caudal.

Por defecto, la aplicación del programa se diseña para unos valores concretos de temperatura para cada baño, pero ofrece total flexibilidad al permitir al usuario cambiar externamente la temperatura de los dos baños y después reflejar estos cambios en la aplicación que controla la máquina, para que todo el procesamiento que se realiza al ejecutar el programa tome estos nuevos valores reales.

También se ha elegido un caudal máximo admisible en la aplicación, teniendo en cuenta que los experimentos se van a realizar sobre corazones de cerdo pero es un valor modificable por el usuario si desea trabajar con órganos de otra naturaleza o experimentalmente detecta que existe un valor más afinado.

El Módulo Caudal es el lugar donde están accesibles estos parámetros y se podrán modificar manualmente los valores antes de iniciar el proceso de enfriamiento.

4.3.3.4 Módulo Salida Analógica.

El Módulo Caudal ofrece cuatro salidas, una para cada bomba peristáltica, en la que se indica el caudal que debe extraerse de cada baño para que al mezclarse, la disolución total cumpla las condiciones de temperatura y concentración deseadas en cada instante. Este caudal está medido en ml/min.

Estas cuatro salidas del Módulo Caudal no entran directamente como entradas del Módulo Salida Analógica, sino que previamente, cada una de ellas atraviesa un bloque que transforma el caudal que debe proporcionar cada bomba, en la tensión de control que debe alimentarla para que proporcione ese caudal. Dicho bloque toma su entrada, le aplica una función matemática y vuelca el resultado en su salida. Esta función matemática es precisamente la función de transferencia que hemos medido experimentalmente para la bomba.

Sólo es necesario realizar las medidas para una bomba, porque empleamos el mismo modelo comercial de bomba peristáltica para todos los baños, por lo que el bloque de Función de Transferencia de la Bomba es idéntico para cada bomba y les aplica la misma función.

Para realizar estas medidas, también se diseña una pequeña aplicación adicional, en la que se pueda seleccionar un nivel de tensión entre 0 y 10 voltios y automáticamente se establece ese voltaje en un canal previamente seleccionado.

Una vez que los cuatro valores de caudal que proporcionaron el Módulo Caudal han sido transformados a valores de tensión, a través del bloque que aplica la función de transferencia de las bombas peristálticas, ya se dispone de los cuatro valores que sirven de entrada al Módulo Salida Analógica. Estos valores de tensión, aplicados a las bombas peristálticas, harán que éstas funcionen a una velocidad tal que bombeen el caudal esperado, extrayendo líquido de su baño correspondiente. Según el valor de tensión que alimente su entrada de control analógico de flujo, el motor girará a una velocidad distinta y así cambiará el volumen de fluido que puede extraer en un mismo tiempo.

4.3.3.4.1 Riqueza de la programación empleada.

Una vez que el Módulo Caudal ofrece el valor de sus salidas, el procesamiento sobre cada una de ellas se produce en paralelo: cada una de estas señales que miden caudal sufren una transformación a un valor de tensión al mismo tiempo. A partir de ese punto, el programa pasa de tener un hilo de ejecución a tener cuatro hilos que trabajan en paralelo, lo cual enriquece la variedad de herramientas y técnicas de programación que se emplean al codificar la aplicación: introducción al uso de lenguajes visuales, programación multithread, manejo del tiempo real, uso de iteraciones, herramientas matemáticas, manejo de entradas de tamaño variable, herramientas de control de dispositivos e instrumentación externa, etc...

4.3.3.4.2 Tareas a realizar.

El Módulo Salida Analógica toma sus entradas, que son cuatro valores distintos de tensión, y ejecuta cuatro veces y en paralelo un mismo diagrama de flujo. El objetivo que persigue es que cada uno de los cuatro canales analógicos de la tarjeta de adquisición de datos adopte un valor de tensión igual a los indicados por las entradas del Módulo Salida Analógica.

Cada uno de estos diagramas de flujo está asociado a un nivel de tensión, que debe alimentar a una bomba de las cuatro disponibles, por lo que incluye las tareas necesarias para configurar el canal analógico de la tarjeta de adquisición de datos que se ha asociado a esa bomba peristáltica. De esta forma, el canal analógico correspondiente tomará ese valor determinado de tensión, que servirá para controlar el flujo que suministre la bomba peristáltica asociada a ese canal.

Las tareas que debe realizar el Módulo Salida Analógica son:

- ✓ Detectar, en tiempo real, los valores de tensión que le suministran los bloques de función de transferencia de las bombas, situados tras las salidas del Módulo Caudal.
- ✓ Debe activarse cada vez que cambien los valores de sus entradas.
- ✓ Configuración del convertidor Digital/Analógico correspondiente a cada canal.
- ✓ Obtención de un manejador de subsistema, usado por los objetos del programa para identificar qué subsistema usar. Todos los objetos de adquisición de datos requieren un manejador de subsistema como una de sus entradas de datos.
- ✓ Selección de un rango de salida de los disponibles en la tarjeta de adquisición de datos.
- ✓ Selección de la ganancia de los canales analógicos, ofreciendo así más posibilidades para conjuntamente ajustar el rango final.
- ✓ Selección del canal analógico por el que se desea sacar cada valor de tensión.
- ✓ Queda eximido de seleccionar una tasa de salida de datos. Cada vez que se detecta un cambio en los valores de tensión que sirven de entrada al Módulo Salida Analógica, se actualizan los voltajes de los canales analógicos. Mientras no se detecte cambio, se mantiene el valor anterior.

- ✓ Ofrecer como salida del Módulo cuatro indicadores visuales, en los que se muestra en tiempo real qué tensión está alimentando en cada momento a cada bomba, a través de su canal correspondiente. Se usa como indicador visual un modelo que presenta una escala semicircular con los valores posibles de tensión que puede tomar cada canal, una aguja que señala el voltaje aplicado y una indicación numérica del valor apuntado por la aguja.

4.3.3.4.3 Particularización.

En el caso del prototipo de máquina de Langendorff con 2 bombas, el diseño del Módulo Salida Analógica no cambia, pero sí queda reducido a 2 hilos de ejecución, en lugar de 4. El diagrama de flujo de datos correspondiente a un hilo de ejecución se mantiene igual que en el prototipo con 4 bombas. Los valores de caudal provenientes del Módulo Caudal sufren una idéntica transformación, a través de la misma función de transferencia, a valores de tensión. Este bloque de transformación no varía, puesto que empleamos el mismo modelo comercial de bomba peristáltica.

El Módulo Salida Analógica toma como entrada dos valores de tensión, y ejecuta dos veces y en paralelo el mismo diagrama de flujo. Persigue el objetivo de que dos de los cuatro canales analógicos de la tarjeta de adquisición de datos, adopten un valor de tensión igual a los indicados por las entradas del Módulo Salida Analógica.

Cada uno de estos diagramas de flujo está asociado a un nivel de tensión, que debe alimentar a una bomba de las dos disponibles, por lo que incluye las tareas necesarias para configurar el canal analógico de la tarjeta de adquisición de datos que se ha asociado a esa bomba peristáltica. De esta forma, el canal analógico correspondiente tomará un valor determinado de tensión, que servirá para controlar el flujo que suministre la bomba peristáltica asociada a ese canal.

4.3.3.4.4 Solución alternativa.

En un principio se pensó, como modelo del Módulo Salida Analógica, el diseño de un modulador PWM (Modulación por ancho de pulso).

En este diseño, el modulador PWM tiene dos señales de entrada:

- ✓ Una señal tipo rampa, señalada en amarillo en la figura 35, página 4-60, con valores de la frecuencia 200 Hz, amplitud de 5 voltios, offset de continua de 5 voltios.
- ✓ Una señal llamada umbral, que es una señal continua con una tensión constante y está señalada en azul en la figura 35, página 4-60. Esta sería la variable para controlar la salida del modulador, y con ella, la tensión que alimenta la bomba peristáltica y el flujo que ésta proporciona.

Al usarse este tipo de modulación, dependiendo del caudal que indicara para las bombas cada salida del Módulo Caudal, una función de transferencia aplicada sobre el valor del caudal, daría como resultado un valor de tensión de umbral.

Este valor de umbral se compararía con la señal de tipo rampa, de manera que en los instantes en los que la rampa tuviese mayor valor de tensión que la señal umbral, a la salida se generaría un nivel alto (10 Voltios) y en los instantes en los que la rampa alcanzase valores menores de tensión que la señal umbral, a la salida se generaría un nivel bajo (0 voltios). Ver figura 36, página 4-60.

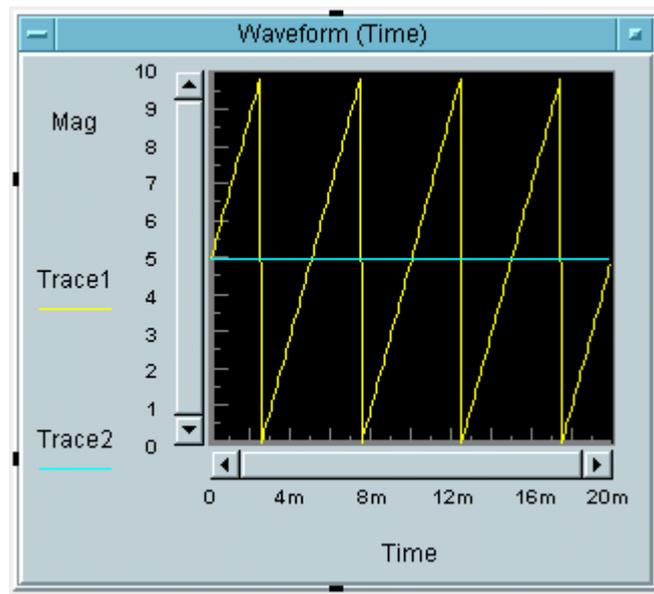


Fig.35 Señales de entrada del modulador PWM.

Como resultado de la comparación entre una señal ya fijada (señal rampa) y una señal variable con el caudal (señal umbral), se conseguía un tren irregular de pulsos cuadrados que se hacía salir por el canal analógico correspondiente, para alimentar la señal de control analógico de flujo de la bomba peristáltica asociada al canal.

La forma del tren dependía del valor del umbral: según los intervalos durante los cuales supere o no los niveles de tensión de la señal rampa, la señal cuadrada tiene unos tiempos distintos a nivel alto y bajo. De esta manera se pensó que se aumentaban las posibilidades para controlar las bombas peristálticas. Esta modulación permitiría teóricamente hacer un control más preciso, que barriese más posibilidades de entradas de control y por tanto se pudiesen conseguir flujos más precisos.

En la realidad esta solución no fue practicable, porque la bomba no respondía adecuadamente a este control todo-nada. El motor de la bomba no mantenía una velocidad constante mientras la bomba era alimentada por el tren de pulsos generado a partir de un mismo valor de tensión umbral. Con la modulación se acentuaba exponencialmente la inercia del motor de las bombas y se conseguían peores resultados

en las medidas, a pesar de probar con distintas frecuencias para la señal rampa en el intento de afinar el funcionamiento del modulador.

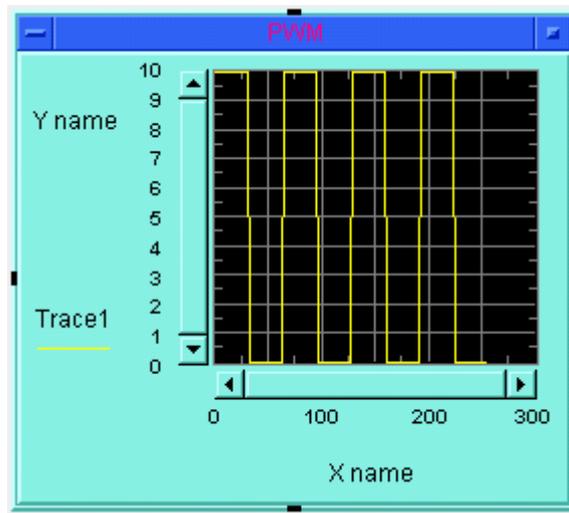


Fig.36. Señal de salida de un modulador PWM.

Finalmente en el presente proyecto se opta por medir directamente la función de transferencia de las bombas peristálticas, alimentándola con valores suficientes de tensión y midiendo los volúmenes de fluidos que extraen en un minuto de tiempo. A partir de esos puntos se construye la función matemática que se ajusta a ese comportamiento. Una vez integrado un bloque con la función matemática que describe la función de transferencia tensión/caudal de las bombas peristálticas, los valores de tensión resultantes de aplicar la función matemática sobre el caudal como variable, se sacan directamente por los canales analógicos para alimentar las bombas, gracias al Módulo Salida Analógica, que realiza las configuraciones pertinentes de la tarjeta de adquisición de datos.

5 DESCRIPCIÓN POR SUBSISTEMAS.

Tras la visión general de los objetivos que se persiguen y la descripción global de la solución elegida para la implementación de la máquina de Langendorff, resta entrar en los detalles más técnicos y minuciosos implicados en el desarrollo del prototipo.

Una vez realizado el estudio teórico de la Criopreservación, se tienen las herramientas de conocimiento fisiológico mínimas para emprender la construcción del prototipo. La máquina como un único sistema total se divide en dos grandes subsistemas: subsistema hardware y subsistema software. A continuación se pretende la profundización en estos dos grandes subsistemas:

- ✓ En el caso del subsistema hardware, se persigue saber cuales y cómo son exactamente los componentes hardware que se utilizan, cuales son sus características eléctricas y físicas, su conexionado, su interfaz, sus entradas y salidas, su interrelación con otros elementos físicos de la máquina y el procedimiento de su instalación.
- ✓ En el caso del subsistema software, se desea describir cada uno de los subsistemas en los que a su vez se subdivide

En la descripción global del sistema se ha dado a conocer el número de módulos en los que se divide la aplicación que controla la máquina de Langendorff. Se definió la funcionalidad de cada módulo, sus entradas y salidas y su interrelación e integración dentro de la aplicación.

Queda por tanto preparado el camino para hacer una descripción minuciosa de cada uno de los subsistemas que conforman la aplicación, recorriendo cada módulo para dejar de modelarlos como cajas negras y saber exactamente cómo están codificados empleando el entorno visual HP VEE y DT VPI.

Se descubrirán los artificios de programación que se han empleado para la emulación de un reloj del sistema, para la resolución de las ecuaciones que describen la máquina, para recoger los datos del usuario, para construir los perfiles de criopreservación gráficamente a partir de entradas de texto y para dar órdenes sobre la tarjeta que controlen las bombas peristálticas en tiempo real.

Se adjuntará el código del programa y se verá claramente el concepto de programación modular que se ha seguido en el diseño de la aplicación. La herramienta de desarrollo software HP VEE es un lenguaje visual, por lo que la aplicación no se diseña generando líneas de código que siguen una sintaxis determinada, sino que es un conjunto de iconos interconectados, por lo que la aplicación diseñada es un diagrama de flujo de datos.

HP VEE permite agrupar una serie de iconos, cada uno con una funcionalidad básica, en un único objeto, que llama User Object (Objeto de Usuario), con lo cual externamente se consigue una idea más intuitiva y

general de la aplicación, porque visualmente se ahorran muchos detalles. Después se puede conocer el contenido de estos bloques, accediendo con el ratón a estos Objetos de Usuario se visualiza la programación anidada que existe dentro. Esta anidación es recursiva y sucesivamente podemos ir agrupando conjunto de elementos básicos en objetos, estos objetos a su vez se pueden agrupar en nuevos bloques y así sucesivamente, si lo deseamos.

5.1 HARDWARE DE LA MÁQUINA DE LANGENDORFF.

5.1.1 BOMBAS PERISTÁLTICAS.

La máquina de Langendorff con control independiente de temperatura y concentración está dotada de 4 bombas peristálticas idénticas entre sí. La particularización de esta máquina al prototipo que tiene exclusivo control sobre la temperatura requiere tan sólo de 2 bombas, que también son idénticas entre sí y al mismo tiempo idénticas a las necesarias en el montaje de control independiente de temperatura y concentración.

El modelo de bomba escogido es una bomba peristáltica de flujo variable de la marca Dinko, modelo D-21V. Se suministra con un surtido de tubos y conectores.



Fig.37 Bomba peristáltica Dinko.

Sus características son las siguientes:

- ✓ Lleva un regulador potenciométrico de velocidad continuo.
- ✓ Dotada de un cabezal con rotor de policarbonato de 2 rodillos, salida para control remoto e interruptor general luminoso.
- ✓ Control analógico de la velocidad del rotor.
 - Rango de tensiones de entrada de control :0-10 V

- ✓ Características de los tubos:
 - Tubos de silicona.
 - Grado médico / alimentario, según normas FDA y USP.
 - Tubos de fácil extracción para su reposición o esterilización.
 - Esterilización por autoclave.
 - Rango de uso hasta 250°C y duración media.

- ✓ Funcionamiento:
 - Componente continua: 220 V
 - Componente alterna: 50-60 Hz

- ✓ Temporizador controlador.
 - Rango; 0,1 segundos a 10 horas.
 - Incrementos 0,025s- 0,25h.

- ✓ Este modelo de bomba, según qué cabezal tenga montado, tendrá una velocidad distinta del rotor. La existencia de motores de distintas revoluciones y de tubos de diferentes diámetros son dos grados de libertad que juntos ofrecen distintas posibilidades para el caudal que proporciona la bomba:

DiámetroTubo (mm)		0.8	1.6	3.2	4	4.8	6.4
Cabezal 45-2r	Flujo (ml/min)	0,3-3	1-11	5-28	10-54	-	-
Cabezal 50-2r		6-26	15-70	40-240	75-375	100-540	150-750

- ✓ Dimensiones de la bomba:

Ancho (mm)	Fondo (mm)	Alto (mm)
260	240	90

- ✓ Peso: 2,5 Kg

5.1.2 TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS.

La máquina de Langendorff, tanto en su versión de 2 como 4 bombas, consta de una tarjeta de adquisición de datos del fabricante Data Translation, el modelo es DT331, perteneciendo a la serie DT330 de Data Translation.

Esta serie se caracteriza por ser tarjetas de bajo coste con salidas analógicas y entradas/salidas I/O digitales, ideales para aplicaciones que requieren múltiples salidas D/A y capacidades de control.

Los rasgos principales de la serie DT330 son:

- ✓ Existen cuatro configuraciones distintas de la tarjeta.
- ✓ Tienen 4 u 8 salidas analógicas con 12 o 16 bits de resolución.
- ✓ Tienen 32 líneas I/O digitales para un control o una monitorización, que no requieran de la medida del tiempo.
- ✓ No existen relojes ni contadores ni temporizadores.
- ✓ Interrupciones por la detección de un cambio en un bit al monitorizar señales críticas.

Las especificaciones detalladas de la tarjeta DT331 de la serie DT330 son:

- ✓ 0 canales de entradas analógicas.
- ✓ 4 canales de salidas analógicas:
 - Resolución: 12 bits.
 - Rango: 126.
 - Rango de tensiones de salida, (Thruput): 1-10 V
- ✓ Interfaz de funciones digitales.
 - 32 líneas de entrada/salida I/O.
 - No existen contadores ni temporizadores.
 - Bus PCI
 - Transferencia de datos: PIO

De esta tarjeta sólo son necesarios los canales de salida analógica: 2 canales de salida analógica en el montaje de 2 bombas y 4 canales en el montaje de 4 bombas; quedando libres los puertos digitales para posibles ampliaciones y mejoras del prototipo de la máquina.

5.1.2.1 Instalación de la tarjeta.

Se instala la tarjeta en un slot libre de la placa madre del PC que se emplea como centro de procesamiento de la máquina de Langendorff. Simplemente se inserta la tarjeta en una ranura libre de la placa madre y se aprieta suavemente hasta notar que han encajado los pines dentro del slot.

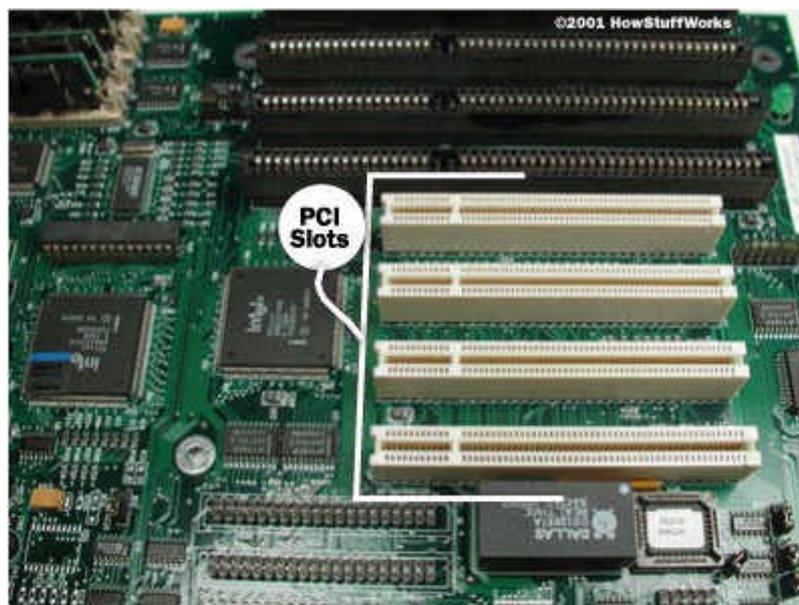


Fig. 38 Slots (ranuras) disponibles para tarjetas PCI en una placa madre

La tarjeta de adquisición de datos con bus PCI usa 47 pines para conectarse dentro del slot. La instalación es tan sencilla, que basta presionar la tarjeta ligeramente para que los pines encajen perfectamente en el slot disponible y quede la conexión hecha. El bus PCI es capaz de trabajar con un número tan bajo de pines gracias a la multiplexación hardware que implementa, que implica que un dispositivo envía más de una señal por el mismo pin.



Fig.39 Los 47 pines de la tarjeta se conectan dentro del slot libre del PC.

La superficie metálica que viene perpendicularmente unida a la tarjeta (ver figura 40) es el lateral que mira al exterior del PC, una vez que encajamos la tarjeta en su slot. Al manipular la tarjeta, debemos sujetarla por dicha superficie para evitar descargas electrostáticas no deseadas que dañarían parcial o totalmente la tarjeta. Esta superficie metálica la fijamos a la estructura exterior de la minitorre del ordenador con unos tornillos, para evitar por ejemplo, que al trasladar el ordenador a otro sitio, los pines de la tarjeta pudieran salirse de su slot.

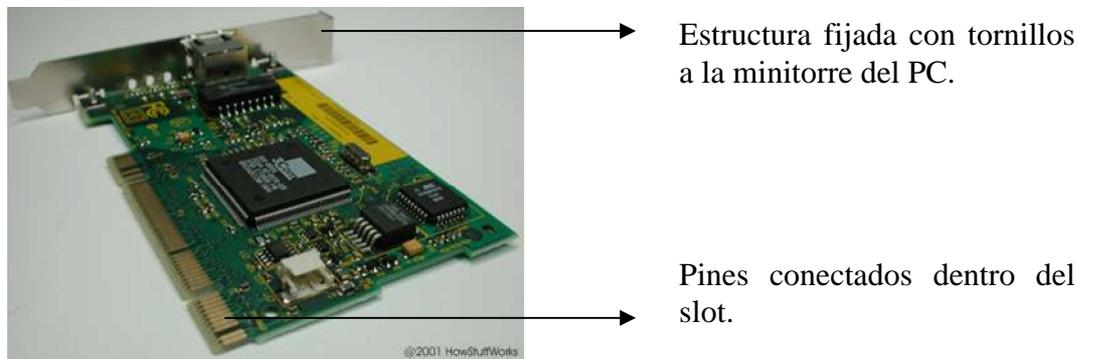


Fig.40 Componentes de la tarjeta que intervienen en su instalación en el PC.

