

R. 17.575

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

de la

esta Universidad desde el día

hasta el día

T.D.
1/1



Sevilla de

de 19

EL DIRECTOR DE

SISTEMA PARA LA ADQUISICION,
ALMACENAMIENTO Y ANALISIS DE
CORRIENTES IONICAS
TRANSMEMBRANA

Juan Urefia López



Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Sevilla, 1987

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 233 número 1 del libro
correspondiente.

Sevilla, - 3 JUN. 1987

El Jefe del Negociado de Tesis,

H. Yolanda Diaz Rolando.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4

41009 - SEVILLA

TELÉFONO (954) 87 15 46

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
FACULTAD DE MEDICINA


D. José López Barneo, Catedrático de Fisiología, y D. Juan Carlos Mateos Pérez, Profesor Titular de Fisiología, hacen constar:

Que han sido co-directores del trabajo titulado: "Sistema para la adquisición, almacenamiento y análisis de corrientes iónicas transmembrana", realizado por D. Juan Ureña López, Profesor Ayudante del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, y que autorizan la presentación de dicho trabajo por D. Juan Ureña López como memoria para la obtención del título de Doctor.

Sevilla, 2 de junio de 1987

Fdo. Juan Carlos Mateos Pérez

Fdo. José López Barneo



A Pilar
y
Macarena

AGRADECIMIENTOS

He de destacar en primer lugar la labor desempeñada por José López Barneo y Juan Carlos Mateos Pérez, co-directores del presente trabajo. Ellos me han iniciado en el campo de la electrofisiología y electrónica, y gracias a la orientación y gran dedicación de ambos, ha sido posible la realización de este proyecto.

Agradezco al Departamento de Electricidad y Electrónica de la Facultad de Física su comprensión en la realización de los Cursos Monográficos de Doctorado y en particular al profesor José Luis Huertas por el tiempo dedicado cuando ha sido solicitada su colaboración.

Al profesor Diego Mir le agradezco su interés por el trabajo, así como su favorable disposición a mi incorporación a la Facultad de Medicina.

Mi agradecimiento al profesor Clay Armstrong de la U. de Pennsylvania, por habernos proporcionado el convertidor A/D empleado en el Sistema de Adquisición.

Gracias a Miguel Herrador y Francisco Sánchez por permitirme acelerar la finalización de la tesis. A Guillermo Alvarez por aportar sus conocimientos fotográficos y a Lucía Tabares por la ayuda prestada en la obtención de las figuras con el "plotter".

Finalmente, gracias a todas las personas del Departamento de Fisiología que, de forma directa o indirecta, han creado a mi alrededor un ambiente propicio para el desarrollo del presente trabajo; en especial a Juan Ribas, por poner a nuestra disposición el osciloscopio digital con el que se han realizado las figuras.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. Fenómenos eléctricos en biomembranas	1
2. Medida de la permeabilidad iónica de la membrana: técnicas de "voltage-clamp".....	4
3. Sistemas de adquisición y análisis	6
OBJETIVOS	8
DISEÑO E IMPLEMENTACION DEL SISTEMA.....	11
1. Descripción general	11
2. Amplificador de "patch-clamp".....	16
3. Generador de Pulsos Programable	19
3.1 Requerimientos generales	19
3.2 Esquema y elementos del diseño	25
3.3 Programa y descripción del sistema	32
4. Sistema de Adquisición.....	43

4.1	<i>Requerimientos generales</i>	43
4.2	<i>Esquema y elementos del diseño</i>	43
4.3	<i>Programa y descripción del sistema</i>	48
4.4	<i>Sustracción lineal</i>	59
5.	Sistema de Representación en Pantalla	61
5.1	<i>Requerimientos generales</i>	61
5.2	<i>Esquema y elementos del diseño</i>	63
5.3	<i>Programa y descripción del sistema</i>	66
6.	Métodos de análisis	72
6.1	<i>Descripción general</i>	72
6.2	<i>Definición de cursores</i>	72
6.3	<i>Operaciones</i>	73
6.3.1	<i>Línea de base</i>	76
6.3.2	<i>Presentación de parámetros</i>	77
6.3.3	<i>Integración</i>	79
6.3.4	<i>Ajuste exponencial</i>	80
	VERIFICACION DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA	81
1.	Verificación general	81
1.1	<i>Generador de Pulsos</i>	82
1.2	<i>Sistema de Adquisición</i>	86
1.3	<i>Sistema de Representación en Pantalla y Análisis</i>	91
2.	Registros de corrientes iónicas	96
	CONCLUSIONES	105
	APENDICES	108
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	139