La tarjeta no necesita fuente de alimentación externa, el PC le suministra la energía suficiente para su funcionamiento.

5.1.3 CONEXIONADO.

Una vez definido el tipo de bombas peristálticas empleadas en el montaje de la máquina de Langendorff y conocida la tarjeta de adquisición de datos elegida para controlar por tensión dichas bombas, resta determinar el conexionado entre ambas partes. De la tarjeta sólo se emplean los canales de salida analógica: 2 canales de salida analógica en el montaje de 2 bombas y 4 canales en el montaje de 4 bombas. Cada canal de salida está asociado y se conectará con una bomba distinta, para controlar con su tensión de salida, el caudal que la bomba suministre a la disolución total inyectada en el corazón.

Cada canal está accesible en un panel construido con el subconjunto de cables de las salidas analógicas de la tarjeta. Cada canal, accesible en un conector distinto del panel, se conecta directamente por un cable a la entrada de tensión de control que posee cada bomba peristáltica.

Los cuatro canales de la tarjeta son fácilmente accesibles, gracias a que se han agrupado los 4 canales analógicos en un panel. Este panel es el resultado de:

- ✓ Sacar tan sólo los cables correspondientes a los 4 canales analógicos, del mazo de cables que contiene todos los hilos eléctricos de la tarjeta (hilos eléctricos asociados a sus líneas digitales, sus canales analógicos, señal de tierra GND, etc...). Cada canal de salida analógica tiene asociados dos hilos, entre los que se establecerá una tensión diferencial entre 0-10 V.
- ✓ Una vez separados los cables que funcionan como líneas eléctricas de los canales analógicos, son correctamente enganchados, cada par de cables asociado a un canal, dentro de un conector metálico distinto. Por tanto en el panel se presentan cuatro conectores perfectamente accesibles, donde cada conector es un canal analógico.

El componente de conexionado que empleamos es un latiguillo BNC- BNC, que es un cable en el que sus dos extremos son conectores de tipo BNC. Enganchando un cable de este tipo en cada conector, el otro extremo se conecta directamente a la entrada de tensión de la bomba peristáltica asociada a dicho canal. Dicha entrada de tensión de control se encuentra en la parte trasera de la bomba peristáltica.

Como el rango de tensiones que admite la entrada de la bomba destinada al control analógico de la velocidad del rotor es 0-10 V y coincide exactamente con el rango de tensiones que admite la salida de los canales analógicos de la tarjeta de adquisición de datos (0-10V), no es necesario construir ningún circuito adicional que haga funciones de interfaz adaptadora de niveles de tensión.

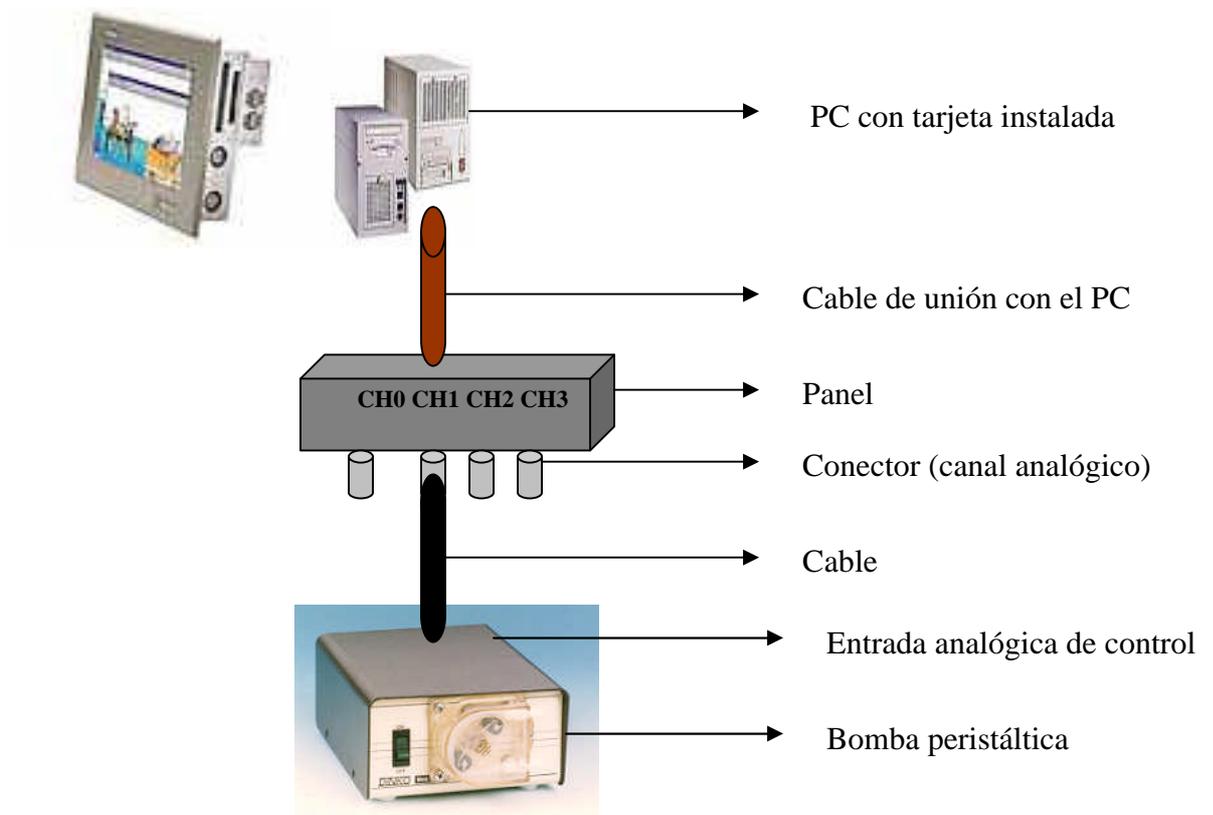


Fig. 41 Conexión entre los canales analógicos y las bombas peristálticas.

5.1.3.1 Control independiente de temperatura y concentración.

Recordando el esquema del montaje de 4 bombas, (Fig.9, pág. 3-15), la asociación de canales analógicos y bombas peristálticas es la siguiente:

- ✓ La bomba peristáltica asociada al Baño 1 se conecta con el canal 0.
- ✓ La bomba peristáltica asociada al Baño 2 se conecta con el canal 1.
- ✓ La bomba peristáltica asociada al Baño 3 se conecta con el canal 2.
- ✓ La bomba peristáltica asociada al Baño 4 se conecta con el canal 3.

Esta asociación entre bombas y canales analógicos disponibles en la tarjeta de adquisición de datos se representa gráficamente en la figura 42, página 5-9.

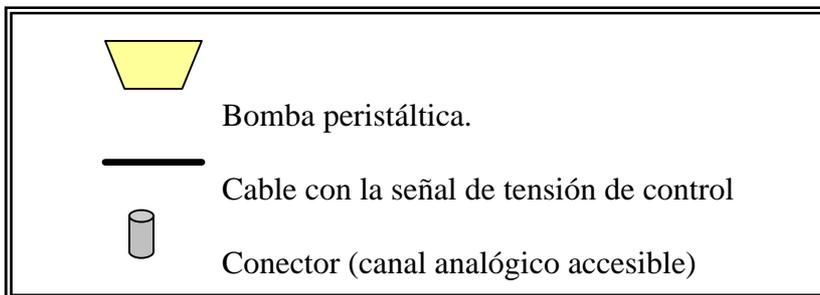
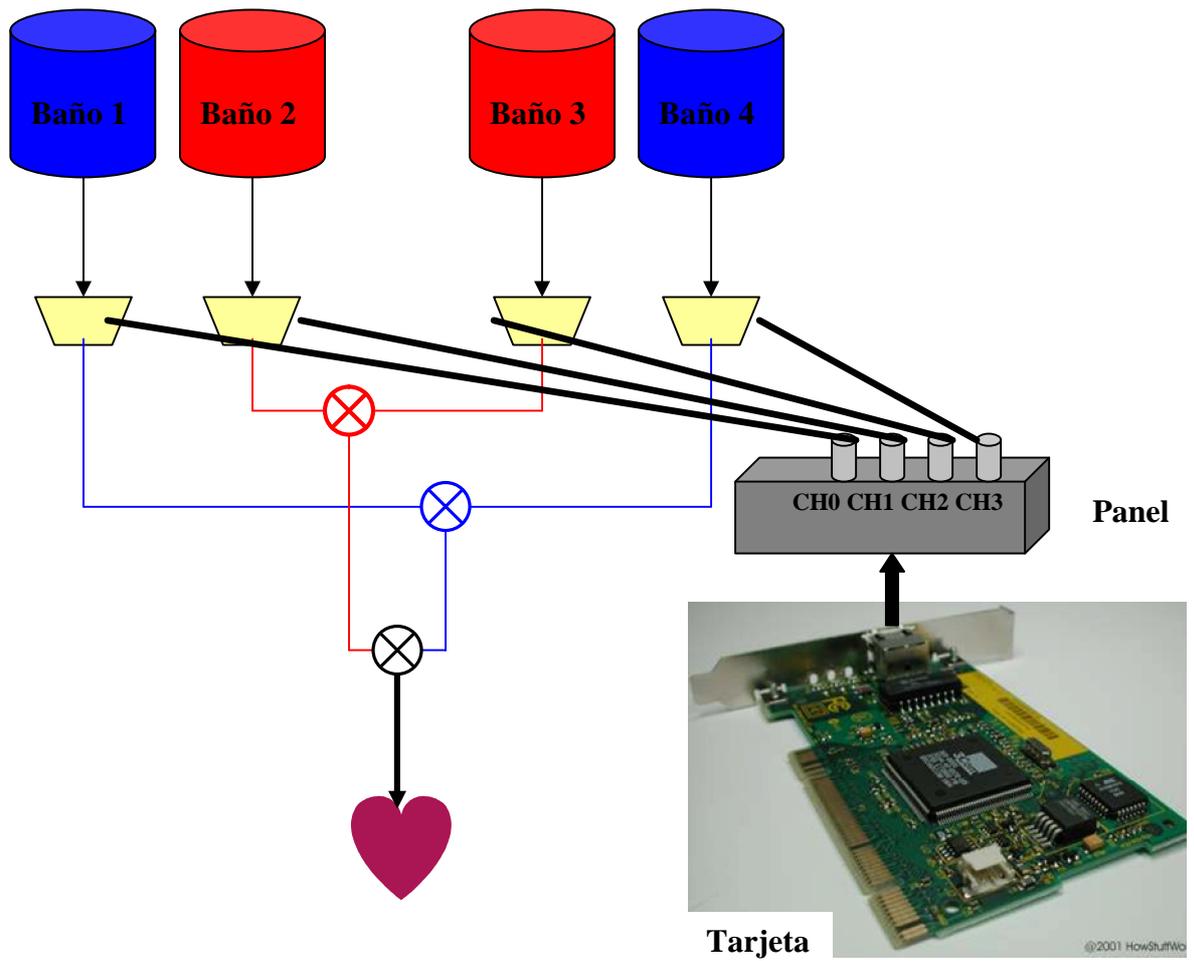


Fig.42 Conexionado entre la tarjeta de adquisici3n de datos instalada en un slot del PC y las bombas peristálticas.

5.1.3.2 Control exclusivo de temperatura.

Recordando el esquema del montaje de 2 bombas, (Fig.10, pág. 3-20), la asociación entre los canales analógicos disponibles en la tarjeta de adquisición de datos y las bombas peristálticas es la siguiente:

- ✓ La bomba peristáltica asociada al Baño 1 (baño frío) se conecta con el canal analógico Channel 0.
- ✓ La bomba peristáltica asociada al Baño 2 (baño caliente) se conecta con el canal analógico Channel 1.

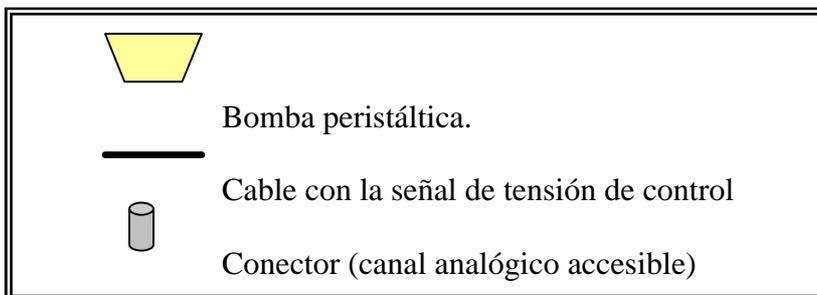
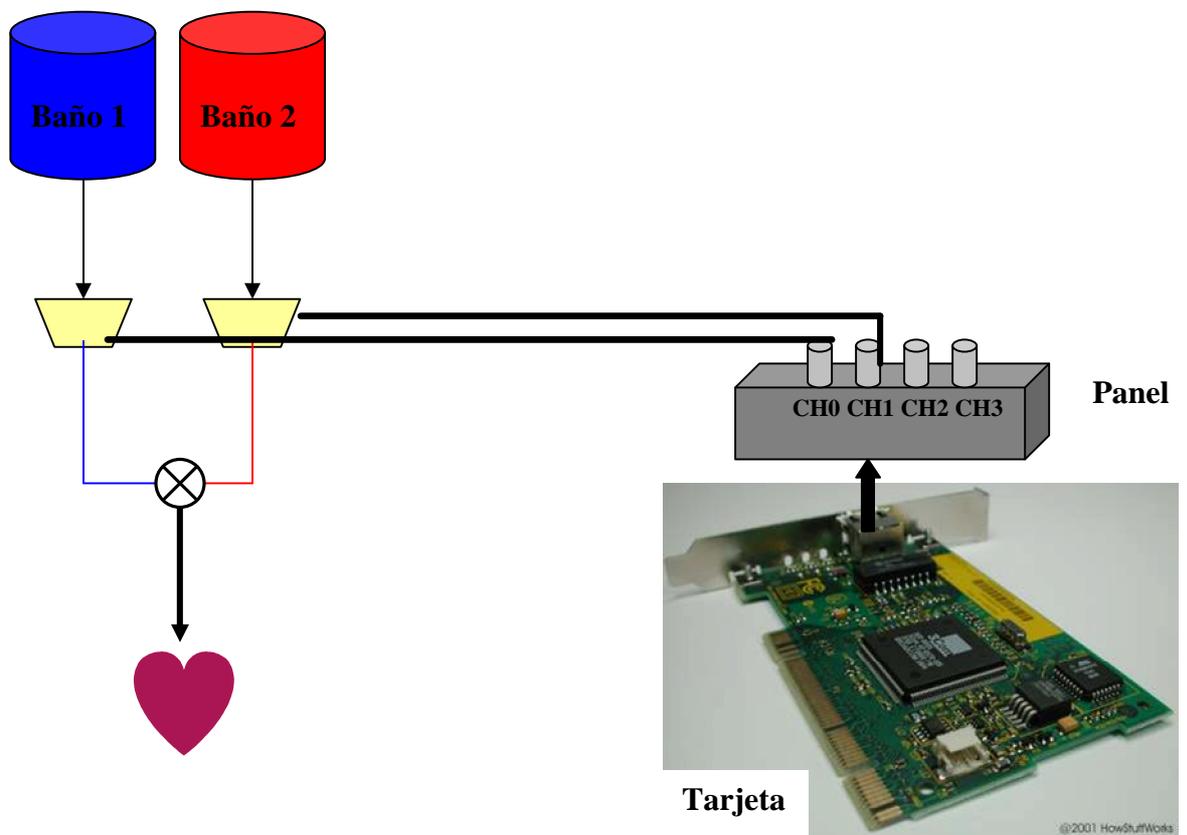


Fig.43 Conexión entre la tarjeta de adquisición de datos instalada en un slot del PC y las bombas peristálticas.

5.1.4 MEDIDAS EXPERIMENTALES DEL CAUDAL.

En la aplicación software desarrollada es necesario conocer la función de transferencia caudal/tensión de las bombas peristálticas, por lo que se realizan medidas experimentales para medir el caudal que proporciona una bomba en función de la tensión que alimenta su entrada de control analógico de flujo.

El objetivo que se persigue es determinar la forma de la función matemática $y = f(x)$, donde la variable x es el caudal, medido en ml/min, que se desea extraer de un baño por su respectiva bomba peristáltica y la variable y es la tensión, medida en voltios, que se debe suministrar a la entrada de control analógico de flujo de esa bomba, para que extraiga de su baño el fluido a esa tasa que marca el caudal.

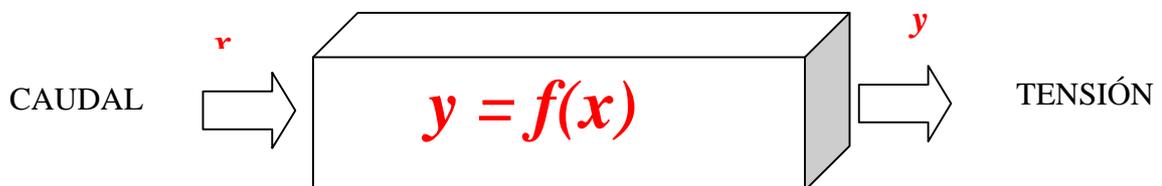


Fig. 44 Esquema conceptual de la Función de Transferencia de la bomba peristáltica.

Sólo se realizarán medidas con una bomba peristáltica, puesto que en el prototipo de la máquina de Langendorff usamos todas las bombas de un mismo modelo comercial. Así es que, salvo error de fábrica, se puede asumir el mismo comportamiento para bombas peristálticas del mismo fabricante y del mismo modelo.

Se realizan las medidas en dos ocasiones, para verificar la fiabilidad de los resultados obtenidos en los experimentos de medición. Se comparan los valores que se obtienen en los dos experimentos y resultan ser prácticamente iguales, lo cual valida los puntos experimentales que se toman como referencia para calcular la función matemática que se ajuste al comportamiento de la bomba.

Deseamos calcular la función matemática que describa la relación entre la velocidad del rotor de la bomba peristáltica y la tensión que alimenta la entrada de control analógico de flujo de la bomba. La velocidad del cabezal de la bomba se traduce en un flujo determinado que se extrae del baño, de modo que cuanto mayor sea su velocidad, mayor será el volumen que se extrae del baño en un mismo intervalo de tiempo.

5.1.4.1 Metodología de la medición de la función de transferencia.

En la aplicación que controla la máquina de Langendorff, antes del Módulo Salida Analógica existe un punto en el que se necesita calcular, a partir de un valor de caudal, qué valor de tensión debe establecerse en el canal analógico que alimenta a la bomba correspondiente, para que su velocidad fuese tal que en un minuto extrayese ese volumen de fluido indicado por el caudal. En las medidas se hace el camino inverso: a partir de ciertos valores de tensión, se medirá el volumen de líquido que una bomba extrae de un baño en un minuto de tiempo.

Se diseña una pequeña aplicación adicional llamada MedidasExperimentales.vee, donde se puede seleccionar un valor de tensión en una entrada simple de datos. Este valor de tensión saldrá por el canal analógico 0 de la tarjeta de adquisición de datos. Una vez seleccionado un voltaje, el canal analógico 0 tomará ese valor y lo mantendrá hasta que se introduzca un nuevo valor en la entrada de datos y se vuelva a ejecutar el programa.

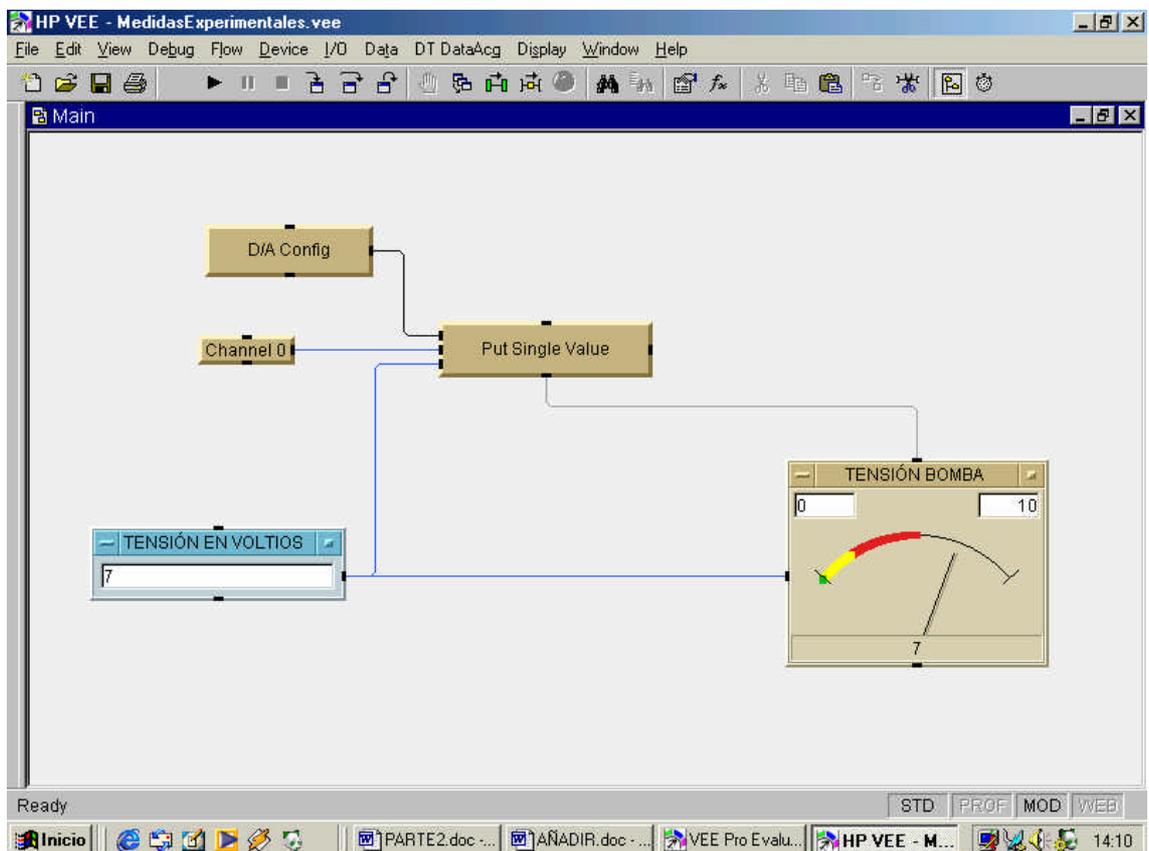


Fig.43 Aplicación empleada en las mediciones de caudal.

Conectamos el canal 0 de la tarjeta de adquisición de datos con una bomba peristáltica cualquiera de las disponibles. Empleando un cable para la conexión, se consigue que la tensión de salida del canal analógico de la tarjeta de adquisición de datos sirva de tensión de control de flujo de la bomba peristáltica.

El tubo de silicona de entrada de flujo de la bomba se sumerge en un baño lleno de fluido. El tubo de silicona de salida de flujo de la bomba se encuentra sellado con los tubos procedentes de las otras bombas peristálticas, por lo que no se encuentra accesible separadamente en el montaje de laboratorio hospitalario. Por este motivo el caudal se tendrá que medir en el final del conducto colector que se encarga de recoger los flujos de todos los tubos de salida de las bombas. Este conducto colector sería el que inyectara la disolución crioprotectora total en el corazón bajo experimento, a través de una cánula de aorta. En lugar de un órgano, en el extremo final de este conducto se coloca un matraz que recoja el líquido que salga.

El resto de las bombas peristálticas del montaje permanecen desconectadas, por tanto aunque medimos el volumen de flujo en el punto en el que se encuentra la disolución total preparada para ser inyectada en el órgano, el único fluido que alcanza ese punto es el que extrae la bomba conectada al canal 0, por lo que la configuración es válida para realizar medidas sobre una única bomba.

Como punto de partida se tiene el dato del fabricante que asegura que las bombas peristálticas tienen un comportamiento muy lineal, donde esta linealidad se refiere al flujo que suministran en función de la tensión de control que reciben. El resultado de las medidas experimentales sorprende por el preciso comportamiento lineal que tienen las bombas, especialmente para tensiones de control de flujo por encima de 1 voltio.

En la máquina de Langendorff usamos como anticongelante polietilenglicol PEG al 30 % y se desprecia la diferencia de densidad que tenga con respecto al agua. Asumimos que no hay una diferencia de viscosidad entre ambos fluidos suficientemente significativa como para hacer el anticongelante se mueva más lentamente a través de los tubos y el resultado neto de la actividad de bombeo de lugar a un volumen de líquido extraído ligeramente menor. Por tanto, los experimentos de medida no necesitan ser realizados independiente para el caso en el que la bomba peristáltica extraiga agua y para el caso en el que la bomba peristáltica extraiga anticongelante.

Para hacer una tanda de medidas se irán fijando varios valores de tensión en MedidasExperimentales.vee para el canal analógico que controla el flujo de la bomba y con la ayuda de un cronómetro, se observará qué volumen del matraz se llena de líquido en el transcurso de un minuto.

Se anotará, para cada valor de tensión fijada en el canal analógico, el volumen de líquido que ha llenado el matraz. Para cada valor de tensión fijada, se consigue un par de valores de tensión y de caudal que denoto (V,F) . A partir de un número significativo de puntos (V,F) , se podrá ajustar la función matemática que describe la función de transferencia caudal / tensión en las bombas peristálticas empleadas.

Empleamos un cronómetro para realizar las medidas. Fijamos un valor de tensión en voltios para el canal 0 en la pequeña aplicación auxiliar MedidasExperimentales.vee y en el momento en que presionamos con el ratón el icono que inicia la ejecución del programa, accionamos el cronómetro para que empiece a contar hasta un minuto.

La ejecución del programa dura escasamente un segundo, pero el nivel de tensión se mantiene constante en el canal analógico a pesar de que la aplicación haya terminado de correr en el ordenador. Mientras transcurre el minuto se tiene tiempo suficiente para modificar el valor de entrada de la aplicación y seleccionar 0 voltios como tensión de salida para el canal 0. Cuando el cronómetro alcanza los 60 segundos, presionamos de nuevo con el ratón el icono que inicia la ejecución del programa. Al salir instantáneamente 0 voltios, la bomba se detiene y podemos medir el volumen de líquido que la bomba peristáltica ha extraído del baño en un minuto.

Esto se repetirá para un número suficiente de valores de tensión para el canal analógico 0, de manera que se disponga de una colección de puntos (V,F), a partir de la cual construir la función matemática que mejor se adapte a la función de transferencia de la bomba.

5.1.4.2 Resultados obtenidos.

Repetimos las medidas dos veces. En ambas ocasiones conectamos una misma bomba peristáltica al canal analógico 0 de la tarjeta de adquisición de datos. El tubo de silicona de entrada de flujo de la bomba lo sumergimos en un baño lleno de anticongelante, a una temperatura de $-15,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los volúmenes de anticongelante que se extraen del baño en cada medida son recogidos en un matraz y gracias a la escala que presentan sus paredes de vidrio, resulta inmediata la lectura.

Estos son los resultados de la primera tanda de medidas. La bomba peristáltica conectada al canal 0 extrae estos volúmenes de anticongelante al ser alimentada por diversos niveles de tensión de control de flujo:

TENSIÓN (voltios)	VOLUMEN (mililitros)	MEDIDO
0	0	
1	10	
2	14	
3	20	
4	25	
5	30	
6	35	
7	40	
8	45	
9	50	
10	55	

Fig.44. Tabla de resultados de la primera medida experimental del caudal.

Estos son los resultados de la segunda tanda de medidas. De nuevo se coloca un matraz que recoge cada uno de los volúmenes de anticongelante que dispensa la bomba para distintos niveles de tensión de control de flujo:

TENSIÓN (voltios)	VOLUMEN (mililitros)	MEDIDO
0	0	
1	10	
2	15	
3	19	
4	25	
5	30	
6	35	
7	41	
8	45	
9	49.5	
10	55	

Fig.45 Tabla de resultados de la segunda medida experimental del caudal.

5.1.4.3 Formulación matemática.

Sabiendo que el resultado esperado para el comportamiento de la bomba debe ser un comportamiento lineal, según sus características de catálogo, y habiendo tomado dos tandas de medidas con resultados muy similares, nos permitimos descartar algunos puntos de cada tanda de medidas y quedarnos con los valores esperados. De modo que la colección de puntos que emplearemos para formular la función de transferencia de la bomba es la que se presenta en la tabla de la figura 46, página 5-16.

La construcción de la función matemática a partir de una colección de puntos podría haber sido una tarea mucho más complicada si no hubiera sido por el fiel comportamiento lineal de las bombas que se ha observado en las medidas. La función matemática podría haberse construido como una recta de mínimos cuadrados o podría obedecer a una expresión genérica de suma de una función exponencial y una recta, en la que ciertos coeficientes de ambas funciones se intentarían calcular a partir de los valores obtenidos en las medidas.

TENSIÓN (voltios)	VOLUMEN (mililitros)	MEDIDO
0	0	
1	10	
2	15	
3	20	
4	25	
5	30	
6	35	
7	40	
8	45	
9	50	
10	55	

Fig.46 Tabla de puntos a partir de los cuales se construye la función de transferencia.

- ✓ Entre 1 voltio y 10 voltios el comportamiento de la bomba es perfectamente lineal, y la función de transferencia caudal/tensión de la bomba es una recta:

$$y = 0.2 \cdot x - 1 \quad \forall x \geq 10$$

siendo y el valor de la tensión en voltios y siendo x el valor del caudal en mililitros por minuto (ml/min).

En el rango de tensiones entre 1 y 10 voltios no se ha tomado un número elevado de valores intermedios de tensión en las medidas, debido a que se observa con pocos puntos que el comportamiento de la bomba es lineal tal y como afirmaban las características de catálogo del modelo comercial de la bomba peristáltica.

- ✓ Sin embargo, no podemos adoptar esa expresión matemática para el comportamiento de la bomba entre 0 y 1 voltio. Supondría que la bomba sin ser alimentada, es decir con una tensión de control de flujo nula, sería capaz de seguir funcionando y proporcionar un volumen de 5 ml en un minuto. Por tanto, entre 0 y 1 voltio forzamos a un cambio de pendiente en la recta.

En ese pequeño rango de tensiones se realiza una aproximación y se ajusta la función de transferencia con la recta resultado de interpolar entre el valor obtenido para 1 voltio ($V=1V$, $F=10ml$) y el obtenido para 0 voltios

($V=0V, F=0ml$). En este rango de tensión, la función de transferencia de la bomba peristáltica es la siguiente:

$$y = 0.1 \cdot x \quad \forall x \leq 10$$

siendo y el valor de la tensión en voltios y siendo x el valor del caudal en mililitros por minuto (ml/min).

- ✓ Se representa gráficamente el caudal que proporciona una bomba peristáltica del montaje, en función de la tensión analógica que la controle. Se distinguen claramente dos tramos rectos con distinta pendiente, para tensiones menores y mayores de 1 voltio. Se marcan con mayor grosor algunos puntos de la gráfica, que representan los resultados obtenidos en las medidas concretas que se han realizado y que han servido en el cálculo de la función matemática.

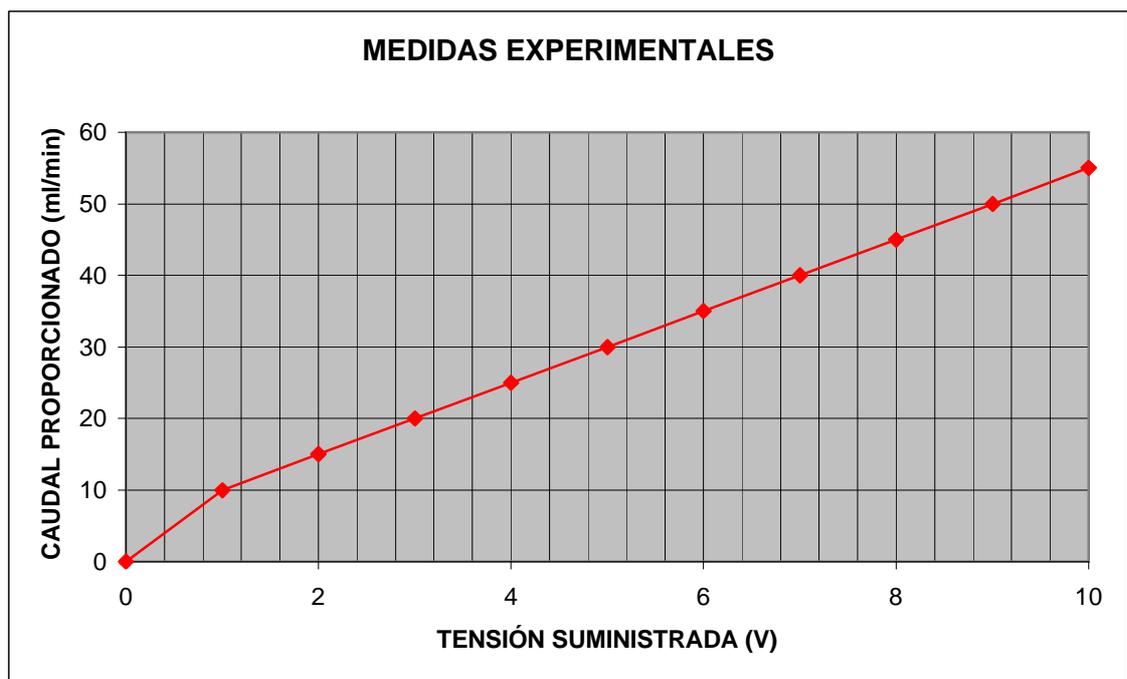


Fig.47 Representación gráfica de los resultados de las medidas experimentales.

- ✓ Finalmente, se presenta la expresión compacta de la función buscada. Esta es la función que da la tensión con la que hay que alimentar una bomba peristáltica, para conseguir un determinado caudal:

$$y = \begin{cases} 0.2 \cdot x - 1 & \forall x \geq 10 \\ 0.1 \cdot x & \forall x \leq 10 \end{cases}$$

siendo y el valor de la tensión en voltios y siendo x el valor del caudal en mililitros por minuto (ml/min).

Además de esta formulación matemática, se dispone de la figura 48, que muestra gráficamente la función de transferencia que se ha obtenido experimentalmente para las bombas peristálticas empleadas en el prototipo de máquina de Langendorff. Es la función inversa de la gráfica representada en la figura 47.

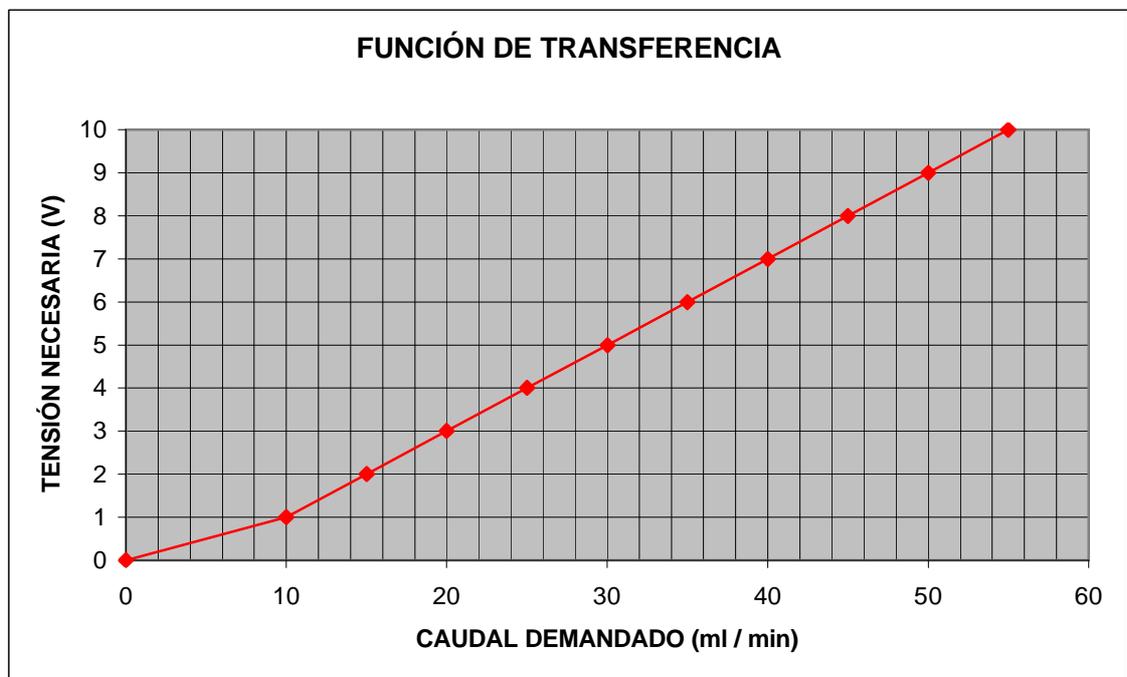


Fig.48 Función de transferencia obtenida experimentalmente.

5.2 SOFTWARE DE LA MÁQUINA DE LANGENDORFF.

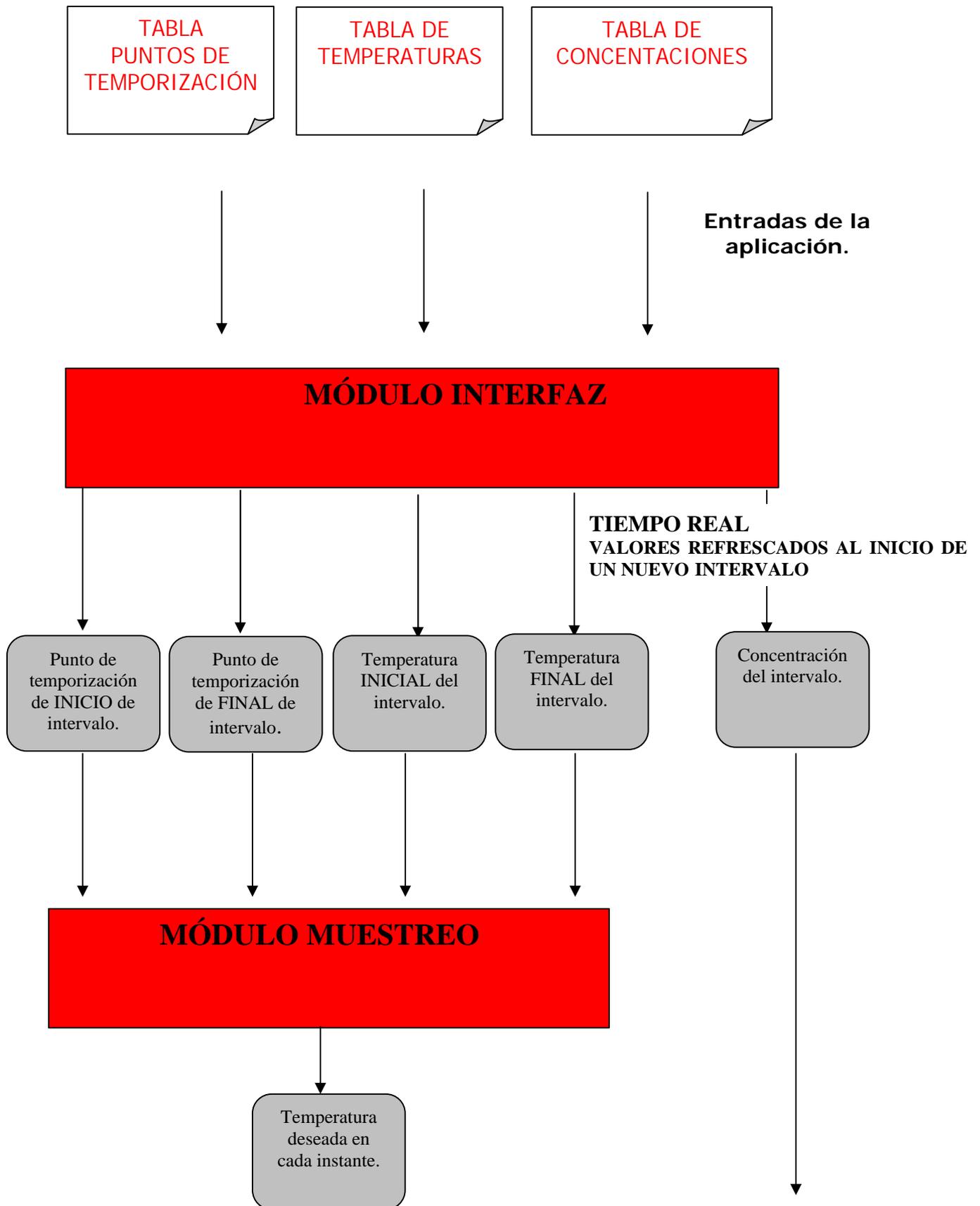
En el prototipo de máquina de Langendorff se consigue el control independiente de la temperatura y la concentración gracias a la aplicación software diseñada, que corre sobre un ordenador en el que se instala la tarjeta de adquisición de datos que controla, con sus cuatro canales analógicos de salida, el flujo que proporcionan las cuatro bombas peristálticas. Estos cuatro flujos mezclados forman la disolución que se inyecta finalmente en el corazón objeto de la criopreservación.

Para organizar el diseño y desarrollo de la aplicación, se ha estructurado el subsistema software en cuatro módulos de programación de menor tamaño, cuya funcionalidad, entradas y salidas se describieron en el capítulo anterior. Estos módulos son los siguientes:

- ✓ Módulo Interfaz.
- ✓ Módulo Muestreo.
- ✓ Módulo Caudal.
- ✓ Módulo Salida Analógica.

Se presenta un esquema global que muestra las entradas que recibe la aplicación, el punto en el que son accesibles los parámetros relativos a las temperaturas de cada baño y el volumen máximo que puede tener la disolución, la interconexión que existe entre los distintos módulos y finalmente las salidas que ofrece la aplicación. (Ver figura 49, páginas 5-20 y 5-21).

A continuación se detalla cómo cada uno de estos módulos está implementado, usando el entorno de programación HP VEE y DT VPI, y se describirán los diagramas de flujo que contienen para conseguir la funcionalidad que presentan cuando se modelan como cajas negras.



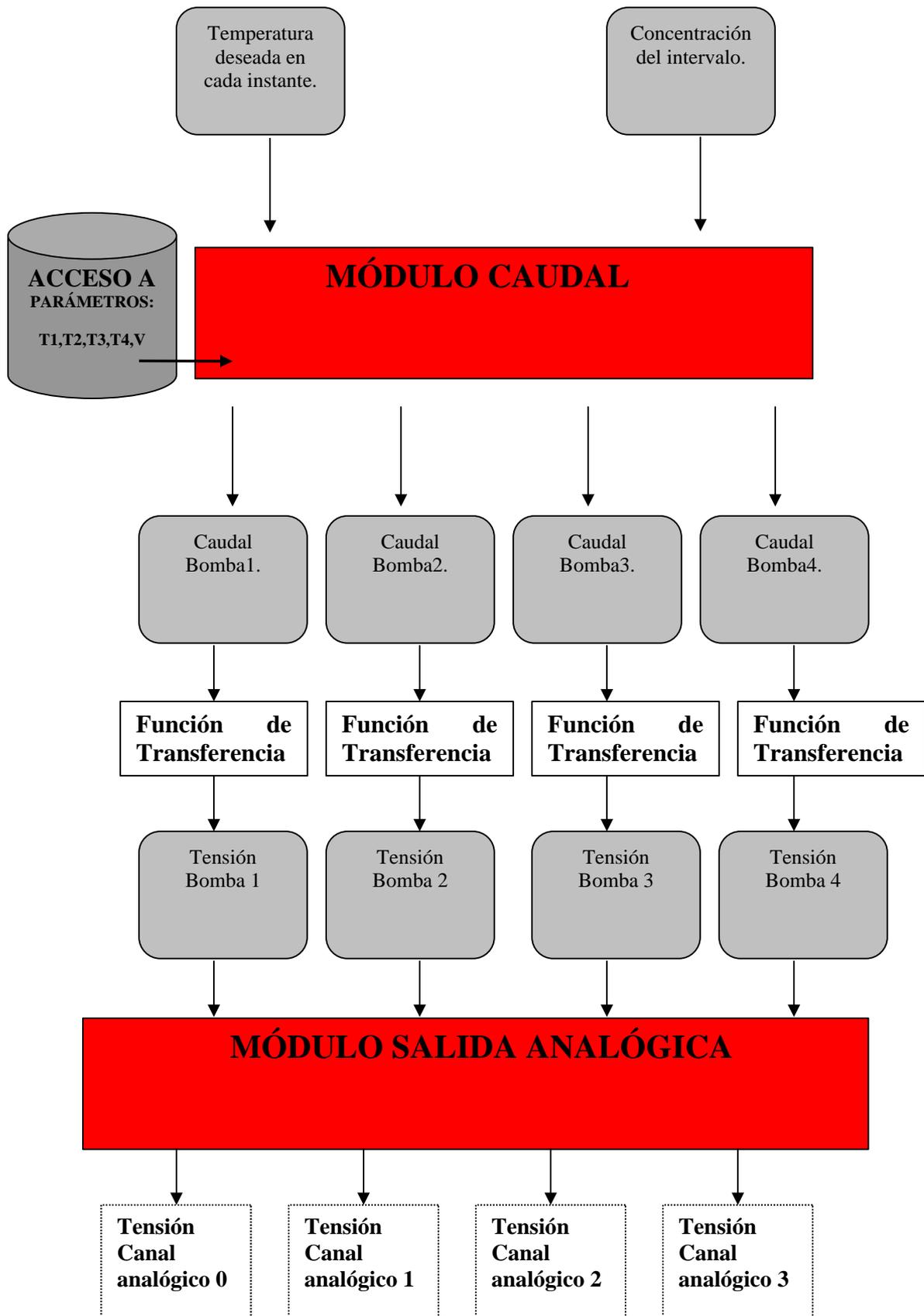


Fig.49 Esquema de la aplicación que controla la máquina de Langendorff.

5.2.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE HP VEE.

En primer lugar es necesario aclarar que la creación de aplicaciones con la herramienta visual HP VEE se realiza conectando objetos mediante líneas de datos en un área de trabajo. La ejecución se realiza de izquierda a derecha en el diagrama de flujo resultante.