INTRODUCCION

1. Fenómenos eléctricos en biomembranas.

Las membranas de todas las células animales separan soluciones de diferente composición, lo que da lugar a que existan a través de éstas gradientes de concentración para las especies iónicas más abundantes en los líquidos intra y extracelular (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , etc). Los gradientes iónicos, resultado de la diferencia de los potenciales químicos interno y externo para cada tipo de ión, representan una forma de almacenamiento de energía que al disiparse genera una corriente eléctrica. Estos fenómenos participan de forma importante en funciones celulares diversas como: integración neuronal, propagación y transmisión del potencial de acción, regulación del equilibrio osmótico, secreción, motilidad y proliferación celular, síntesis de ATP, transporte de solutos, etc.

La membranas biológicas están formadas por una matriz lipídica hidrofóbica y, por lo tanto, de muy poca permeabilidad para los iones.

Los coeficientes de difusión para iones de Na^+ y K^+ medidos en bicapas lipídicas artificiales son del orden de 10^{-12} cm^2/s , mientras que en membranas biológicas en reposo son del orden de 10^{-6} - 10^{-5} cm^2/s , y en el axón gigante del calamar durante un potencial de acción alcanzan valores entre 1-10 cm^2/s (Andreoli, Hoffman y Fanestril, 1980; Miller 1986). La mayor permeabilidad iónica de las membranas celulares se debe a la existencia en éstas de proteínas integrales que forman poros o canales hidrofílicos por donde pueden difundir los iones.

La estructura de los canales iónicos es aún poco conocida, existiendo información solamente sobre el canal catiónico asociado al receptor nicotínico para la acetil colina y sobre el canal de Na^+ . En ambos casos son proteínas oligoméricas, que constan de varias subunidades que atraviesan la membrana mediante hélices α formadas por aminoácidos hidrofóbicos (Miller, 1986; Noda y col., 1984; Noda y col., 1986). Desde el punto de vista funcional la mayoría de los canales iónicos son regulables, es decir, pueden pasar de la conformación de "abierto" a la de "cerrado" y de esta forma variar la permeabilidad iónica de la membrana. Un tipo de canales iónicos, los dependientes del potencial de membrana, están cerrados al potencial de reposo de las células (alrededor de -70 mV) y con la despolarización sufren un cambio conformacional que da lugar a que se abran y permitan el paso de iones. A este tipo pertenecen los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} existentes en la mayoría de las células excitables. Otro tipo de canales constan de una molécula receptora a la que al unirse un ligando induce un cambio conformacional que conlleva al paso del estado "cerrado" al de "abierto". En varios casos la unión del receptor al canal activa una cascada de reacciones químicas en el interior de las células con el

consiguiente incremento en la concentración de mediadores intracelulares que son los que inducen el cambio conformacional. En los últimos años se ha demostrado que en diferentes preparaciones los niveles intracelulares de ATP, ADP, AMPc, GTP, diacilglicerol y Ca^{2+} regulan la permeabilidad iónica de la membrana (Miller, 1986; Sakmann y Neher, 1983; Stevens, 1986).

El mecanismo por el que los iones atraviesan la membrana por canales iónicos abiertos es, desde el punto de vista físico-químico, similar a la electrodifusión estudiada en soluciones de electrolitos por Nernst (1888) y Planck (1890 a y b). Basándose en las ecuaciones de los autores antes citados Goldman (1943) y Hodgkin y Katz (1949) enunciaron la ecuación de campo constante, en donde se determina que el flujo de un ión a través de la membrana es una función no lineal de los coeficientes de difusión y de partición de dicho ión, de la concentración intra y extracelular del ión y de la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana. Cada especie iónica se mueve a favor de sus gradientes eléctrico y químico independientemente de otros iones. Aunque esta formulación explica básicamente los fenómenos eléctricos observados en las membranas biológicas, existen desviaciones de estos principios generales como la existencia de saturación en el paso de iones a través de canales, el bloqueo de canales iónicos por iones que no pasan a su través y la competición entre diferentes tipos de iones al difundir a través de un mismo canal (véase Hille, 1984).