- ✓ Cada objeto se caracteriza por realizar una función determinada.
- ✓ Las líneas de datos son entradas o salidas de los pines de los objetos.
- ✓ Un icono tiene los siguientes pines:

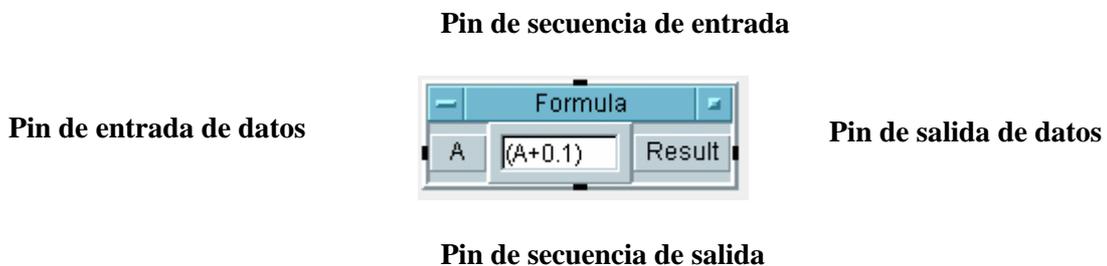


Fig.50 Pines de entrada y salida de un objeto de HP VEE.

Los pines de entrada y salida de datos se conectan para transmitir datos entre los objetos. El uso de los pines de secuencia es opcional, si se conectan imponen un orden en el flujo de la ejecución desde la parte superior del área del trabajo hasta la inferior.

- ✓ Un conjunto de iconos se puede agrupar en un bloque mayor que los oculte, mostrando sólo las entradas y salidas que lo conectan y relacionan con el resto de objetos de la aplicación. Este bloque mayor recibe el nombre de Objeto de Usuario (User Object).

5.2.2 **IMPLEMENTACIÓN DEL MÓDULO INTERFAZ.**

Los objetivos del Módulo Interfaz deben ser cumplir las siguientes funciones:

- ✓ Capturar las entradas de la aplicación.
- ✓ Generar el sincronismo que garantice el funcionamiento de la máquina de Langendorff en tiempo real.
- ✓ Ofrecer a su salida cinco valores de interés relativos a un intervalo del perfil de criopreservación y ofrecerlos justo en el instante en el que comienza el intervalo en tiempo real. Estos valores son:
 - Instante inicial del intervalo.
 - Instante final del intervalo.
 - Temperatura inicial del intervalo.
 - Temperatura final del intervalo.
 - Concentración del intervalo.

A continuación se detallará cómo se han implementado estas tres funciones.

5.2.2.1 **Captura de entradas de usuario.**

Las entradas que tiene el Módulo Interfaz son justamente las entradas que tiene la aplicación completa, ya que el Módulo Interfaz es el primer Módulo que se ejecuta en el diagrama de flujo de la aplicación que controla la máquina de Langendorff.

La aplicación debe recibir como entrada el perfil de criopreservación elegido por el usuario, para hacer que la máquina siga en tiempo real el comportamiento que dicta el perfil en cuanto a la concentración y la temperatura de la disolución que se inyecta en el órgano objeto del enfriamiento criogénico.

Se recuerda la posibilidad de descomponer la duración total del enfriamiento en intervalos de menor duración, que se suceden uno tras otro. Cada intervalo se caracteriza porque tiene un valor de la concentración distinto y que permanece constante en toda la duración del intervalo. Del mismo modo, un intervalo se caracteriza porque la temperatura frente al tiempo sigue el comportamiento de una línea recta de pendiente negativa y distinta a la pendiente que tenía en el intervalo anterior, siendo una recta entre un valor inicial de temperatura y un valor final especificados por el usuario.

Por tanto el perfil de criopreservación se puede ver como un conjunto de intervalos. Cada intervalo está delimitado por un instante inicial y por un instante final, que sirve a su vez de instante inicial para el siguiente intervalo, salvo en el último intervalo, que el instante final da fin a la duración total del experimento. El

comportamiento de la temperatura de la disolución en el intervalo está fijado por una temperatura inicial y una temperatura final, entre las cuales se interpola para conseguir una recta que defina la temperatura para instantes intermedios. La concentración de la disolución en el intervalo se mantiene constante y toma un valor de concentración que asociamos al instante inicial que da comienzo al intervalo, un valor de concentración que debe mantenerse en toda la duración del intervalo.

El usuario introduce este perfil utilizando tres tablas, una donde consigna los puntos de temporización que indican el principio de los intervalos y añade como último elemento de la tabla el instante en el que acaba el experimento, una segunda tabla donde consigna el valor de temperatura asociado a cada uno de los puntos de temporización de la tabla anterior y una tercera tabla donde consigna el valor de la concentración asociado a cada uno de los puntos de temporización de la primera tabla, teniendo esta tabla una entrada menos, ya que el punto de temporización asociado al final del enfriamiento criogénico no tiene concentración asociada, ya que acaba el experimento y ya no tiene sentido mantener el valor de esa concentración en los instantes siguientes.

Por tanto la tabla donde se introducen los instantes de tiempo deseados para introducir cambios en la concentración de la disolución es una tabla de dimensión $n+1$, la tabla donde se consignan los valores de temperatura que debe tener la disolución justo en los anteriores instantes de tiempo especificados sería una tabla de dimensión $n+1$ y finalmente la tabla donde se especifica la concentración asociada a cada instante inicial de un intervalo tendrá dimensión n . A continuación se concretan las unidades en las que el usuario debe introducir sus datos en las tres tablas.

✓ Unidades empleadas en las tablas de entrada de datos:

- Primera tabla: Los puntos de temporización usan como unidad el minuto.
- Segunda tabla: Las temperaturas usan como unidad el grado centígrado.
- Tercera tabla: Las concentraciones son adimensionales, expresándose como el volumen del anticongelante partido por el volumen de la disolución total, formada por agua y anticongelante.

En la figura 51 de la página 5-25 se muestra un ejemplo de perfil de criopreservación que el usuario pudiera desear practicar sobre el órgano a criopreservar, y en la figura 52 de la misma página, se muestra cómo debería el usuario rellenar las tres tablas de datos que la aplicación le ofrece como entradas para que pueda especificar el perfil de criopreservación que desea.



Fig. 51 Ejemplo de perfil de criopreservación deseado.

TIEMPO n+1 (minutos)	
0000:	0
0001:	1
0002:	3
0003:	10
0004:	14
0005:	30

TEMPERATURAS n+1	
0000:	4
0001:	3.5
0002:	2.5
0003:	1
0004:	-1
0005:	-4

CONCENTRACION n	
0000:	0.1
0001:	0.25
0002:	0.5
0003:	0.75
0004:	0.9

Fig.52. Tablas que consignan en la aplicación el perfil deseado de la figura 51.

error, deteniendo automáticamente la ejecución de la aplicación si se intentase acceder a una tabla con un índice mayor del posible según su tamaño. Para ello utilizamos un icono de tipo Get Values, que recibe como entrada de datos la tabla con los valores de concentración y dispone de una salida en la que escribe el número de elementos que tiene, salida en la cual se coloca un indicador alfanumérico que renombramos como NumElementTabla, para visualizar el número de elementos.

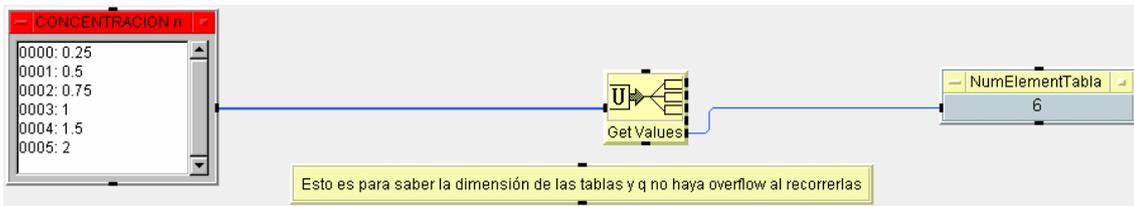


Fig. 54 Determinación del tamaño de las tablas.

5.2.2.2 Generación del sincronismo.

La base para sincronizar el funcionamiento total de la aplicación en tiempo real es el uso de un icono de tipo For Count. Este objeto activa su pin de salida de datos el número de veces que se le especifique. Se configura con un valor máximo N y al igual que un contador digital hardware, se incrementa de 1 en 1, comenzando su cuenta en 0 y se detiene al alcanzar el valor N-1. Cada vez que se incrementa su valor, activa su pin de salida de datos. Este objeto se puede emplear para ejecutar un subhilo durante un número especificado de iteraciones. La salida del icono se puede usar como valor para lanzar el funcionamiento de los objetos que componen el subhilo. En el icono For Count se introduce un valor entero que es el número de iteraciones que se desean para el subhilo.

Conociendo la funcionalidad del icono For Count, se orienta su uso a la funcionalidad que deseamos para la aplicación. Se quiere tener a la salida del Módulo Interfaz los valores de instante inicial y final de un intervalo, temperatura inicial y final de un intervalo y concentración de un intervalo, cada vez que se inicie un intervalo. A partir del instante en el que el Módulo Interfaz saque esos valores por sus salidas de datos, se desea el oportuno procesamiento del Módulo Muestreo, del Módulo Caudal y del Módulo Salida Analógica, de modo que estos cinco valores sirvan de fuente para una serie de acciones que resulten en unas tensiones analógicas de control del flujo de las bombas y por tanto en una suma de caudales que cumplan el comportamiento esperado para la disolución durante el tiempo de duración del intervalo.

Por tanto cada vez que el Módulo Interfaz saque los datos correspondientes a un intervalo, se desean una serie de acciones que constituyen el resto del diseño de la aplicación y que se pueden englobar conceptualmente en un subhilo. Se desean tantas iteraciones de este subhilo como intervalos haya, para que se construya la recta de temperaturas correspondiente y se generen los caudales pertinentes en cada uno de los intervalos que constituyen la duración total del enfriamiento criogénico.

Por tanto se tiene que programar el icono For Count con el número de intervalos que haya, incrementado en una unidad, ya que cuando el For Count llegue a su cuenta máxima se detiene y por tanto no le da tiempo a generar otra iteración del subhilo.

5.2.2.2.1 Detección de la llegada del instante inicial de un intervalo.

La detección de la llegada en tiempo real del instante inicial de un intervalo se realiza gracias a la utilización de un icono de tipo If/Then/Else que utilizamos como comparador, con la condición $A \leq B$. En su entrada B conecta la salida de For Count, que muestra el valor hasta el que ya se ha incrementado y en su entrada A conecta una tabla que sirve de artificio para conseguir el comportamiento deseado del sistema.

Si se conecta directamente el icono For Count con el subhilo que lanza, sin usar el pequeño montaje del comparador que se explicará a continuación, el contador se incrementa a gran velocidad y por cada incremento, se realiza una iteración del hilo, lo cual no se correspondería con un funcionamiento en tiempo real, ya que se debe lanzar un subhilo cada vez que llegue en tiempo real el instante inicial de un intervalo, para que las salidas analógicas de los canales se correspondan con los valores de temperatura y concentración que se desean en esos instantes. Si se conecta directamente el icono For Count con el subhilo, la ejecución de la aplicación podría durar escasos segundos debida a la alta velocidad de autoincremento del contador.

5.2.2.2.2 Artificio para disminuir la velocidad de autoincremento de For Count.

Entonces se genera un artificio que relentice la velocidad de autoincremento del objeto For Count, basado en un comparador y otra tabla. Esta tabla auxiliar se caracteriza porque sus elementos siguen una progresión aritmética de razón 1, progresión que comienza en 1 y termina en un número igual al número de puntos de temporización contenidos en la tabla de entrada de tiempo del usuario. Esta progresión se genera con un icono de tipo ramp(numElem, start, stop).

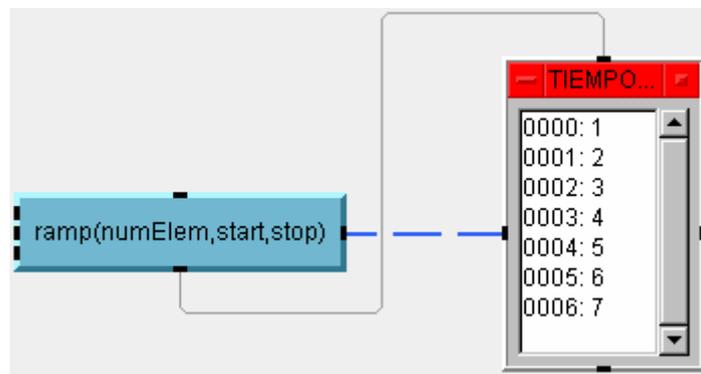


Fig.55 Creación de una tabla auxiliar que contiene progresión aritmética.

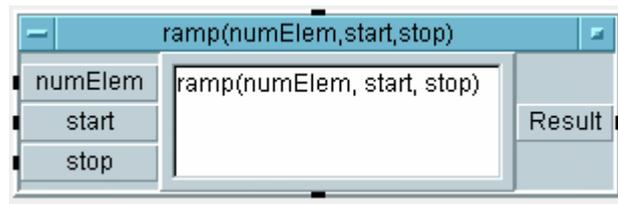


Fig.56 Entradas y salidas del objeto Ramp.

Este objeto, en primer lugar construye una recta entre el valor start y el valor stop, y después la muestrea y presenta en su salida un número de puntos muestreados igual al que le indique la entrada numElem. El objeto, teniendo en cuenta el número de puntos que se le ha especificado que debe extraer del muestreo, equiespacia los valores que toma de la recta de modo que resulten tantos puntos muestreados como se deseaba.

Este objeto se conecta con su entrada start un icono de tipo Real que contiene el valor 1. Como el indicador alfanumérico NumElementTabla contiene el número de elementos de la tabla de concentraciones, se hace pasar por un icono Fórmula que lo incrementa en una unidad para tener el número de elementos que tienen las tablas de tiempos y temperaturas. Este valor, que siempre será un número entero, se conecta con la entrada stop y con numElem.

De este modo, se le demanda al objeto ramp que construya una recta que siempre comienza en 1 y termina siempre en un valor entero. Al pedirle ese mismo número entero como número de puntos equiespaciados en el muestreo, se garantiza que todos los puntos que se extraen del muestreo son número enteros y que forman exactamente la progresión aritmética deseada.

La tabla se recorrerá sucesivamente gracias a un User Object llamado “Recorre Matriz Steps”, que accederá cada vez a un elemento hasta recorrerla por completo. El elemento al que accede se muestra en un indicador alfanumérico que se renombra como “Próximo intervalo a detectar”.

5.2.2.2.3 Utilidad del comparador.

A continuación se explica la utilidad de haber incluido un objeto de tipo If/Then/Else en la aplicación. Este icono recibe dos entradas A y B, establece una condición concerniente al valor de las entradas y en caso de que se cumpla la condición, activa el pin de salida Then y en el caso de que no se cumpla, activa el pin de salida Else.

En la entrada B del bloque If/Then/Else tenemos un indicador alfanumérico que se renombra “CLK”, que muestra en todo momento hasta qué número se ha incrementado el icono For Count. En la entrada A tenemos el indicador “Próximo intervalo a detectar”, que recoge cada vez un valor de la tabla auxiliar en la que los elementos siguen una progresión aritmética de razón 1, comenzando en 1 y terminando en un número igual al número de puntos de temporización. La condición especificada en el objeto If/Then/Else es $A \leq B$.

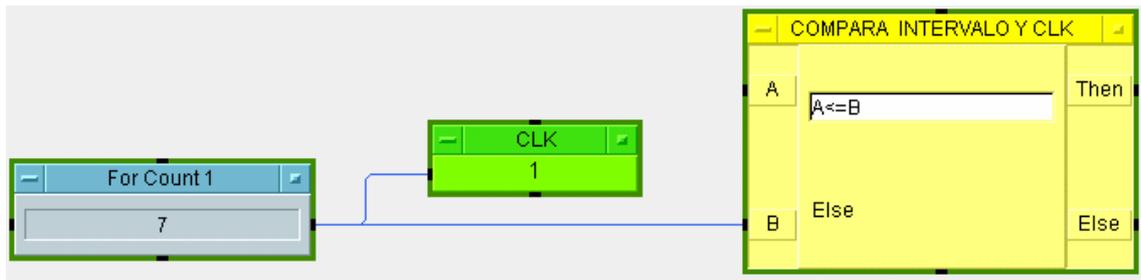


Fig.57 Objeto If/Then/Else con una de sus entradas y la condición que impone.

El primer punto de temporización del perfil es el instante $t = 0$.

Comienza la ejecución del programa y el bloque “Recorre Matriz Steps” accede al primer elemento de la tabla auxiliar, por lo que “Próximo intervalo a detectar” muestra el valor 1. Al comenzar la ejecución, el icono For Count también ha comenzado su cuenta y se pone a 1, al darse la condición de $A \leq B$, se activa el pin de salida Then del comparador y se acaba de lanzar una iteración del subhilo.

En esta iteración el primer paso es que instantáneamente se actualizan los valores de salida del Módulo Interfaz: instante inicial y final del intervalo, temperatura inicial y final del intervalo y concentración del intervalo. A partir de que el módulo proporcione sus salidas, el Módulo Muestreo, el Módulo Caudal y el Módulo Salida Analógica tendrán que realizar su procesamiento sobre los nuevos valores lanzados sobre el intervalo que acaba de comenzar.

Hasta que estos Módulos no acaben todo su procesamiento, no se devuelve el hilo de control. El procesamiento en el Módulo Interfaz, en el Módulo Caudal y en el Módulo Salida Analógica es instantáneo, gracias a la vertiginosa velocidad de HP VEE operando y tratando datos. El Módulo Muestreo es el encargado de alargar la duración del subhilo a la duración real del intervalo. El Módulo Muestreo genera un reloj local, por lo que desde el momento en que se activa, tiene control de la duración en tiempo real del intervalo y hará que su procesamiento se extienda en el tiempo hasta durar justamente lo que indica la diferencia del instante inicial y final del nuevo intervalo que ha lanzado el subhilo.

Al terminar el Módulo Muestreo con su última iteración local, queda el procesamiento posterior del Módulo Caudal y del Módulo Salida Analógica sobre los últimos datos de salida del Módulo Caudal para ese intervalo, ya que estos dos bloques se encuentran en cascada tras él. Este procesamiento es instantáneo porque no hay diseñados bucles iterativos en esos módulos y tan sólo existen diagramas de flujo lineales que operan sobre los datos y los dejan pasar directamente. Este procesado sobre el último dato del intervalo requiere un tiempo imperceptible y devuelve de nuevo el control del programa al icono For Count del Módulo Interfaz. Como el Módulo Interfaz tiene un procesamiento prácticamente instantáneo, los valores correspondientes a un nuevo intervalo se refrescan a la salida del Módulo Interfaz en tiempo real. De nuevo es el Módulo Muestreo el encargado de extender la duración del procesamiento un tiempo igual al de la duración del intervalo. Así es cómo el Módulo Interfaz garantiza que el sistema esté sincronizado, aunque es imprescindible que el Módulo Muestreo garantice la medida del tiempo de duración de un intervalo.

Cuando se activó la salida Then, sirvió de señal de control al bloque “Recorre Matriz Steps”, que procedió a acceder al siguiente elemento de la tabla, extrayendo en este caso un 2 y por tanto actualiza la entrada A del comparador, “Próximo intervalo a detectar”. Cuando se devuelve el control del programa al Módulo Interfaz, el icono For Count se vuelve a incrementar y toma el valor 2. Se encuentra que la entrada A del comparador ya se encuentra actualizada, por lo que se vuelve a cumplir la condición del icono que las compara, se activa la salida Then y se lanza una nueva iteración del subhilo.

La señal Then sirve de señal de control para que se actualicen los valores de salida del Módulo Interfaz correspondientes al intervalo que sigue al anterior y comienza de nuevo el procesamiento en cascada del resto de Módulos. De nuevo el Módulo Caudal, gracias a su generación de reloj local, consigue con unos bucles iterativos extender la duración de la ejecución del subhilo un tiempo real igual al especificado como duración del intervalo.

De la misma manera la señal Then sirvió de control al bloque “Recorre Matriz Steps”, por lo que se accedió al siguiente elemento de la tabla auxiliar, que en este caso es un 3. Cuando el Módulo Interfaz recupere el control del programa, el icono For Count de nuevo sólo podrá incrementarse en una unidad, porque se encontrará que vuelve a cumplirse la condición de igualdad $A = B$ y que se lanza una nueva iteración del subhilo.

Este proceso termina cuando en el siguiente intento de autoincremento de For Count se actualiza a su último valor programado, que coincide exactamente con el número de puntos de temporización del intervalo. El contador deja de contar y la aplicación se detiene y acaba. En este punto, ya se han realizado las acciones pertinentes para cada uno de los intervalos y For Count llega al instante que marca el final de la duración del enfriamiento criogénico.

Una vez que el icono For Count se incrementa en una unidad al recuperar el control del flujo del programa y se vuelve a cumplir la condición de igualdad, gracias a la vertiginosa velocidad de procesamiento de HP VEE, instantáneamente aparecen en la salida del Módulo Interfaz los valores de Instante Inicial del intervalo, Instante Final del intervalo, Temperatura Inicial del Intervalo, Temperatura Final del Intervalo y Concentración.

La idea que resume esta implementación es que hasta que no se realiza todo el procesamiento necesario de un intervalo, no se devuelve el control del flujo al inicio del programa y no se vuelve a incrementar el contador, para que así los lanzamientos de las iteraciones del subhilo estén sincronizados con los comienzos de los intervalos en tiempo real.

5.2.2.2.4 Objeto de Usuario “Recorre Matriz Steps”.

El bloque “Recorre Matriz Steps” es de fundamental comprensión, porque su diseño se repite en otros cuatro bloques funcionales del Módulo Interfaz. Inicialmente se ha implementado interconectando varios iconos con líneas de datos, y después se ha

optado por agrupar todos los iconos en un Objeto de Usuario y se ha elegido el nombre “Recorre Matriz Steps”.

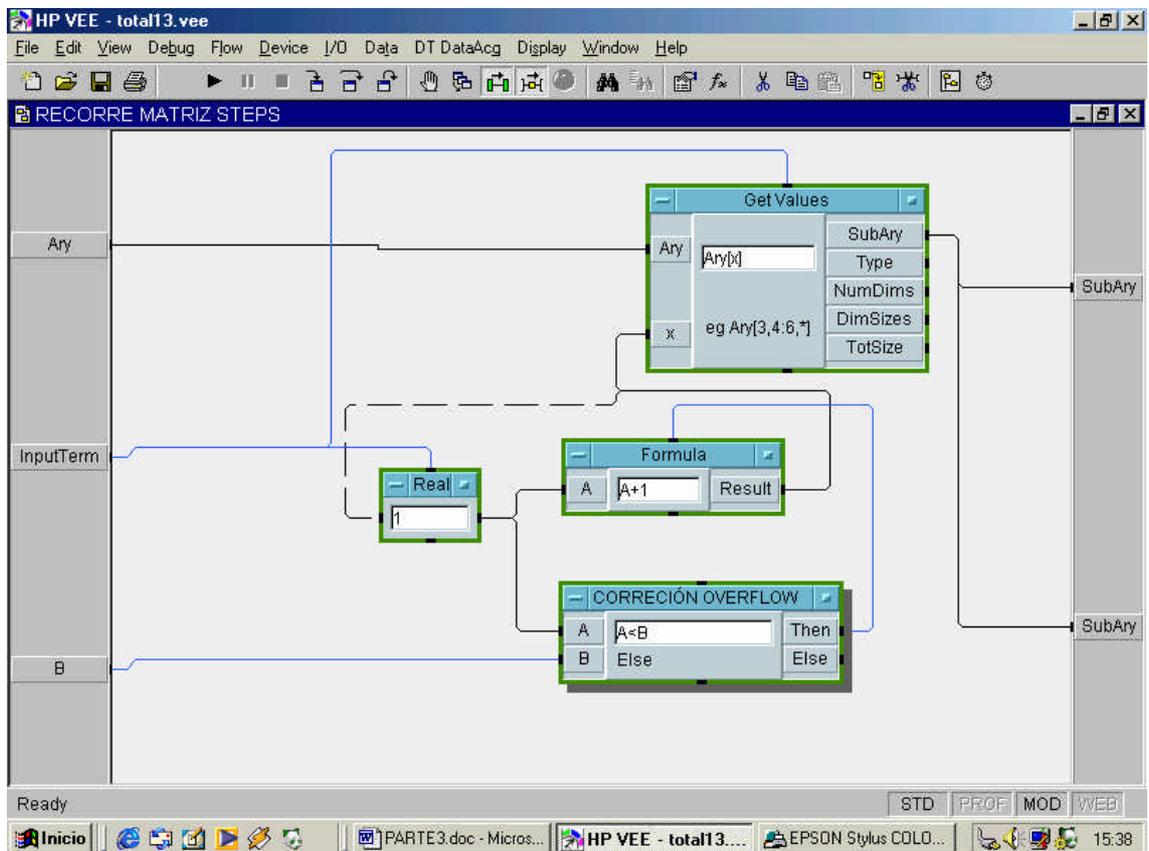


Fig.58 Objeto de Usuario “Recorre Matriz Steps”.

Está basado en uno de los objetos que ofrece nuestra herramienta software llamado Get_Value, que tiene como entradas la tabla auxiliar que contiene la progresión aritmética y un índice, x. El icono ofrece a su salida el elemento de la tabla correspondiente a dicho índice, que se mostrará en un display llamado “Próximo intervalo a detectar”. Este bloque servirá por tanto para recorrer esta tabla, a medida que el índice que señala al elemento vaya variando. El bloque “Recorre Matriz Steps” además incluye una variable de tipo Real cuyo valor por defecto se determina -1 , accediendo a las propiedades del icono. Esta variable Real pasa por el icono Fórmula, donde se incrementa el número real en una unidad.

La salida de Fórmula, por un lado realimenta la entrada de la variable de tipo Real, para que actualice su valor. Por otro lado, es el índice de entrada a Get_Value, por eso se fija ese valor por defecto de la variable Real, para que en primer lugar se acceda al elemento 0 de la tabla y no se acceda por error al segundo, ya que las tablas de tamaño n, numeran sus elementos usando los índices desde el 0 al n-1.

El primer valor que aparece por tanto en el indicador “Próximo intervalo a detectar” es el primer valor de la progresión, 1. Cuando se inicia la ejecución del

programa, For Count empezará desde cero a contar, y cuando se incrementa en una unidad, ya alcanza el valor almacenado en el indicador “Próximo intervalo a detectar”. El comparador activará su salida Then porque se cumple la condición de comparación.

Al activarse la salida Then del comparador, ésta es entrada del bloque “Recorre Matriz Steps”, que sirve de señal de control de la variable Real y de Get_Value. Entonces, la variable de tipo Real actualiza su contenido con el valor de la señal que le realimentaba desde la salida de la Fórmula, que es justamente el valor del índice del último elemento accedido. Real se ha actualizado, pasa por la Fórmula y se incrementa en un valor más, dando ahora el valor del índice del siguiente elemento al que hay que acceder. Como también se activa la entrada de control de Get_Value, el bloque realiza una nueva operación, sacando a su salida el siguiente elemento de la tabla de tiempo auxiliar, por lo que se actualiza el instante del indicador “Próximo intervalo a detectar”, preparándose el Módulo Interfaz para la detección de la llegada del siguiente intervalo. De nuevo, cuando CLK alcance este valor, se dará la condición del comparador y se activará THEN, repitiendo así sucesivamente la actualización del índice del elemento a leer y la salida del valor al indicador “Próximo intervalo a detectar”, así se implementará el proceso de detección los instantes iniciales de todos los intervalos del proceso criogénico.

También añadimos el bloque “Corrección Overflow” dentro de “Recorre Matriz Steps”, que compara la variable NumElementTabla con el valor de la variable de tipo Real, para que el índice con el que Get_Value accede a la tabla de tiempos no salga de rango y haga una operación no válida intentando acceder a elementos que no existen porque ya se ha accedido a todos los existentes.

Se impone la condición $Real < (NumElementTabla)$. Al cumplirse la condición, la salida del comparador activa la señal de control de la Formula, por lo que activa el funcionamiento de ese bloque, y cuando deje de cumplirse, no activará la señal de control por lo que Formula no funcionará más y no se volverá a incrementar el índice de Get_Value.

5.2.2.3 Actualización de valores de salida.

Cada vez que se activa el pin Then del icono If/Then/Else, se lanza una nueva iteración del subhilo. Esto supone el comienzo de un nuevo intervalo, por lo que las salidas del Módulo Interfaz deben actualizarse. Estos valores de salida son:

- ✓ Instante inicial del intervalo.
- ✓ Instante final del intervalo.
- ✓ Temperatura inicial del intervalo.
- ✓ Temperatura final del intervalo.

✓ Concentración del intervalo.

Estos valores se consiguen actualizar en la salida del Módulo Intefaz, gracias a que el pin Then sirve de pin de control de los User Objects “Recorre Matriz Tiempo” y “Recorre Temperaturas y Concentración”.

Cuando se inicia la ejecución del programa, el icono For Count del Módulo Interfaz empezará desde cero a contar, y cuando alcance el valor almacenado en el indicador “Próximo intervalo a detectar”, el comparador activará su salida THEN porque se cumple la condición de comparación. Esta señal THEN sirve de entrada al bloque de “Recorre Matriz Steps”, que actualiza el valor del indicador con el siguiente punto de la tabla auxiliar, así sucesivamente hasta que se llegue al final del proceso.

THEN también sirve de entrada a los bloques “Recorre Matriz Tiempo” y “Recorre Temperaturas y Concentración”, que tienen el mismo funcionamiento que “Recorre Matriz Steps”, en cada iteración van actualizando el valor de su salida, recorriendo sucesivamente las tablas de tiempo en minutos y las tablas de temperatura y concentraciones respectivamente.

5.2.2.3.1 Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo”.

El bloque “Recorre Matriz Tiempo” se activa cada vez que se detecta el instante de inicio de un nuevo intervalo, y activa a su vez los dos bloques que engloba: “Recorre Matriz Tiempo inicial” y “Recorre Matriz Tiempo final”. Cada uno de estos pequeños bloques, respectivamente mostrará en minutos el punto de temporización que sirve de instante inicial del intervalo que acaba de comenzar y el punto de temporización, en el que se espera que termine el intervalo que acaba de comenzar. De modo que a la salida del bloque “Recorre Matriz Tiempo” se dispone de dos indicadores alfanuméricos, “Instante Inicial Intervalo” y “Instante Final Intervalo”, que se actualizan con el valor de los instantes de tiempo que delimitan el nuevo intervalo que ha comenzado.

Entre ambos puntos podemos definir un **intervalo** en el que la concentración se mantendrá constante y la temperatura será el resultado de interpolar entre las temperaturas asociadas a esos dos instantes significativos.

Estas salidas del bloque “Recorre Matriz Tiempo” serán de gran utilidad para el siguiente Módulo Muestreo, que necesita conocer la duración del intervalo, para construir la recta que interpola las temperaturas asociadas a esos dos instantes de tiempo.

5.2.2.3.1.1 Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo inicial”.

Es un bloque idéntico a “Recorre Matriz Steps”: contiene un icono Get_Value, una variable de tipo Real, un objeto Fórmula y un comparador para la corrección del overflow.

Este comparador es una simple redundancia del mecanismo de seguridad, porque controlando el error de desbordamiento en “Recorre Matriz Steps”, el problema está

solucionado. “Recorre Matriz Steps” es el bloque que proporciona valores que activan el Comparador, y éste a su vez es el que activa a “Recorre Matriz Tiempo”, con lo cual el mecanismo inicial de control de overflow en el bloque “Recorre Matriz Steps”, hace que éste ya no se active más y por tanto no se produzcan más operaciones en los bloques sucesivos que dependen de sus salidas.

Cada vez que se produce una igualdad entre “Próximo intervalo a detectar” y “CLK” (display del contador ForCount 1, que genera el sincronismo del sistema), el comparador activa la salida THEN, que entre otros Objetos de Usuario, activa éste también. Se activan el icono Get_Value y la variable Real de “Recorre Matriz Tiempo inicial”. Cuando se produce la última igualdad entre “Próximo intervalo a detectar” y “CLK”, es porque se ha llegado a detectar el punto de temporización que indica final de enfriamiento, y entonces aunque se activa la señal THEN, no tiene efecto porque en el Módulo Interfaz For Count se detiene, deteniendo así la ejecución del programa. Por tanto el bloque “Recorre Matriz Tiempo inicial” saca todos los valores de la tabla de tiempos, salvo el último, que es justo lo que queremos, puesto que el último punto de temporización, por coincidir con el fin del enfriamiento, no es el instante inicial de ningún intervalo del perfil de criogenización.

5.2.2.3.1.2 Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo final”.

“Recorre Matriz Tiempo final” es un bloque idéntico a “Recorre Matriz Steps”, con un bloque Get_Value, una variable de tipo Real, un bloque Fórmula y un comparador para la corrección del overflow (desbordamiento), con la salvedad de que la variable Real fija su valor por defecto a 0, para que se acceda por primera vez al elemento de índice 1 de la tabla de tiempo en minutos, ya que el primer punto de la tabla no interesa, porque no va a ser el instante final de ningún intervalo.

Al tener el índice un número mayor que el del bloque “Recorre Matriz Tiempo inicial”, cuando se detecta el punto de temporización n , sincronamente el bloque “Recorre Matriz Tiempo inicial” muestra como instante inicial de intervalo el punto de temporización n y el bloque “Recorre Matriz Tiempo final” muestra como instante final del intervalo el punto de temporización $n+1$. Así queda delimitado el intervalo n .

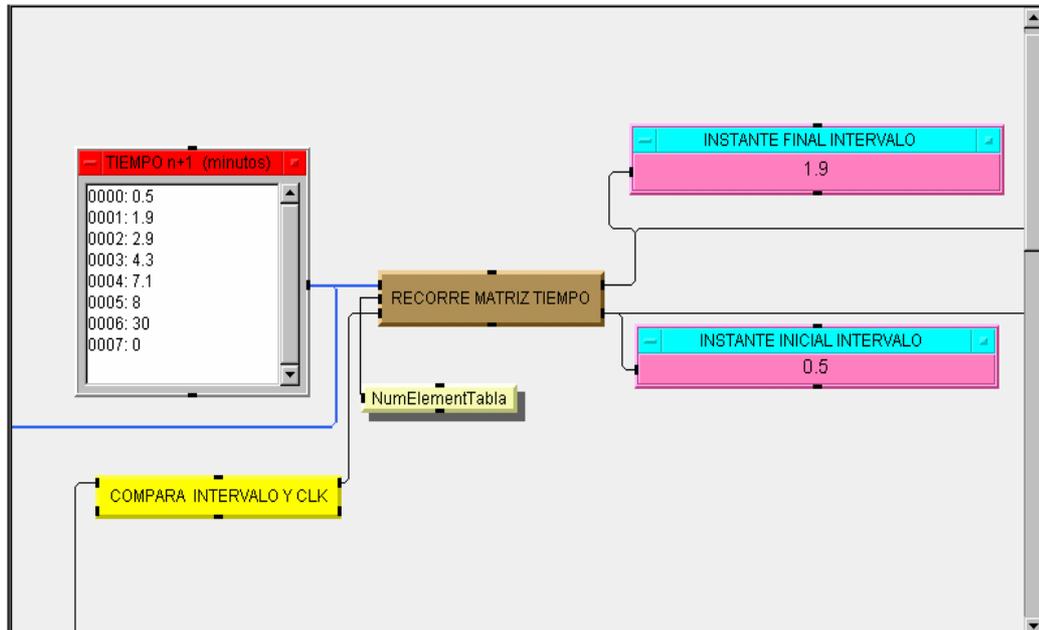


Fig.59. Objeto de Usuario “Recorre Matriz Tiempo”.

5.2.2.3.2 Objeto de Usuario “Recorre Temperaturas y Concentración”.

El Objeto de Usuario “Recorre Temperaturas y Concentración” engloba a su vez tres Objetos de Usuario llamados “Recorre Concentración”, “Recorre Temperaturas (i)” y “Recorre Temperaturas (i)”.

5.2.2.3.2.1 Objetos “Recorre Concentración” y “Recorre Temperaturas(i).”

Los bloques llamados “Recorre Concentración” y “Recorre Temperaturas (i)” tienen igual arquitectura y ambos reciben THEN como entrada de control.

La diferencia es que “Recorre Concentración” tiene como entrada de datos la Tabla de Concentraciones, y al llegar el punto de temporización n , saca al display de su salida la concentración asociada al intervalo que acaba de comenzar (intervalo entre los instantes n y $n+1$). Esta concentración será entrada del Módulo Caudal.

“Recorre Temperaturas (i)” tiene como entrada de datos la tabla de Temperaturas. Al llegar el punto de temporización n , saca a su salida la temperatura n asociada a ese instante, que será entrada del Módulo Muestreo.

5.2.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MÓDULO MUESTREO.

La duración total del perfil de criopreservación puede descomponerse en una serie de intervalos temporales contiguos, cada uno caracterizado por una concentración constante y por un comportamiento lineal de la temperatura, entre un valor inicial y uno final. Los intervalos se diferencian entre sí porque tienen distinto valor de la concentración y distinta velocidad de enfriamiento (o en otras palabras, distinta pendiente para la recta que representa la temperatura frente al tiempo que dura el intervalo). Los intervalos se delimitan por un instante inicial y un instante final, llamados puntos de temporización. El punto de temporización final de un intervalo sirve de punto de temporización inicial del siguiente.

En el Módulo Muestreo se consigue una visión simplificada del perfil de criopreservación porque no se ve el comportamiento deseado para la disolución en la duración total del experimento, sino que se tiene una versión reducida del problema, ya que aísla un intervalo del intervalo anterior y del posterior.

El el Módulo Muestreo sólo se trabaja con el intervalo en el que se encuentra el experimento en tiempo real. Se representa su velocidad concreta de enfriamiento mediante la recta de temperaturas que se construye entre el valor inicial y el final de temperaturas especificadas para ese intervalo en las tablas de entrada.

La idea de descomponer el perfil de criopreservación en intervalos surge para facilitar el tratamiento de una función de la temperatura frente al tiempo que no es homogénea sino que puede estar formada por una multitud de tramos, cada uno con una pendiente diferente y con una duración distinta. Al tener un Módulo Interfaz que detecta el inicio de cada intervalo, en ese instante se leen los valores de Instante inicial del intervalo, Instante final del intervalo, Temperatura inicial del intervalo y Temperatura final del intervalo (ver figura 61, página 5-39), y estos datos de interés del nuevo intervalo son los únicos que se le facilitan al Módulo Muestreo de todos los datos disponibles en las tablas de entrada al programa.

De modo que el Módulo Muestreo sólo percibe la información concerniente al nuevo intervalo, sin que se le facilite datos relativos al resto del proceso criogénico. De esta forma, se ha reducido a un sencillo tratamiento de una recta el complejo problema de tratar con de una función irregular llena de cambios de pendiente y que no se ajusta a ninguna formulación matemática compacta, ya que el número de tramos y la duración de los mismos no son constantes de la aplicación y pueden tomar valores distintos en cada experimento.

La misión del módulo es construir la gráfica que representa la velocidad de enfriamiento durante el intervalo que está transcurriendo en tiempo real. Para ello, construye una recta interpolando entre la Temperatura inicial del intervalo y la Temperatura final del intervalo, ver figura 62, página 5-39. Después muestrea la recta y se consigue una colección de puntos discretos que irá recorriendo sucesivamente para sacar cada vez el valor de un único punto por la salida de datos del Módulo Muestreo.



INSTANTE FINAL INTERVALO	3
INSTANTE INICIAL INTERVALO	0
TEMPERATURA FINAL DEL INTERVALO	2
TEMPERATURA INICIAL DEL INTERVALO	4

Fig. 61 Datos del perfil de criopreservación facilitados al Módulo Muestreo.

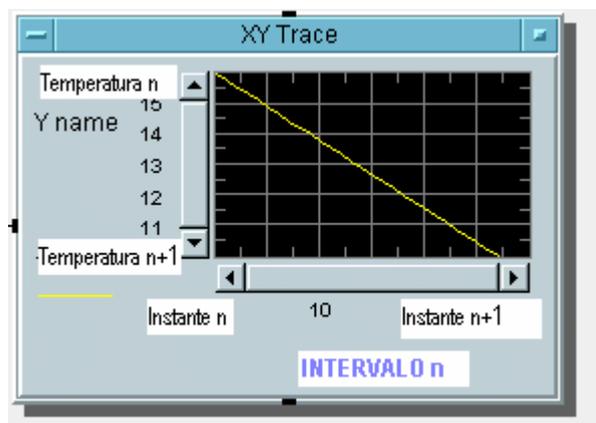


Fig. 62 Recta de temperaturas en tiempo real de cada intervalo.

5.2.3.1 Limitaciones de la tarjeta de adquisición de datos.

La necesidad del muestreo surge ante la imposibilidad de que el sistema tenga un tiempo de respuesta nulo y sea capaz de ejecutar las acciones de control correspondientes a infinitos puntos de temperatura, que se encuentran infinitesimalmente juntos. El tiempo de establecimiento de la señal de tensión en los canales analógicos de la tarjeta de adquisición de datos y la inercia inherente a las bombas peristálticas limitan el tiempo de respuesta del sistema.

Existe otra importante razón para haber decidido muestrear la función de la temperatura. Surge la necesidad de muestreo por las características de la tarjeta de adquisición de datos, que no está dotada de la llamada capacidad de operación continua. Esto quiere decir que los canales analógicos de salida no pueden recibir una forma de onda para transmitirla analógicamente por los canales, sino que sólo admiten un valor discreto y puntual. De nuevo un mecanismo software puede suplir una carencia hardware de los sistemas físicos que se emplean en los montajes y prototipos.

5.2.3.2 Frecuencia de muestreo.

En primer lugar se ha de fijar una frecuencia de muestreo, cuyo inverso es el período de muestreo. Cada un tiempo igual al período de muestreo se captura un valor discreto de la función continua que representa la temperatura frente al tiempo durante un intervalo. Este valor capturado se debe mostrar en la salida del Módulo Muestreo, para que sirva como dato de temperatura en el cálculo de los caudales de las bombas.

Se fija el período de muestreo a $T_{\text{muestreo}}=0.1$ minuto. Teniendo en cuenta que los experimentos de criogenización pueden durar desde treinta minutos hasta horas, un cambio de temperatura cada 6 segundos es suficientemente preciso para hacer un enfriamiento lineal en el que la disolución no sufra cambios abruptos en la temperatura que pudieran dañar los tejidos del corazón. En las pruebas que se realizan con diversos valores para supervisar el diseño de la aplicación, se encuentran multitud de casos en los que los valores muestreados contiguos sólo se diferencian entre sí por la centésima, por lo cual una actualización cada 6 segundos resulta suficiente para hacer un seguimiento fiel de la recta de temperaturas del intervalo.

Por otra parte, 6 segundos es tiempo suficiente para que la respuesta del sistema ocurra. El período de muestreo elegido permite que al cambiar los valores de salida de la aplicación, exista tiempo suficiente para que antes de que se produzca un nuevo cambio, se establezcan los valores de tensión de los canales analógicos de la tarjeta de adquisición de datos y las bombas peristálticas superen su inercia y puedan cambiar la velocidad de su motor, tal y como indiquen las tensiones de control de flujo que reciben de la tarjeta. Por otro lado se cumple sobradamente otra limitación de la tarjeta de adquisición de datos empleada, que exige que el dato se mantenga al menos 0.5 segundos antes de que el canal analógico saque el valor.

5.2.3.3 Procedimiento de muestreo.

El Módulo Muestreo sólo percibe la información concerniente al intervalo en el que se encuentra en tiempo real la evolución del proceso criogénico. De esta forma el Módulo Muestreo se aísla del perfil completo, para atender solamente al comportamiento que se demanda a la disolución durante los instantes que dura el presente intervalo. Este comportamiento se define como una concentración de valor constante y una temperatura que es una recta en función del tiempo, con pendiente

negativa porque se desea una disolución cada vez más fría y trazada entre un valor inicial y un valor final.

Cuando se actualizan las entradas del Módulo Muestreo, se construye una nueva recta y se muestra gráficamente en un icono con capacidad de representaciones gráficas de tipo XY Trace, como se puede ver en la figura figura 64, de la página 5-42.

Esta gráfica es el resultado de tomar del perfil de criopreservación sólo el tramo de función correspondiente a un intervalo, por lo que tiene una forma de línea recta, entre un valor inicial y final.

- ✓ Este concepto de tratar cada intervalo aisladamente sin preocuparse de los parámetros que caractericen al resto del perfil, se comprende mejor viendo la figura 64, de la página 5-42, en la que se muestra un ejemplo. Cuando el programa alcanza en tiempo real el instante $t = 9$ minutos, comienza un nuevo intervalo que se ha señalado con una flecha en el perfil de criopreservación. En ese instante el Módulo Caudal recibe los datos de Temperatura Inicial del Intervalo = 0.5 y Temperatura Final del Intervalo = -1. Construye la gráfica que recoge tan sólo el comportamiento de la temperatura de ese intervalo, siendo una recta entre 0.5°C y -1°C.

Una vez construida la recta, el siguiente paso consiste en muestrearla con un icono de tipo ramp(numElem, start, stop). Este objeto presenta una entrada para el valor inicial (start) que se une con el indicador “Temperatura Inicial del Intervalo” y una entrada para el valor final (stop) que se conecta con “Temperatura Final del Intervalo”. De esta forma, el objeto conoce el valor inicial y final entre los que debe interpolar para construir la recta.

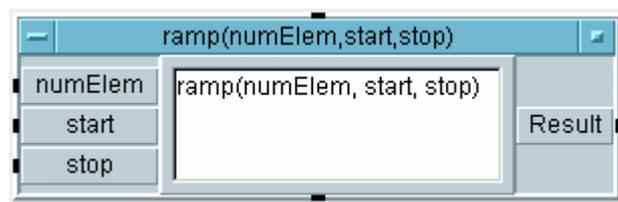


Fig.63 Icono que construye una recta y la muestrea.

El objeto tiene una tercera entrada (numElem) por donde lee el dato del número de puntos que se desea extraer de la recta continua que construya. El icono muestrea la recta, obtiene el número de puntos que se indique y coloca los valores en un display que se encuentra conectado a su salida (Result). El objeto, teniendo en cuenta el número de puntos que se le ha especificado que debe extraer del muestreo, equiespacia los valores que toma de la recta de modo que resulten tantos puntos muestreados como se deseaba.