2. Medida de la permeabilidad iónica de la membrana: técnicas de "voltage-clamp".

Desde el punto de vista eléctrico, las membranas biológicas se comportan como un circuito RC en paralelo donde la capacidad (C) la forma la bicapa de lípidos, prácticamente impermeable a los iones, y la resistencia (R) los canales iónicos embebidos en la matriz lipídica y por lo tanto en paralelo con ésta. La capacidad, que depende del espesor de la membrana y de su constante dieléctrica, tiene valores muy parecidos en diferentes tipos celulares, desde algas hasta células de mamíferos, y es del orden de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cole, 1968). La resistencia de la membrana depende de la densidad y tipo de canales iónicos existentes en ésta y para una misma membrana del número de canales iónicos abiertos. Este parámetro es por lo tanto muy variable y en el axón del calamar en reposo es de $1000\ \text{Ohm} \times \text{cm}^2$ (Cole, 1968).

El paso de iones a través de la membrana genera una corriente eléctrica transmembrana (I_m) que, en base a la ley de Ohm, puede expresarse como:

$$I_m = G \times (V_m - V_e)$$

donde

G= conductancia de la membrana que es directamente
proporcional a la permeabilidad

V_m = potencial de membrana

V_e = potencial de equilibrio del ión

la conductancia G refleja a su vez el número de canales abiertos ya que su valor viene dado por:

$$G = \gamma \times N$$

siendo

γ = la conductancia de un canal iónico

N = número de canales abiertos en cada instante.

El cálculo de la conductancia de la membrana requiere por lo tanto la medida de la corriente iónica transmembrana y del control del potencial de membrana. Estas medidas se llevan a cabo mediante las técnicas de "voltage-clamp" puestas a punto para el axón gigante del calamar por Cole (1949) y Marmont (1949). Las técnicas de "voltage-clamp", que permiten mantener el potencial de membrana a un valor constante y medir simultáneamente la corriente generada, se han desarrollado considerablemente con la mejora de los circuitos electrónicos integrados y modificado para la aplicación a otros tipos celulares (véanse Cole, 1968; Hille, 1984; López-Barneo, Matteson y Armstrong, 1981). Un avance técnico muy importante lo representa el descubrimiento por Neher, Sakmann y colaboradores (Neher, Sakmann y Steinbach, 1978; Hamill, Marty, Neher, Sakmann y Sigworth, 1981) de la técnica de "patch-clamp" que permite el registro de corrientes iónicas en células pequeñas e incluso el registro de corriente a través de un solo canal iónico. Esta técnica ha hecho posible la realización de medidas de permeabilidad iónica en cualquier tipo celular y abierto un campo casi ilimitado para los estudios electrofisiológicos. En el apartado "Diseño e implementación del sistema", se presenta información más detallada sobre la técnica de "patch-clamp" utilizada en nuestro laboratorio.

Mediante las diferentes técnicas de "voltage-clamp" se han descrito diferentes tipos de conductancias iónicas (para iones de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) existentes en células diversas, analizado sus características cinéticas y estudiado la modulación por ligandos y mediadores intracelulares y el bloqueo, modificación o activación por fármacos (véase Hille, 1984; Miller, 1986; Sakmann y Neher, 1983). En nuestro laboratorio se estudian los fenómenos arriba indicados en células endocrinas (adrenocorticales y paratiroides), en neuronas del sistema nervioso central y en células del sistema inmune (linfocitos y células cebadas).

3. Sistemas de adquisición y análisis.

Los fenómenos eléctricos generados en biomembranas ocurren en un rango temporal de ms, las corrientes iónicas en células de mamíferos son del orden de nA y el análisis cinético cuantitativo de éstas requiere una resolución temporal de varias decenas de μs . Las características antes citadas han limitado los estudios electrofisiológicos cuantitativos hasta que el desarrollo tecnológico y la aparición de los ordenadores permitieron la construcción de sistemas de adquisición, almacenamiento y análisis rápidos y flexibles. La conversión digital y el promediado de las corrientes iónicas en el axón gigante del calamar permitieron el descubrimiento de las corrientes de compuerta debidas al cierre y apertura de los canales de Na^+ (Armstrong y Bezanilla, 1974; Bezanilla y Armstrong, 1977) y el modelado matemático de las diferentes corrientes iónicas (Armstrong, 1981; Hille, 1984). En los últimos años esta tecnología que existía solo en algunos laboratorios se ha puesto mucho más accesible gracias a la aparición de los microprocesadores y

los ordenadores personales basados en éstos. Aunque existen disponibles en el mercado sistemas de conversión analógico/digital adaptados a ordenadores personales de uso común (Data Translation, 1985; Jaeger, 1982; Barney, 1985), en la mayoría de los laboratorios de electrofisiología celular se han desarrollado sistemas con "hardware" y "software" propios adecuados a las necesidades específicas de la experimentación biofísica. El desarrollo e implementación de uno de estos sistemas, objetivo de la presente memoria, ha sido una de las líneas prioritarias de trabajo en nuestro laboratorio en los últimos tres años (Jones, 1986; Mompin, 1980).