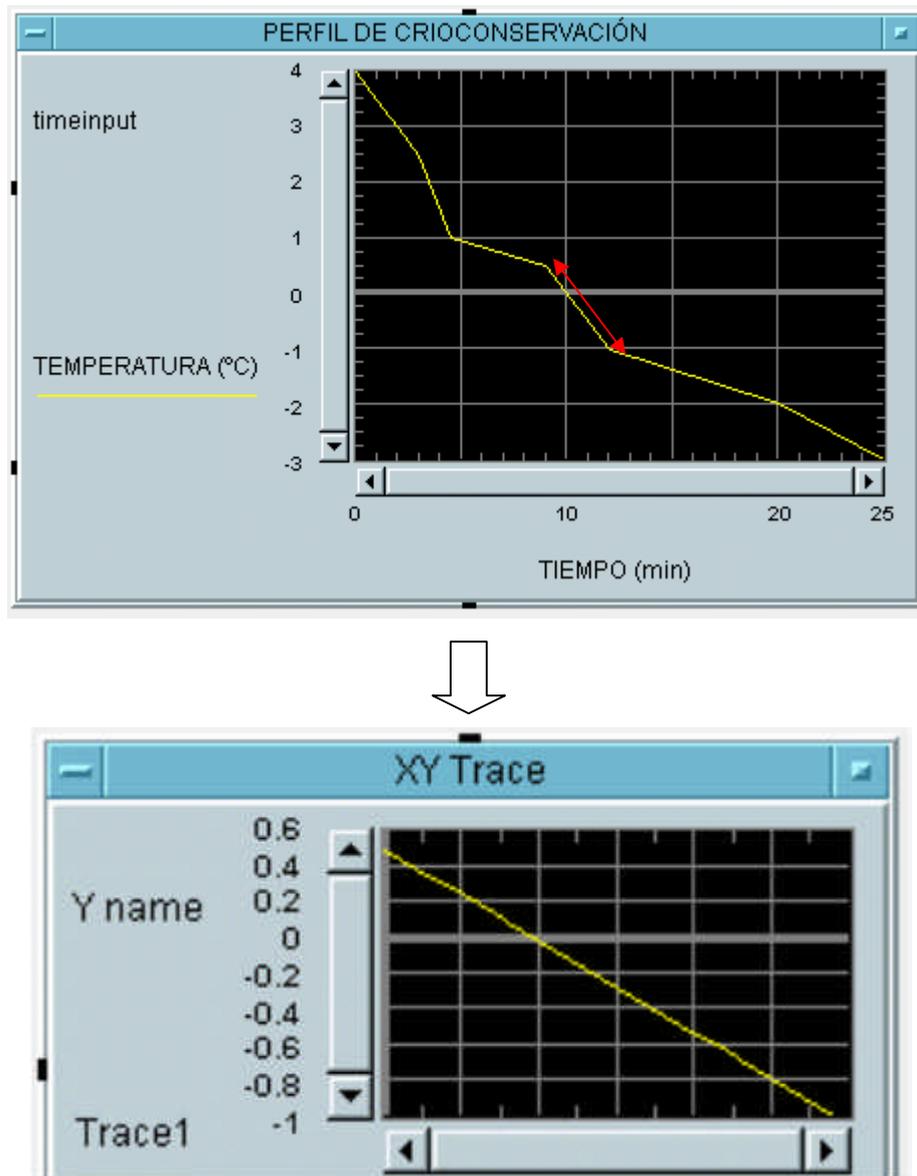


Fig.64 Gráfica construida por el Módulo Muestreo en el cuarto intervalo del experimento.

El número de puntos que se toman en la recta no es una constante para todos los intervalos, ya que los intervalos pueden ser de cualquier duración. Tener 10 puntos muestreados de la recta de temperaturas de un intervalo que dura 1 minuto puede ser suficiente, pero tener sólo 10 puntos de la recta que representa el comportamiento de la temperatura durante un intervalo que dura 30 minutos puede suponer una importante pérdida de información. Además supondría que en el primer intervalo se usa un período de muestreo menor (por tanto una frecuencia mayor) que en el segundo intervalo, lo cual no es en absoluto deseable porque se pretende tener el mismo valor de la frecuencia de muestreo durante todo el experimento para conseguir un funcionamiento homogéneo de la máquina, de modo que cada cierto tiempo T_{muestreo} se actualicen las tensiones de

los canales analógicos y por tanto los caudales que proporcionan las bombas y las condiciones resultantes de la disolución.

Por tanto es necesario idear un mecanismo flexible que adecue el número de puntos muestreados a la duración del intervalo y no sea un valor fijo e invariable para todos los intervalos. Garantizando que el número de puntos de muestreo se adapte a la duración del intervalo, se consigue tener una frecuencia de muestreo constante durante toda la duración del enfriamiento criogénico.

Deseamos actualizar las salidas de la máquina de Langendorff cada T_{muestreo} , es decir, cada un tiempo igual a 0.1 minutos (6 segundos), por tanto para que el sistema funcione en tiempo real se muestrea con esa misma tasa y dada la vertiginosa velocidad de procesamiento de HP VEE, los valores analógicos que salen por los canales cada 6 segundos, se corresponden con el valor de temperatura que se muestrea cada 6 segundos.

A la entrada del Módulo Caudal se encuentran como entradas los valores actualizados de Instante Inicial del Intervalo e Instante Final del Intervalo. Se fuerza a que sean las entradas B y A respectivamente de un objeto de tipo Formula que renombramos “duración intervalo/trespuesta”.



Fig.65 Icono que calcula el número de puntos de muestreo.

En este objeto se restan el instante final y el inicial, con lo que $(A-B)$ resulta la duración del intervalo en minutos. Si se desea un punto muestreado cada 0.1 minuto y el intervalo dura $(A-B)$ minutos, el número de puntos que se pueden extraer de la recta continua es $[(A-B) / 0.1]$ puntos.

No existe problema alguno si el resultado de la operación es un número decimal, porque el objeto de tipo ramp(numElem, start, stop) redondea el dato al entero inferior y no lo interpreta como error. De todas formas, al ser tan extensa la duración de los experimentos de enfriamiento criogénico, los puntos de temporización suelen ser números enteros (los cambios de velocidad de enfriamiento se producen en el instante de tiempo $t = 2$ minutos, $t = 17$ minutos, etc... sería también posible realizar los cambios en $t = 2.1$ minutos o $t = 16.9$ minutos, por ejemplo, pero es menos frecuente en un experimento que puede durar hasta tres horas). Una resta de un número entero menos otro número también entero y menor, siempre da como resultado un número entero positivo. Este número además se multiplica por 10, así es que finalmente el número de puntos de muestreo resulta un valor entero positivo, por lo que no se perdería precisión en el tiempo por redondeo en el número de puntos en el objeto ramp(numElem, start, stop).

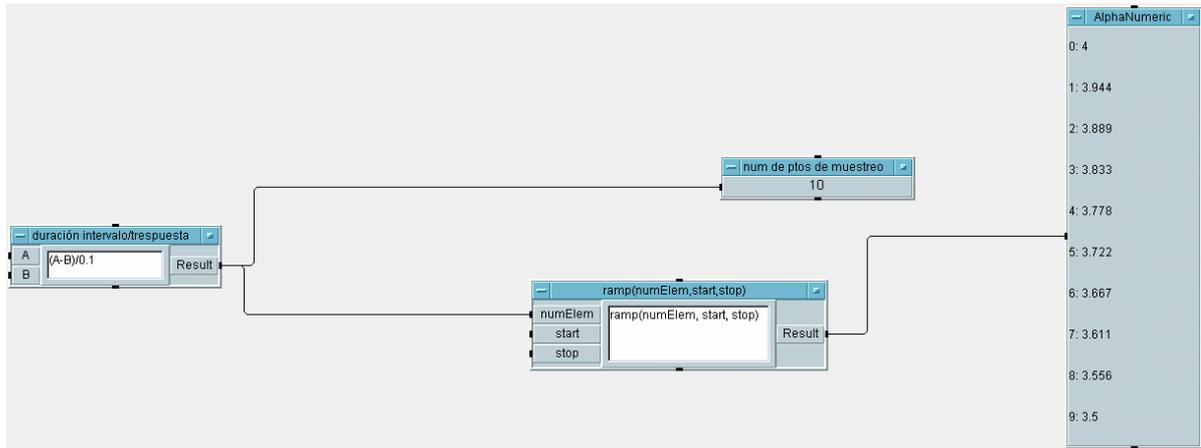


Fig. 66 Parte de los iconos que intervienen en el muestreo de la recta de temperaturas.

5.2.3.4 Generación de un reloj local.

Una vez que se dispone en la salida del icono `ramp(numElem, start, stop)` de la colección de puntos discretos, resultado de haber muestreado la recta que define el comportamiento de la temperatura de la disolución durante el presente intervalo, habrá que ir recorriendo secuencialmente la tabla de valores mostrados en el indicador y colocar uno a uno los datos en la salida del Módulo Muestreo cada 6 segundos.

Es el momento crucial en el que surge la necesidad de mecanismos de medición del tiempo en un sistema cuya tarjeta de adquisición de datos está desprovista de cualquier reloj, temporizador o contador. La programación aparece como única herramienta posible en la que apoyarse para resolver el problema de la medición del tiempo.

Tras un estudio detallado de los objetos de los que la herramienta de programación visual HP VEE 5.01 dispone, se encuentra el icono de tipo For Count como única posibilidad para emular el funcionamiento de un reloj en el sistema. Este objeto activa su pin de salida de datos el número de veces que se le especifique. Se configura con un valor máximo N y al igual que un contador digital hardware, se incrementa de 1 en 1, con cierta frecuencia, comenzando su cuenta en 0 y se detiene al alcanzar el valor $N-1$. Esta frecuencia será de vital importancia para calibrar una constante de equivalencia que haga funcionar la máquina en tiempo real. Cada vez que se incrementa su valor, activa su pin de salida de datos. Por tanto es el único elemento dinámico existente en el entorno de programación, que puede incrementarse a un ritmo constante y no se detendría a menos que llegase a su valor máximo programado, por lo que reúne dos características fundamentales del funcionamiento de un reloj: la métrica y la capacidad de no detenerse.

Es necesario introducir el concepto de step. Un contador parte del valor cero y se va incrementando de una en una unidad. En Electrónica Digital, cada una de estas unidades recibe el nombre de step.

El procedimiento consiste en observar en el ordenador de la máquina de Langendorff hasta qué número se incrementa un contador en 1 minuto, que medimos externamente con la ayuda de un cronómetro. Así se obtiene una sencilla equivalencia entre el tiempo real y los pasos (steps) que recorre un contador, siendo 300.000 el número de steps que se leen en un contador al pasar 60 segundos. Entonces, se puede cambiar la referencia de las medidas temporales, y en lugar de usar como unidad los segundos, se usará una nueva unidad: el step, siendo el coeficiente de equivalencia 300k. Se usará por tanto un contador como reloj local del Módulo Muestreo.

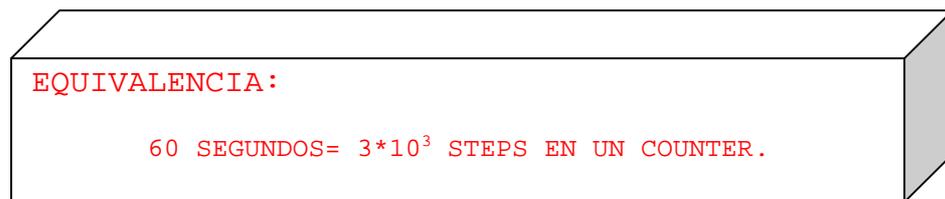


Fig.67 Constante de equivalencia para calibrar el funcionamiento en tiempo real.

5.2.3.4.1 Fundamento de la generación de un reloj local.

La idea general que se sigue es la siguiente. Para conseguir que cada vez que pasen 0.1 minutos salga un nuevo valor de temperaturas por la salida del Módulo Muestreo, tan sólo se requiere saber medir 0.1 minutos en el sistema. Para esta medición se requieren dos elementos:

- ✓ Un contador que funciona como reloj local, que se inicializa a 0 y se incrementa continuamente, terminando de contar cuando concluya la duración del intervalo.
- ✓ Un bloque iterativo que vaya señalando qué valor alcanza el reloj local cada vez que transcurren 0.1 minutos.

Comparando ambos valores, cada vez que se de una igualdad significa que han transcurrido 0.1 minutos y es el momento de poner un nuevo valor muestreado en la salida de temperatura del Módulo Muestreo.

5.2.3.4.2 Objeto Contador.

A la entrada del Módulo Caudal se encuentran como entradas los valores actualizados de Instante Inicial del Intervalo e Instante Final del Intervalo. Se fuerza a que sean las entradas B y A respectivamente de un objeto de tipo Formula que renombramos "DURACIÓN INTERVALO EN STEPS". La constante de equivalencia, de valor 300K se conecta a la entrada C de datos. De nuevo la operación (A-B) es la duración en minutos del intervalo presente. Al multiplicar por C, en la salida de datos

del icono (Result) se tiene la duración del intervalo en la nueva unidad que hemos llamado step.

Este valor calculado sirve de entrada al icono For Count que sirve de base para el diseño del reloj local. El contador se programa con la duración del intervalo en steps como valor máximo de sus operaciones de autoincremento.

Por tanto, cada vez que se llega al instante de inicio de un nuevo intervalo, como el Módulo Interfaz proporciona en tiempo real los valores del tiempo inicial y final que acotan el intervalo, el icono “DURACIÓN INTERVALO EN STEPS” se activa actualizando el valor de su salida, y por tanto el contador se inicializa a 0 y comienza de nuevo a incrementarse hasta el nuevo valor programado como duración del intervalo en steps.

Al haber ajustado la constante de equivalencia, se garantiza que el objeto For Count pare de contar cuando realmente ha transcurrido la duración del intervalo en minutos.

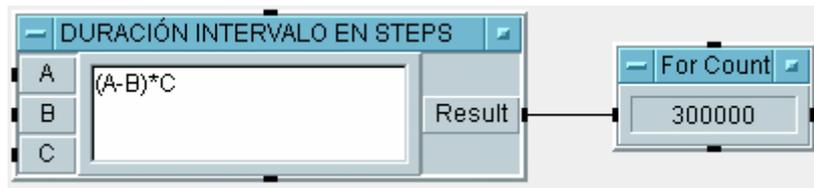


Fig. 68 Iconos participantes en la emulación del reloj local.

Con la programación descrita conseguimos tener en el Módulo Muestreo un objeto que funciona como reloj local: el icono For Count se incrementará y funcionará sin detenerse, desde el momento en que comienza el intervalo, al ser activado por un cambio en los valores que pasa el Módulo Interfaz, hasta el momento en que acaba el intervalo, por haberse programado con un valor máximo equivalente a la duración del intervalo.

Por tanto gracias a For Count se tiene una medida de la duración total del intervalo y un objeto que detecta el principio y avisa del fin de cada intervalo en tiempo real. Ahora es necesario un mecanismo que avise cada vez que transcurran 6 segundos, una vez que ha comenzado el intervalo, por lo que se idea el siguiente bucle iterativo.

5.2.3.4.3 Bloque iterativo.

Se tiene un icono de tipo Data Real que se renombra como Real2 y se configura como constante de valor -0.1 . Cuando se activa el icono “DURACIÓN INTERVALO EN STEPS”, su pin de secuencia de salida está conectado al pin de secuencia de entrada del objeto Gate. Al activarse el pin de secuencia de entrada del icono Gate, el valor que tiene a su entrada, Real2, lo coloca a su salida.

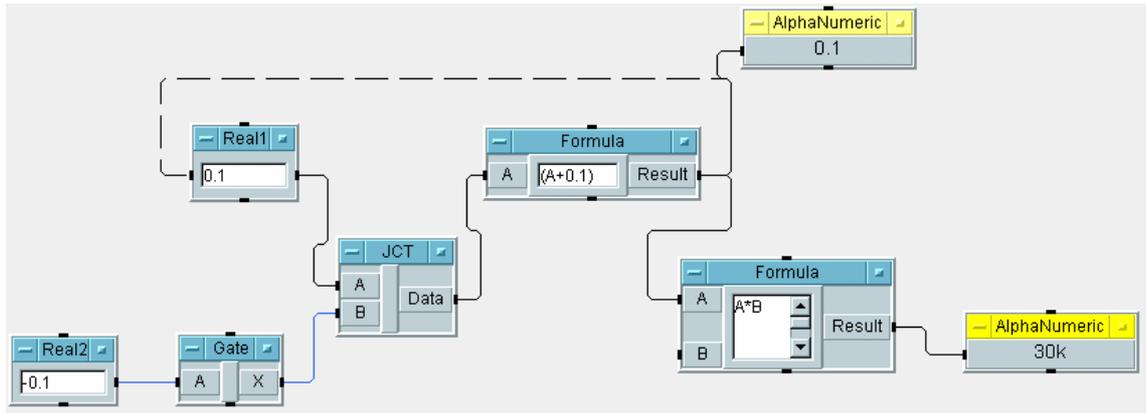


Fig.69 Bucle que detecta el paso de 0.1 minutos en tiempo real.

El icono JCT funciona colocando en su salida Data el valor de la entrada A o B que se active antes. Como se acaba de activar el icono “DURACIÓN INTERVALO EN STEPS”, acaba de comenzar un nuevo intervalo y se trata de la primera iteración del bucle, por lo que Real1 aún no se activado y llega antes el valor de Real2 al objeto JCT, saliendo por tanto por su salida. Real2 atraviesa el icono JCT y entra en el siguiente objeto que encuentra en el diagrama de flujo, un objeto de Tipo Fórmula. En este objeto se le suma 0.1, resultando un valor nulo, que se mostraría en un indicador alfanumérico 1 situado en la salida Result del objeto Fórmula. El siguiente paso es atravesar otra Fórmula en la que se somete a una multiplicación por una entrada llamada B, y que estará alimentada por el valor de la constante de equivalencia, 300k. El resultado de esta operación es recogido por otro indicador alfanumérico 2.

El valor mostrado en el indicador alfanumérico 1 es el instante de tiempo en el que se encuentra el intervalo, si consideramos el instante 0 como principio del mismo. Este indicador irá recorriendo valores de tiempo, incrementándose de 0.1 en 0.1 minutos, hasta llegar a valer un tiempo igual a la duración de intervalo en minutos. El indicador alfanumérico 2 muestra ese mismo instante de tiempo pero medido en la nueva unidad definida como step.

El valor que se muestra en el indicador alfanumérico 1 realimenta el bucle, sirviendo de entrada a la variable Real1. A este objeto Real1 se le ha añadido una entrada adicional de datos, para que su valor se fije desde un icono exterior, tomando en este caso el valor cero. Ahora será Real1 quien atraviese el icono JCT, ya que Real2 sólo consigue atravesar el objeto Gate en la primera iteración porque que sólo en el momento en que se inicia el intervalo se activa el icono “DURACIÓN INTERVALO EN STEPS” que controla a su vez el objeto Gate.

Tras atravesar el icono JCT, el valor nulo que puso en la línea de datos la variable Real1 es actualizado en el icono Fórmula, que lo incrementa en 0.1. De nuevo este valor se muestra en el indicador alfanumérico 1, indicando así que han pasado 0.1 minutos desde el inicio del nuevo intervalo. Este valor atraviesa el otro icono Fórmula y se convierte de un valor en minutos a un valor medido en steps.

Esto ocurrirá sucesivamente, hasta que se detenga For Count, se actualicen de nuevo los valores y comience el mismo ciclo descrito para el siguiente intervalo.

5.2.3.4.4 Comparador.

Descrito el funcionamiento del icono For Count como reloj local y el funcionamiento del bucle iterativo, se introduce la idea de emplear un objeto de tipo Comparador. Este objeto se emplea para que compare constantemente el valor del icono For Count, que sirve de reloj local, con el instante de tiempo medido en steps que muestra el indicador alfanumérico 2. Cuando se da la igualdad al comparar, es que el tiempo ha transcurrido en el reloj local hasta llegar al instante que marca el indicador 2 en steps (o el indicador 1 en minutos), por tanto ha pasado una fracción de 0.1 minutos y es el momento de acceder a un valor de la tabla de puntos muestreados y ponerlo en la salida de datos del Módulo Muestreo.

Cada vez que se da una igualdad en la comparación, la salida Then del comparador activa un icono Get Values, que recibe la tabla de puntos muestreados en su entrada vectorial Ary y el número del elemento al que se desea acceder en su entrada x. La salida de interés es la línea SubAry, donde aparece el elemento de la tabla de puntos muestreados que se direccionaba con ese índice. La entrada de la variable x también estará controlada por un bucle que va iterando e incrementando su valor, desde 0 hasta el número de puntos muestreados que se calculó, teniendo en cuenta que la variable x no puede desbordar su valor porque se intentarían hacer accesos no válidos al registro de puntos muestreados, tratando de recoger datos direccionados con un índice que no existe en las tablas. (Ver figura 70, página 5-49).

El funcionamiento en tiempo real del sistema queda garantizado porque el Módulo Interfaz proporciona sus salidas justo en el instante en el que comienza un nuevo intervalo, por lo que el Módulo Muestreo recibe sus entradas y permanece sincronizado gracias al Módulo Interfaz. El procesamiento necesario para construir la recta y muestrearla es instantáneo y se dispone de la lista de valores con tiempo suficiente para que se pueda acceder a ellos en el instante adecuado.

La operación de calcular la duración del intervalo en steps es instantánea, así como que el For Count se cargue con ese valor, por lo que tan pronto como se actualizan las entradas del Módulo Muestreo, comienza a funcionar el reloj local y el bucle iterativo irá cargando sucesivos valores para que cuando la cuenta de For Count alcance esos valores, se extraiga un nuevo dato de temperatura y se disponga en la salida. Todas las operaciones de HP VEE ocurren en un tiempo inapreciable, por lo que lo único que se extiende en el tiempo es la cuenta del icono For Count, garantizando así que todos los valores muestreados desfilan por la salida en un tiempo igual al de la duración total del intervalo.

Cuando por la salida del Módulo Muestreo han pasado todos los valores muestreados, el reloj local ha alcanzado el valor máximo de su cuenta, que coincide con la duración del intervalo en steps. En ese momento acaban las iteraciones del Módulo Muestreo correspondientes a un intervalo, por lo que instantáneamente el contador del Módulo Interfaz se incrementa en una unidad y se actualizan los valores de Instante inicial del intervalo, Instante final del intervalo, Temperatura inicial del intervalo y

Temperatura final del intervalo. De este modo se da paso en tiempo real al comienzo de un nuevo intervalo y se activa de nuevo el Módulo Muestreo. En resumen, las operaciones que realiza HP VEE en la aplicación se consideran instantáneas por su vertiginosa velocidad de procesamiento, y lo único que detiene el flujo del programa son las iteraciones que dependen del icono For Count del Módulo Muestreo, lo cual se aprovecha para medir el tiempo y equipararlo con el tiempo real mediante una constante de equivalencia.

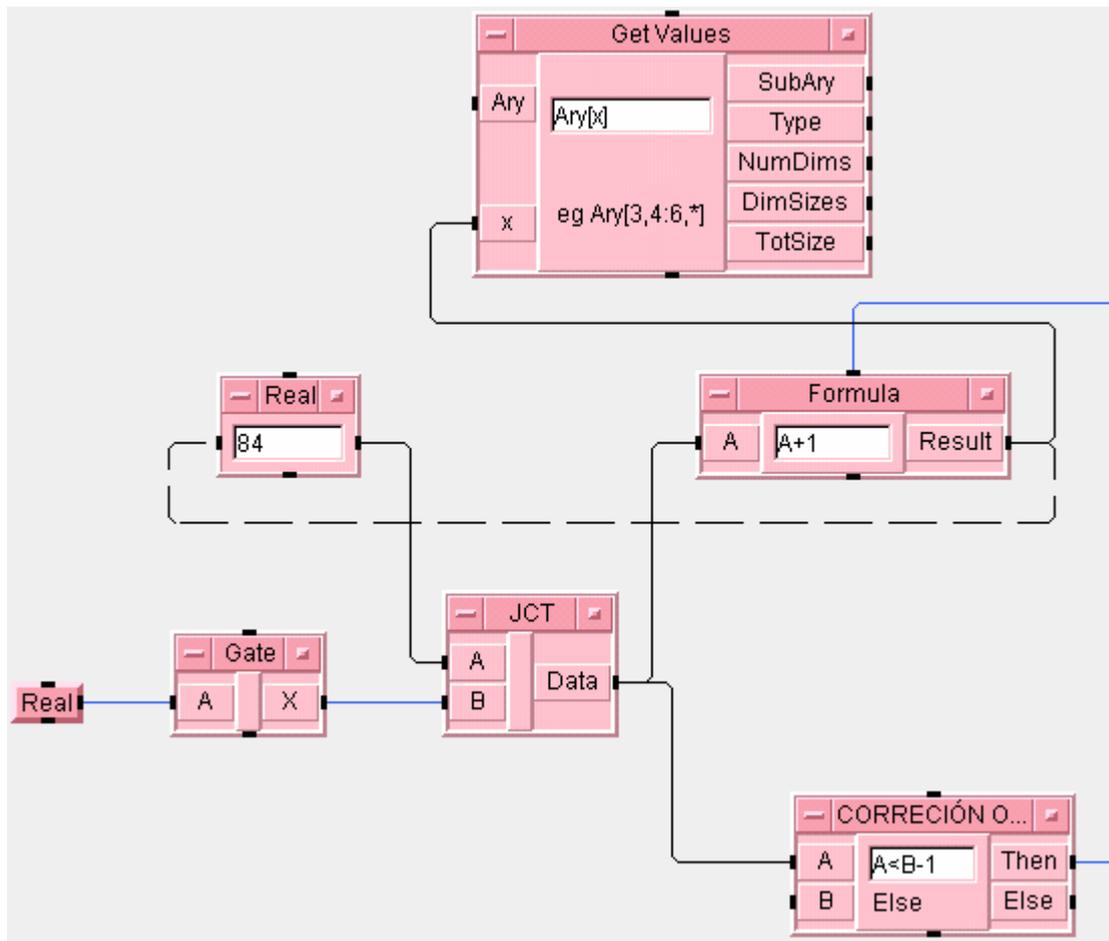


Fig.70 Bucle que actualiza el índice con el que se accede a la tabla de puntos muestreados

5.2.3.4.5 Calibración del tiempo.

El único problema que aparece es que al instalar la aplicación en un ordenador distinto del que forma parte del prototipo de la máquina de Langendorff, es necesaria buscar una nueva constante de equivalencia, que equipare el tiempo que transcurre en la aplicación con el tiempo real que se puede medir con un cronómetro. Esto es así porque la generación de un reloj local no está basada en algún elemento hardware sino en el uso de un contador, que no es más que un icono de un lenguaje de programación. El programa corre sobre un ordenador, con lo cual, la ejecución de la aplicación tendrá una

velocidad distinta según las características del ordenador: su frecuencia interna, su memoria disponible, el tipo de procesador, el grado de ocupación del ordenador, la cantidad de procesos que se estén ejecutando en paralelo, etc...

La constante de 300 k se ha determinado al calibrar un ordenador con una frecuencia interna de 166 MHz, que es el ordenador en el que se ha instalado la tarjeta de adquisición de datos y se ha conectado con las bombas peristálticas en el montaje hospitalario.

Para dar una idea de la variabilidad de la constante de equivalencia según el ordenador en el cual resida la aplicación, se ha hecho la calibración en un ordenador portátil de frecuencia interna 500 MHz, resultando una constante de valor 2 megas.

La calibración del tiempo resulta sencilla, se trata de ir observando por ejemplo en qué momento se refresca el valor de Instante Inicial de Intervalo, ejecutando el programa y comparando el momento en que se refrescan las variables con el tiempo que realmente marca un cronómetro. Por sucesivas aproximaciones se consigue determinar una constante adecuada.

Algunos de los resultados que se consiguieron al calibrar la máquina de Langendorff con una constante de 300k fueron los siguientes:

- Cuando el indicador de Instante Inicial de Intervalo marcaba el valor 1 minuto, el cronómetro marcaba 57 segundos.
- Cuando el indicador de Instante Inicial de Intervalo marcaba el valor 2 minutos, el cronómetro marcaba 2 minutos.
- Cuando el indicador de Instante Inicial de Intervalo marcaba el valor 3 minutos, el cronómetro marcaba 3 minutos y 2 segundos.
- Cuando el indicador de Instante Inicial de Intervalo marcaba el valor 4.5 minutos, el cronómetro marcaba 4 minutos y 37 segundos.

De igual modo se observaba que el indicador de Temperatura, que es la salida del Módulo Muestreo cambiaba efectivamente cada 6 segundos, tal y como se observaba con un cronómetro inicializado a la vez que la ejecución del programa.

5.2.4 IMPLEMENTACIÓN DEL MÓDULO CAUDAL.

El Módulo Caudal recibe en tiempo real la temperatura T y la concentración C que se desea para la disolución, según indica el perfil de criopreservación en cada instante. Para tener una disolución que cumpla tales condiciones se dispone de dos baños de agua de temperaturas T_2 y T_3 , así como de dos baños de anticongelante de temperaturas T_1 y T_4 . En el Módulo Caudal se calcula el volumen necesario que hay que tomar de cada uno de los cuatro baños, de manera que al mezclar las cuatro cantidades resulte una disolución a la temperatura y concentración que indican las entradas del módulo.

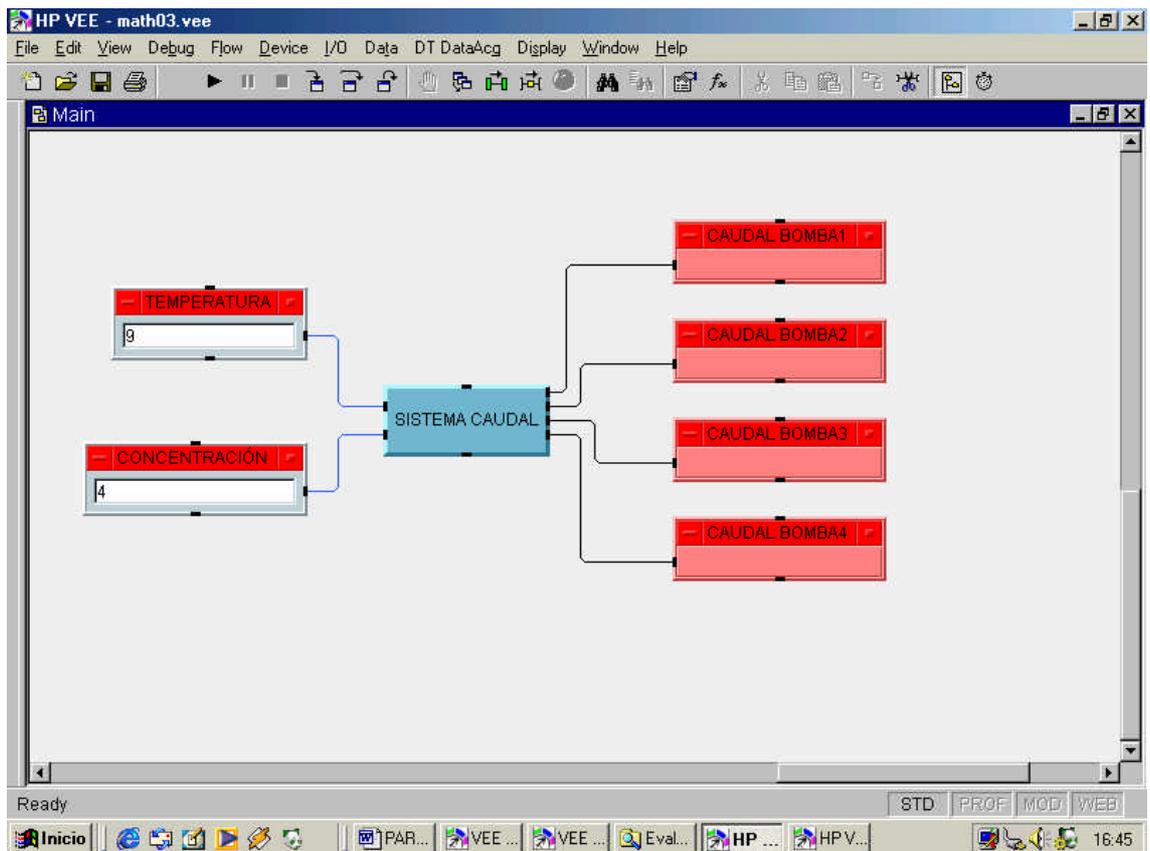


Fig.71 Esquemático del Módulo Caudal.

En el diseño de la aplicación se han empleado como valores por defecto un valor $T_1= 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un baño lleno de anticongelante, un valor $T_2= 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un baño de lleno de agua, un valor $T_3= 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un baño de agua y un valor $T_4= -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un baño de anticongelante.

Para facilitar la nomenclatura, el líquido del baño de temperatura T_i será extraído por la bomba etiquetada como Bomba i .

El sistema de cuatro ecuaciones, con incógnitas $f_i \quad \forall i=1,2,3,4$ que representan el caudal que proporciona respectivamente la bomba 1, 2, 3 y 4, ya fue descrito cualitativamente en el capítulo anterior, por lo que tan sólo se reitera su formulación matemática:

$$f_1 + f_2 + f_3 + f_4 = V$$

$$T_1 \cdot f_1 + T_4 \cdot f_4 = (f_1 + f_4) \cdot T$$

$$T_2 \cdot f_2 + T_3 \cdot f_3 = (f_2 + f_3) \cdot T$$

$$C = \frac{f_1 + f_4}{f_1 + f_2 + f_3 + f_4}$$

El sistema de ecuaciones admite también una formulación matricial del tipo $\bar{A} \cdot \bar{x} = \bar{b}$, resultando el siguiente sistema:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ T-T_1 & 0 & 0 & T-T_4 \\ 0 & T-T_2 & T-T_3 & 0 \\ C-1 & C & C & C-1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \\ f_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} V \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Resulta inmediata la identificación de la matriz \bar{A} y los vectores \bar{b} y \bar{x} :

$$\bar{A} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ T-T_1 & 0 & 0 & T-T_4 \\ 0 & T-T_2 & T-T_3 & 0 \\ C-1 & C & C & C-1 \end{pmatrix}$$

$$\bar{x} = \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \\ f_4 \end{pmatrix} \quad \bar{b} = \begin{pmatrix} V \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Por tanto la misión del Módulo Caudal para calcular el valor de los caudales que deben proporcionar las bombas peristálticas es resolver el sistema mediante la siguiente operación matricial:

$$\bar{x} = \bar{A}^{-1} \cdot \bar{b}$$

- ✓ En primer lugar se crea la matriz \bar{A} , de dimensión 2x2 con un icono de tipo Allocate Array, que se renombra como “Crea matriz” y que genera una matriz con el número de filas y columnas especificados en el icono, que además tiene una opción donde se puede elegir el valor por defecto que dará a todos los elementos. La matriz creada se puede visualizar en el indicador alfanumérico “MATRIZ 2x2”. Se observa que HP VEE comienza a numerar las filas y las columnas de una matriz de orden n, desde 0 hasta n-1.



Fig. 72 Creación de la matriz \bar{A} .

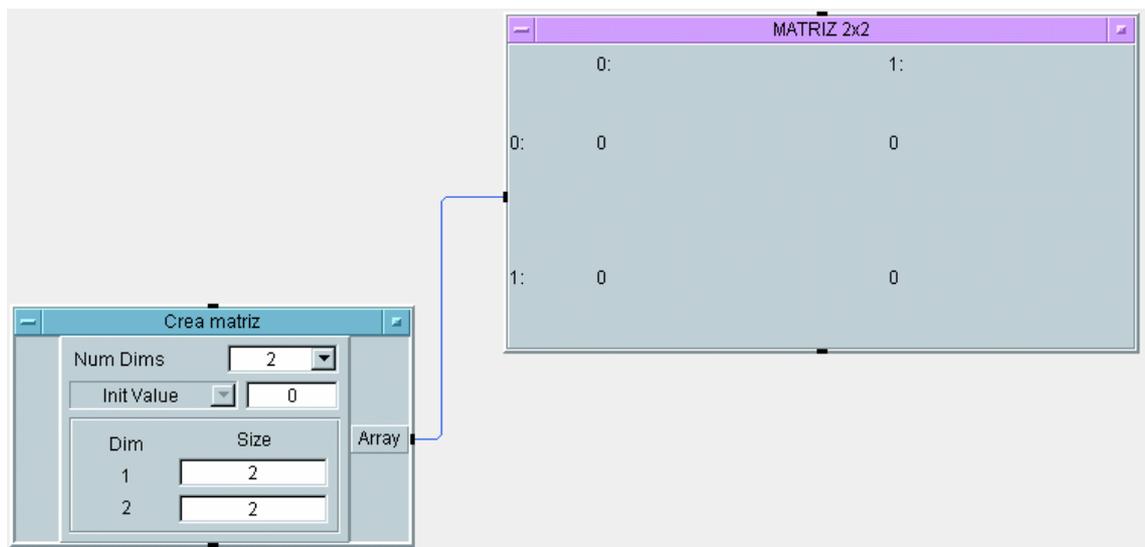


Fig.73 Objetos mostrando sus parámetros en la creación de una matriz.

- ✓ A continuación la nueva matriz creada, de dimensión 2x2 y elementos inicializados a cero, entra en un User Object llamado “PARÁMETROS (TEMPERATURA)”. Este objeto contiene cuatro iconos de tipo Fórmula colocados en cascada y a través de los cuales pasa la matriz secuencialmente. En cada icono se accede a un elemento de la matriz \bar{A} . Cuando la matriz termina de recorrer este User Object se han accedido a los cuatro elementos cuyo valor es variable porque dependen de la temperatura que se desea para la disolución en cada instante y de la temperatura de los distintos baños del montaje. La temperatura de cada uno de los baños T_1 , T_2 , T_3 y T_4 son entradas del Módulo Caudal, así como la temperatura T deseada para la disolución total.

- En el icono denotado (1,0) se accede al elemento (1,0) de la matriz para darle el valor $T - T_1$.
- En el icono denotado (1,3) se accede al elemento (1,3) de la matriz para darle el valor $T - T_4$.
- En el icono denotado (2,1) se accede al elemento (2,1) de la matriz para darle el valor $T - T_2$.
- En el icono denotado (2,2) se accede al elemento (2,2) de la matriz para darle el valor $T - T_3$.

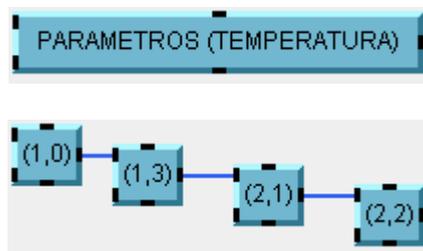


Fig.74 Objeto e iconos que contiene, encargado de rellenar los valores de la matriz \bar{A} dependientes de la temperatura.

- ✓ A continuación, la matriz \bar{A} entra en un User Object llamado "PARÁMETROS (CONCENTRACIÓN)". Este objeto contiene cuatro iconos de tipo Fórmula colocados en cascada y a través de los cuales pasa la matriz secuencialmente. En cada icono se accede a un elemento de la matriz \bar{A} . Cuando la matriz termina de recorrer este User Object se han accedido a los cuatro elementos cuyo valor es variable porque dependen de la concentración que se desea para la disolución en cada instante. La concentración es una de las entradas que tiene el Módulo Caudal por lo que es un valor disponible a la hora de actualizar los elementos de la matriz.
- En el icono denotado (3,0) se accede al elemento (3,0) de la matriz para darle el valor C-1.
- En el icono denotado (3,1) se accede al elemento (3,1) de la matriz para darle el valor C.
- En el icono denotado (3,2) se accede al elemento (3,2) de la matriz para darle el valor C.
- En el icono denotado (3,3) se accede al elemento (3,3) de la matriz para darle el valor C-1.

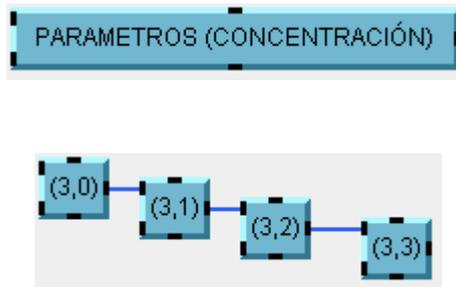


Fig.75 Objeto e iconos que contiene, encargado de rellenar los valores de la matriz \bar{A} dependientes de la concentración.

- ✓ A continuación, la matriz \bar{A} entra en un User Object llamado “CTE 1”. Este objeto contiene cuatro iconos de tipo Fórmula colocados en cascada y a través de los cuales pasa la matriz secuencialmente. En cada icono se accede a un elemento distinto de la matriz \bar{A} . Cuando la matriz termina de recorrer este User Object, se han accedido a los cuatro elementos cuyo valor es la unidad, porque se corresponden con la ecuación resultante de la especificación del volumen máximo.
 - En el icono denotado (0,0) se accede al elemento (0,0) de la matriz para darle el valor 1.
 - En el icono denotado (0,1) se accede al elemento (0,1) de la matriz para darle el valor 1.
 - En el icono denotado (0,2) se accede al elemento (0,2) de la matriz para darle el valor 1.
 - En el icono denotado (0,3) se accede al elemento (0,3) de la matriz para darle el valor 1.

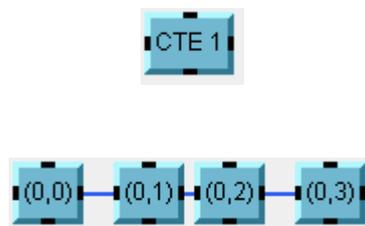


Fig.76 Objeto e iconos que contiene, encargado de rellenar los elementos de la matriz \bar{A} cuyo valor es la unidad.

- ✓ Una vez rellenados todos los elementos de la matriz \bar{A} , ésta pasa por un icono de tipo Fórmula donde se programa la operación **inverse(x)**. De este modo, a la salida del icono se consigue tener la matriz invertida \bar{A}^{-1} .

- ✓ Análogamente a la creación de la matriz \bar{A} , se crea el vector \bar{b} con el mismo tipo de icono, inicializando de nuevo todos sus elementos a cero pero variando los parámetros relativos al tamaño, para obtener un vector de dimensión 4x1. Después el vector se hará pasar por un icono tipo fórmula en el que se acceda a su elemento (0,0) para introducir el valor del flujo máximo admisible V, que se encuentra accesible como parámetro a la entrada del Módulo Caudal y por tanto está disponible para actualizar el valor del elemento correspondiente del vector. Así queda ya completamente configurado el vector \bar{b} .

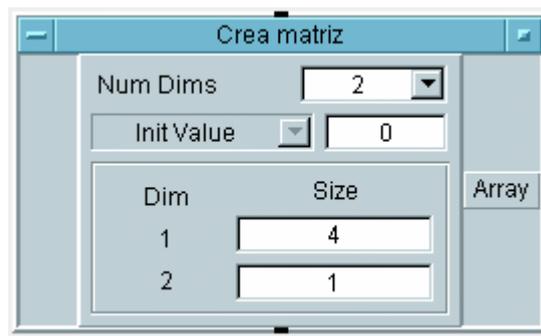


Fig.77 Creación del vector \bar{b} de dimensión 4x1.

- ✓ En este punto del programa se han rellenado los elementos tanto de la matriz \bar{A} como del vector \bar{b} , de acuerdo con la formulación matricial del sistema de ecuaciones. Tanto la matriz como el vector sirven de entradas a un icono cuya función es la de multiplicar matrices en el orden que se indica. De modo que como resultado, el icono matMultiply(A,B) ofrece en su salida el resultado del producto $\bar{A}^{-1} \cdot \bar{b}$, que es justamente el vector solución \bar{x} .

$$\bar{x} = \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \\ f_4 \end{pmatrix}$$



Fig.78 Icono cuya función es la multiplicación de matrices.

Cada uno de los elementos del vector \bar{x} se corresponde con el caudal que debe proporcionar la bomba 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Cada bomba extrae líquido de un baño que tiene su misma numeración. En la aplicación se designa como baño 1 aquel que contiene anticongelante a temperatura caliente ($T_1= 37\text{ }^\circ\text{C}$), baño 2 aquel que contiene agua a temperatura caliente ($T_2= 37\text{ }^\circ\text{C}$), baño 3 aquel que contiene agua a temperatura fría ($T_3= 1\text{ }^\circ\text{C}$), y baño 4 aquel que contiene anticongelante a temperatura fría ($T_4= -10\text{ }^\circ\text{C}$).

- ✓ El resultado de la multiplicación de matrices es el vector solución \bar{x} del sistema de ecuaciones que se deseaba resolver. Se muestra el valor de este vector en un indicador alfanumérico que se dispone a la salida del icono matMultiply(A,B). Este indicador se renombra como “Caudales”. Sirve de entrada a cuatro iconos de tipo Get Value. Un objeto Get Value recibe como entrada una matriz o vector y sirve para acceder a un elemento concreto. Simplemente consignando dentro del objeto Get Value el número de fila y columna que identifica el elemento de interés de la matriz o vector, se tiene el valor del elemento en la salida.
- ✓ En cada uno de los iconos Get Value se accede a un elemento distinto del vector solución, para poner cada uno de los caudales en una línea de datos distinta, de modo que el Módulo Caudal tenga cuatro salidas independientes, donde cada una contiene el caudal que debe proporcionar una de las cuatro bombas peristálticas disponibles en el montaje.

Por ejemplo el primer Get Value, tras recibir como entrada el vector \bar{x} , pone en su salida el valor del primer elemento del vector, es decir f_1 , que sirve ya directamente de salida del Módulo Caudal. f_1 representa el caudal que debe proporcionar la bomba numerada como bomba 1 y conectada al canal analógico 0. Así sucesivamente el resto de iconos Get Value coloca en líneas distintas el resto de los caudales f_2 , f_3 y f_4 , correspondientes respectivamente a las bombas numeradas como 2, 3 y 4.

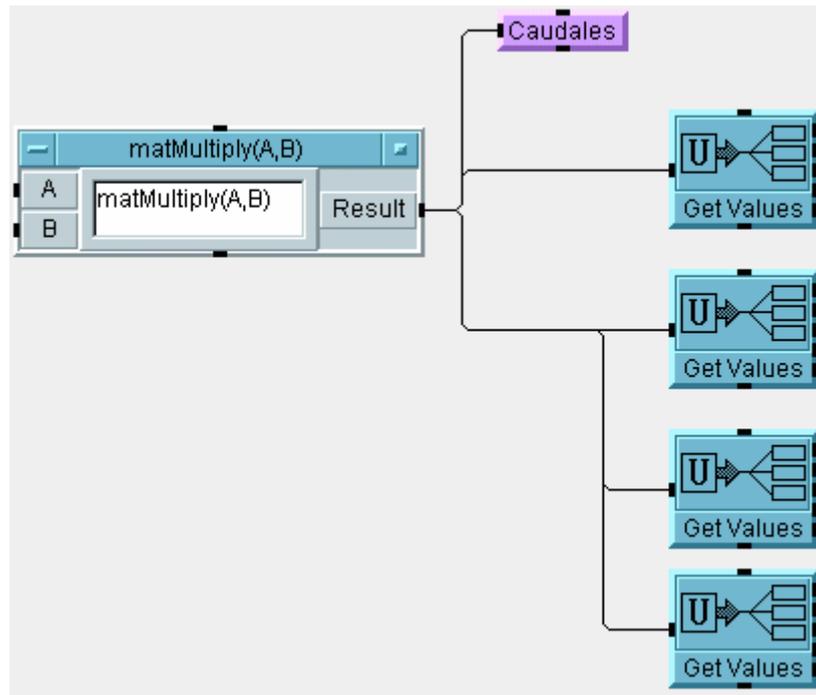


Fig.79 Separación del vector solución en cuatro variables separadas.

5.2.5 IMPLEMENTACIÓN DE LA FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA.

Cada valor de caudal de salida del Módulo Caudal ha de convertirse en el valor de tensión correspondiente para que la bomba asociada pueda extraer flujo de su baño respectivo a esa tasa de mililitros por minuto. Se han realizado las medidas experimentales suficientes para obtener la función de transferencia que describe el flujo que proporciona una bomba peristáltica según la tensión de control analógico que reciba. El comportamiento de la bomba se ha formulado matemáticamente con una función de dos tramos:

$$y = \begin{cases} 0.2 \cdot x - 1 & \forall x \geq 10 \\ 0.1 \cdot x & \forall x \leq 10 \end{cases}$$

siendo y el valor de la tensión en voltios y siendo x el valor del caudal en mililitros por minuto (ml/min).

La implementación requiere por tanto de una comprobación para ver si el caudal es menor o no de 10 ml/minuto, con un objeto de tipo If/Then/Else. Según en qué caso se encuentre el valor del caudal, se activa un icono de tipo Formula u otro. Ambos iconos reciben el caudal en su entrada de datos A, pero sólo uno de ellos se activará, aplicándole la función correspondiente.

El icono de tipo JCT pone en su salida el valor de una de sus entradas, en concreto aquella que se active antes. Como el icono If/Then/Else sólo activará un objeto Fórmula, éste será el que atraviese el icono JCT y se establezca como valor de tensión.

Este diagrama de flujo ocurre simultáneamente para cada uno de los caudales. Todos tienen la misma función de transferencia porque se usan en el diseño cuatro bombas peristálticas iguales.

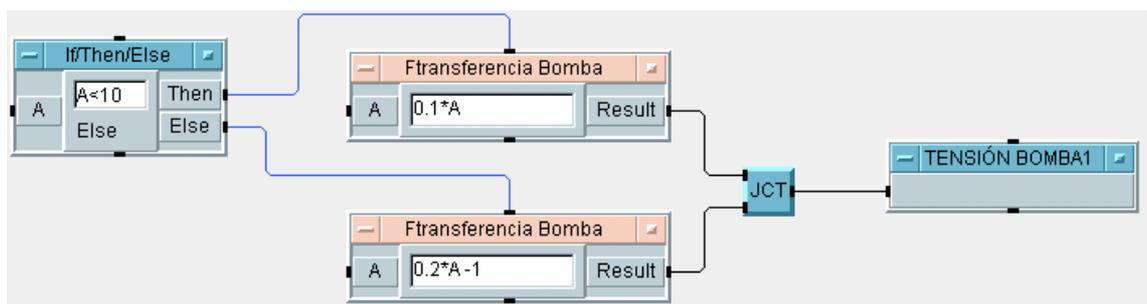


Fig.80 Implementación de una función de transferencia a trozos.

5.2.6 IMPLEMENTACIÓN DEL MÓDULO SALIDA ANALÓGICA.

Antes de detallar la implementación del Módulo Salida Analógica, es necesario recapitular y recordar la situación en la cual se encuentra la ejecución del programa cuando se activa este módulo.

A la salida del Módulo Caudal se conocen los volúmenes de agua y anticongelante que han de mezclarse para formar una disolución que cumpla las características fijadas para cada instante por el perfil de criopreservación. Estos valores de salida del Módulo Caudal atraviesan la función de transferencia de la bomba, donde se convierten en valores de tensión.

Al pasar el valor de los volúmenes por la función de transferencia de la bomba peristáltica, se calculan los niveles de tensión que deben alimentar la entrada de control de flujo de las bombas para que efectivamente extraigan líquido de los baños con la tasa deseada. Una vez calculados, los valores de tensión se convierten en las entradas del Módulo Salida Analógica.

La función del Módulo Salida Analógica consiste en hacer que los canales analógicos de salida de la tarjeta de adquisición de datos tomen los valores de tensión que el Módulo recibe a su entrada como datos. La asociación entre canales analógicos y bombas es la siguiente: la bomba etiquetada como bomba1 está conectada al canal CH0, la bomba2 con el canal CH1, la bomba3 con el canal CH2 y la bomba4 con el canal CH3.

Para cada canal analógico de salida se usa un objeto de tipo Put Single Value. Este objeto no está disponible en el menú de HP VEE hasta que se instala DT VPI, que añade los iconos y las funciones adicionales relacionadas con la adquisición de datos. Algunas tarjetas de adquisición de datos, a la hora de sacar valores analógicos emplean en la programación el objeto Put Data Panel, pero esto sólo es posible si la tarjeta está dotada de la capacidad de operación continua. La operación continua implica que se rellena un buffer con valores de tensión asociados a un canal y la tarjeta tiene la capacidad de poder ir recorriendo el buffer y sucesivamente fijar cada uno de esos valores de tensión en el canal. Aunque el entorno de programación formado por HP VEE y DT VPI sí ofrece esta posibilidad, el hardware es el que en este caso limita las condiciones de programación. El modelo de tarjeta de adquisición de datos empleado en el prototipo de Langendorff no ofrece la capacidad de operación continua, tal y como se puede consultar en sus manuales. Por tanto, a la hora de configurar canales analógicos de salida, el único objeto que se puede emplear como interfaz con la tarjeta es Put Single Value.

✓ Restricciones del objeto Put Single Value:

- Este objeto exige que el dato analógico se mantenga al menos 0.5 segundos para iniciar el subsistema D/A y así fijar la tensión del canal analógico a ese valor. Esta condición queda sobradamente garantizada, ya que el dato de tensión de salida de cada canal cambia cada 6 segundos aproximadamente, debido a la tasa de muestreo empleada.

- Se exige que todos los canales programados tengan datos, es imposible que sólo un canal de los programados saque datos por la salida analógica y el resto de canales quede a la espera de recibirlos. Por tanto la tarjeta de adquisición de datos exige que existan datos en los cuatro canales analógicos de salida, no puede sacar un valor de tensión por un único canal dejando sin actividad al resto. Esto no supone ninguna limitación al diseño porque siempre se desea controlar simultáneamente todas las bombas de la máquina de Langendorff y los valores de tensión que las controlan siempre cambian a la vez.
- Es necesaria la configuración de un convertidor Digital/Analógico por cada objeto Put Single Value. Como resultado de esta configuración, se obtiene el manejador de subsistema que identifica a la tarjeta de adquisición de datos.
- No es necesario fijar un parámetro habitual de los canales analógicos de salida que es la tasa. No se define ninguna tasa de salida para los valores de tensión que irá adoptando un canal analógico, puesto que la tarjeta no admite operación continua y cada canal siempre ve un único valor de tensión en su buffer de salida.

✓ Parámetros del objeto Put Single Value.

Cada objeto Put Single Value, como icono relacionado con la adquisición de datos necesita varios parámetros de entrada:

- Manejador de subsistema.

Todos los objetos de adquisición de datos requieren un manejador (hSubsys) como una de sus entradas de datos, para identificar qué subsistema han de usar. Es proporcionado por el icono D/A Config.

- Canal analógico de salida que se asocia con el objeto.
- Valor de tensión que se desea fijar en el canal analógico de salida.

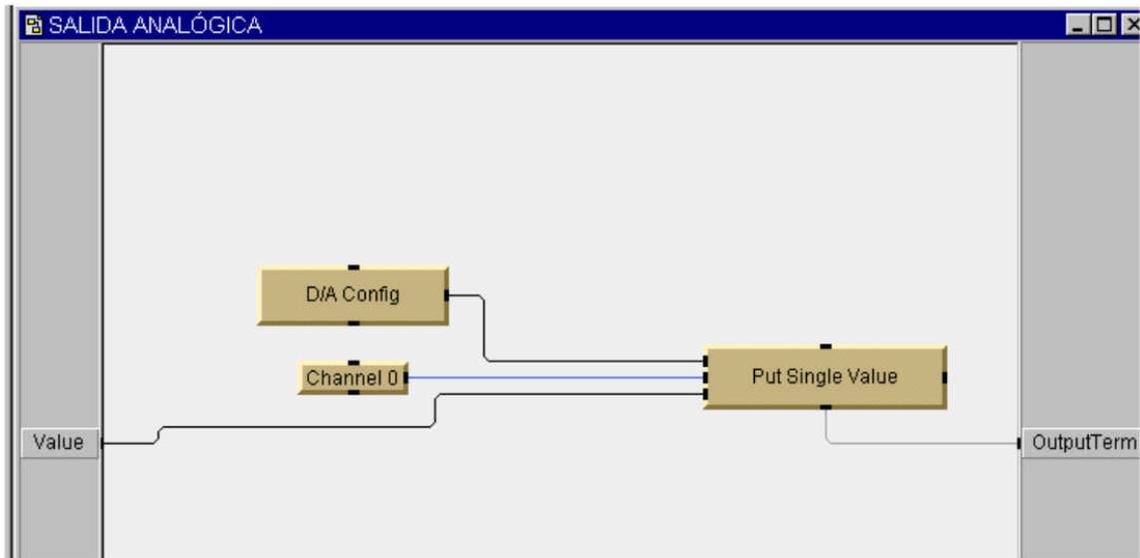


Fig 81 Parámetros necesarios por el objeto de adquisición de datos.

La salida del objeto Put Single Value se conecta a un icono que funciona como indicador en tiempo real de la tensión que está saliendo por cada canal analógico (ver figura 82). El indicador presenta una escala que barre de 0 a 10 voltios, una aguja que señala la tensión en la escala y un campo numérico en el que se puede leer el valor de la tensión. Este display resulta de gran ayuda para comprender el funcionamiento de las bombas, ya que se observa que cuando los niveles de tensión son bajos, el motor de la bomba peristáltica gira lentamente y cuando los niveles de tensión son altos, el motor gira rápidamente y se observa una gran afluencia de flujo en el tubo de salida correspondiente. Resulta orientativo durante la ejecución del programa, para comprobar que el movimiento que se observa en los cabezales de las bombas se corresponde con el que aproximadamente se estima que debe haber con el valor de tensión de control que se muestra en el display y así se tiene una referencia sobre el correcto funcionamiento de las bombas peristálticas.

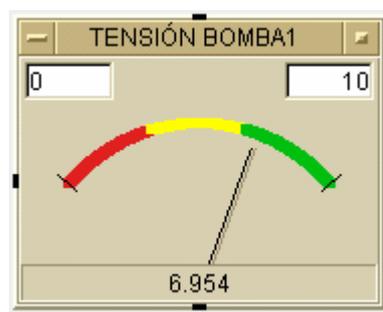


Fig.82. Indicador de la tensión de control que alimenta a la bomba 1.

-
- ✓ Mecanismos para actualizar el Módulo Salida Analógica con nuevos datos de entrada de tensión.
 - Cada cambio de valor de tensión que se produzca en cada una de las entradas del Módulo Salida Analógica, activa instantáneamente el objeto Put Single Value correspondiente, que responde ante cualquier cambio en sus parámetros de entrada. De esta forma Put Single Value actualiza automáticamente el valor de tensión que sale por el canal analógico asociado a dicho objeto.
 - De igual manera, al activarse Put Single Value, su pin de secuencia de salida está conectado al pin de secuencia de entrada del indicador de tensión correspondiente, de modo que se fuerza así el flujo de datos del programa para que cada vez que Put Single Value se active por percibir un cambio en sus entradas, como consecuencia también se active el indicador de aguja para capturar el nuevo valor de tensión y actualizar el dato que muestra.

5.2.7 INTERFAZ DE LA APLICACIÓN CON EL USUARIO.

En el caso de la pequeña aplicación auxiliar `MedidasExperimentales.vee`, diseñada para realizar las mediciones del caudal que proporciona una bomba peristáltica para distintos valores de tensión de control de flujo, el programa estaba formado por un número muy bajo de elementos y en una única pantalla se visualizaban los iconos que conformaban la aplicación. En el caso de la aplicación total que controla el prototipo `AplicaciónLangendorff.vee`, el número de iconos es mucho más elevado, así como la complejidad del programa y el tamaño que ocupa, por lo que el diagrama de flujo total es demasiado extenso para ser visualizado en una única pantalla.

El área que reserva HP VEE para la codificación del programa de usuario se llama Main y no tiene limitación de espacio, las barras alineadas en la parte inferior y derecha de la pantalla permiten la libre extensión del programa y la fácil adición de iconos en cualquier dirección. Dada la extensión de `AplicaciónLangendorff.vee`, una vez diseñada la aplicación, si antes de un experimento se desea cambiar el perfil de criopreservación, las temperaturas de los baños o el flujo máximo que puede admitir el órgano objeto de la criopreservación, resultaría tedioso tener que desplazarse o bien con el cursor o bien con las barras, a través de todas las pantallas que recogen la codificación total de la aplicación e incluso una vez se encontrase la pantalla adecuada, habría que entrar recursivamente en Objetos de Usuario (User Objects) hasta encontrar la variable que deseamos cambiar. Del mismo modo, existiría el mismo problema si se desea visualizar durante la ejecución del programa varios valores y distintas gráficas que no caben en una misma pantalla debido a que no se encuentran próximos entre sí en el diagrama de flujo que constituye la aplicación. Obligaría a la necesidad de moverse en tiempo de ejecución a lo largo de varias de las pantallas que ocupa el programa y excluiría la posibilidad de monitorizar simultáneamente varios valores.

La solución a este problema la presenta el propio programa HP VEE, que además del área de trabajo denominado Main, ofrece simultáneamente un segundo área llamado Panel View, donde aparecen únicamente los objetos del área de trabajo que se hayan seleccionado previamente. De este modo, estos objetos se encuentran fácilmente accesibles y visualizables en una única pantalla.

- ✓ Se seleccionan en Main tanto los valores de entrada y los parámetros que puedan requerir ser cambiados por el usuario antes de la ejecución del programa, como los datos numéricos y las gráficas que en el diseño se han declarado de interés para ser visualizados durante la ejecución.
- ✓ Se decide la incorporación a la pantalla Panel de todos estos objetos con la opción Add to Panel, mediante la ruta de selección Edit → Add to Panel a través del menú de HP VEE.
- ✓ Al elegir esta opción de HP VEE, aparece una copia de todos los objetos seleccionados sobre un fondo gris en la nueva pantalla Panel View que se crea y con el ratón se permite mover los distintos iconos para conseguir la disposición deseada, ya que la pantalla Panel View se convertirá en una atractiva e intuitiva interfaz entre la aplicación y el usuario.

La creación de la nueva pantalla Panel ofrece una nueva vertiente de versatilidad a AplicaciónLangendorff.vee, de manera que si se accede a la aplicación como diseñador se trabaje en la pantalla Main para tener pleno control de los iconos empleados, su interconexión y propiedades, y si se accede a la aplicación como usuario de la máquina de Langendorff, se trabaja con la pantalla Panel View para visualizar fácilmente los datos de interés y acceder en una sola pantalla a los únicos datos que el usuario tiene capacidad de cambiar.

Existe una opción de HP VEE que podemos habilitar o no y que permite que al lanzar la ejecución del programa, aparezca en primer plano tan solo Panel View. Esta será la opción elegida para AplicaciónLangendorff.vee en su presentación como producto final, de modo que la realización concreta de la aplicación resulte transparente al usuario. El usuario sólo percibe una interfaz visual de la aplicación, que le ofrece los datos de interés y le aísla del diagrama de flujo que se ha implementado.

En la pantalla Panel View se disponen de copias de algunos de los iconos empleados al codificar el programa, esto quiere decir que el hecho de que sean visualizados en la pantalla Panel no implica que hayan sido eliminados de la pantalla Main. La conexión entre ambas pantallas es total, si se cambia en la pantalla Panel algún valor de un icono, como por ejemplo una modificación en la tabla de temperaturas de entrada, este cambio se refleja automáticamente en el icono que aparece en Main y viceversa. Por eso la creación de una segunda pantalla resulta de gran utilidad para modificar el valor de las entradas o de algunos parámetros de la aplicación, porque compacta todos los iconos de interés en una única pantalla y cualquier cambio se refleja instantáneamente en el diagrama de flujo total.

Con algún modelo antiguo y poco eficiente de pantalla de ordenador, se podría tener una difícil visualización de la pantalla Panel View de HP VEE, porque la pantalla ofrezca un área de escritorio extremadamente pequeño y aparezcan partes cortadas en las pantallas de HP VEE que se quieren visualizar. Habría que reajustar la resolución y el ancho en las propiedades de la pantalla, o crear una disposición más compacta de los objetos que aparecen en Panel.

Los objetos de AplicaciónLangendorff.vee que se han seleccionado para ser visualizados en la pantalla auxiliar Panel y así servir como interfaz con el usuario, han sido:

✓ Entradas:

- Tabla de puntos de temporización.
- Tabla de temperaturas.
- Tabla de concentraciones.

Acciando accesibles estos tres iconos, el usuario puede elegir el perfil de criopreservación para cada experimento, antes de iniciar la ejecución del programa.

✓ Parámetros:

- Temperatura del baño 1.
- Temperatura del baño 2.
- Temperatura del baño 3.
- Temperatura del baño 4.

Haciendo accesibles estos cuatro iconos, el usuario puede realizar los experimentos con baños de agua y anticongelante que se encuentren a distintas temperaturas de las que establece por defecto la aplicación, y después reflejar estos cambios físicos en las variables pertinentes de la aplicación que controla la máquina de Langendorff, para que ésta opere con los valores actualizados del sistema.

- Constante de tiempo.

El hecho de tener accesible este icono permite instalar la aplicación en un ordenador personal distinto, que no sea necesariamente el ordenador concreto que sirvió para el prototipo de máquina de Langendorff en el laboratorio hospitalario. Al instalar la aplicación en otro ordenador, necesita una nueva calibración del tiempo.

✓ Valores de monitorización:

- Instante inicial del intervalo.
- Instante final del intervalo.
- Temperatura inicial del intervalo.
- Temperatura final del intervalo.

En tiempo real, cuando llegue el instante que da comienzo a nuevo tramo del perfil de criopreservación, caracterizado por un cambio en la concentración y en la velocidad de enfriamiento respecto al tramo anterior, se refrescan estos cuatro valores según corresponda con los datos del nuevo intervalo.

- Temperatura.

Es la temperatura deseada en cada instante para la disolución total, que era precisamente la salida de datos del Módulo Muestreo. El valor mostrado se corresponde en tiempo real con el valor deseado para ese instante.

El Módulo Muestreo, en tiempo real, cada 0.1 minuto actualiza su salida con uno de los valores discretos que han resultado de muestrear la recta de temperaturas que describe, durante el presente intervalo, la velocidad de enfriamiento que se desea. Esta recta empieza en el valor de temperatura mostrado en “Temperatura inicial del intervalo” y termina en el valor que indica “Temperatura final del intervalo”, por lo que el valor que toma “Temperatura” siempre estará entre ambas cotas durante el tiempo que dure el intervalo.

- Caudal Bomba1, Caudal Bomba2, Caudal Bomba3 y Caudal Bomba4.

Es el caudal, medido en ml/min, que en tiempo real se demanda de cada bomba peristáltica.

- Tensión Bomba1, Tensión Bomba2, Tensión Bomba3, Tensión Bomba4.

Es la tensión, medida en voltios, que se debe sacar por cada canal analógico en tiempo real, respectivamente por el canal 0,1,2 y3, para alimentar cada entrada de control de flujo de las bombas. Así la Bomba i puede extraer el líquido de su baño correspondiente a la tasa que marca Caudal i . Es el resultado de haber aplicado al valor de caudal la función de transferencia medida experimentalmente para una bomba peristáltica. Tanto el caudal de la Bomba i como la tensión de control de la Bomba i se refrescan simultáneamente, lo cual da una idea de la alta velocidad computacional de HP VEE, que aplica una función transferencia a un valor en un tiempo inapreciable.

- Gráfica que muestra el perfil de criopreservación elegido para el experimento.

Se van añadiendo sucesivos tramos correspondientes a distintas velocidades de enfriamiento, a medida que pasa el tiempo y se suceden los intervalos.

- Gráfica que muestra la velocidad de enfriamiento que en cada momento la máquina está aplicando al órgano, funcionando en tiempo real.

Esta velocidad de enfriamiento se refresca con la llegada en tiempo real de cada nuevo intervalo.

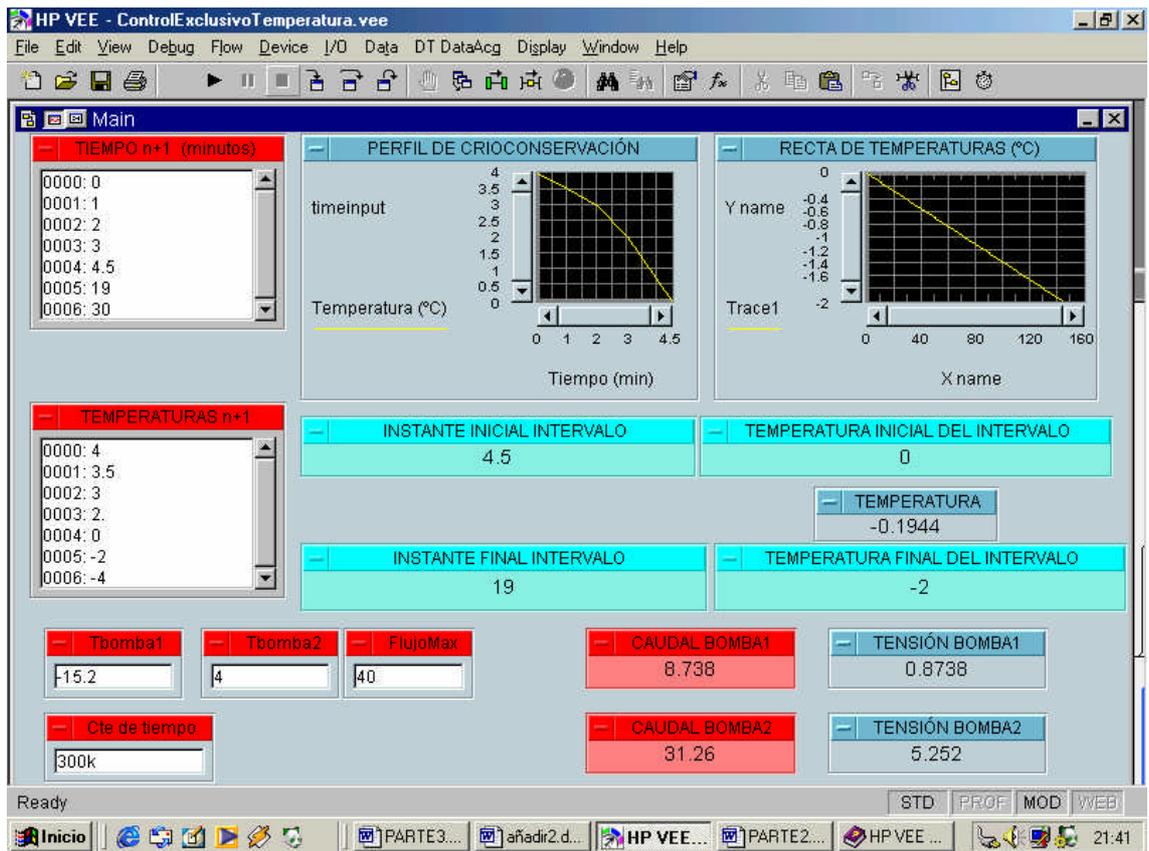


Fig.83 Panel View de la aplicación diseñada para el montaje con 2 bombas.