OBJETIVOS

El *objetivo general* del presente trabajo ha sido el diseño e implementación de un sistema automatizado para el control del potencial de membrana y la adquisición, almacenamiento, representación en pantalla y análisis de corrientes iónicas generadas en la membrana de células mantenidas en cultivo. El sistema, construido sobre un ordenador personal, es de una gran rapidez y versatilidad y permite su adaptación para el registro y medida en tiempo real de cualquier fenómeno celular que pueda convertirse en una señal eléctrica. El diseño e implementación del sistema se ha llevado a cabo no sólo para satisfacer los requerimientos técnicos necesarios en la investigación biofísica de nuestro laboratorio, sino que el desarrollo del "hardware" y "software" propios ha sido una de los objetivos del trabajo. De esta forma se ha conseguido una independencia tecnológica y potenciado la calidad de la investigación y la capacidad de análisis que son críticas para llevar a cabo una investigación competitiva en biofísica celular.

Los *objetivos específicos* del trabajo han sido los siguientes:

- 1) Diseño e implementación de un generador de pulsos programable necesario para modificar el potencial de membrana con pulsos únicos o con secuencias de pulsos con intervalos variables y polaridad, amplitud y duración seleccionables según los requerimientos experimentales.
- 2) Diseño y construcción de un sistema de adquisición basado en la conversión digital de las señales de corrientes iónicas transmembrana generadas por los cambios del potencial de membrana al aplicar los pulsos referidos en el párrafo anterior. La velocidad de adquisición (de 20 a 200 μ s por muestra) se modifica por programa y una secuencia de muestras (formada por 500 puntos cada uno con resolución de 12 bits) se almacenan en memoria RAM del ordenador o en un disco duro.
- 3) Diseño y construcción de un sistema de conversión digital/analógico de secuencias de muestras almacenadas en RAM o en disco duro del ordenador para su representación en la pantalla de un osciloscopio. Al generar el ordenador la señal de barrido del osciloscopio y representar la secuencia de muestras a una frecuencia superior a 20 Hz se convierte un osciloscopio normal en otro digital con una flexibilidad superior a los osciloscopios digitales existentes. Mediante un segundo canal del osciloscopio se representan también en pantalla funciones matemáticas (exponenciales, derivadas, etc.) generadas en el propio ordenador.
- 4) Desarrollo del programa ANALA, escrito en Basic y en Lenguaje Ensamblador, que controla los elementos del "hardware" indicados anteriormente y que almacena todas las variables experimentales. Mediante diferentes subrutinas este programa realiza el análisis de las señales almacenadas. El análisis se centra fundamentalmente en: medida automática de parámetros (amplitud, duración, intervalos, etc);

confección de diagramas para observar la relación entre dos parámetros; sustracción y promediado de señales; ajuste lineal y exponencial de partes de la señal registrada; integración y diferenciación de la señal; medida automática de capacidad y tamaño de las células; cálculo de la resistencia en serie.

5) Ajuste y comprobación del funcionamiento de cada una de las partes del sistema y en su conjunto utilizando un circuito RC paralelo, equivalente desde el punto de vista eléctrico a la membrana celular, y el registro de corrientes de K^+ en células adrenocorticales en cultivo mediante la técnica de "patch-clamp".

DISEÑO E IMPLEMENTACION DEL SISTEMA

1. Descripción general.

El diseño de la unidad utilizada para la adquisición, almacenamiento y análisis de corrientes iónicas transmembrana se ha realizado en base a un ordenador IBM PC/XT. Esta unidad es adaptable con pequeñas modificaciones al PC/AT y a otros microordenadores con procesadores 8088 y compatibles. La unidad consta básicamente de los siguientes elementos (véase figura 1):

a) Ordenador IBM PC/XT.

Este ordenador contiene un microprocesador 8088 de Intel (Morgan y Waite, 1984; Rector, Rusell y Alexy, 1980), trabajando a una frecuencia de 4.77 MHz . La capacidad de memoria RAM es de 256 Kb, estando la memoria auxiliar del sistema compuesta por un disco fijo de 10 Mb y un disco flexible de 370 Kb. El "hardware" diseñado en el presente trabajo ha sido implementado sobre dos tarjetas prototipo adaptables al canal de entrada/salida (canal E/S, "bus") del ordenador.

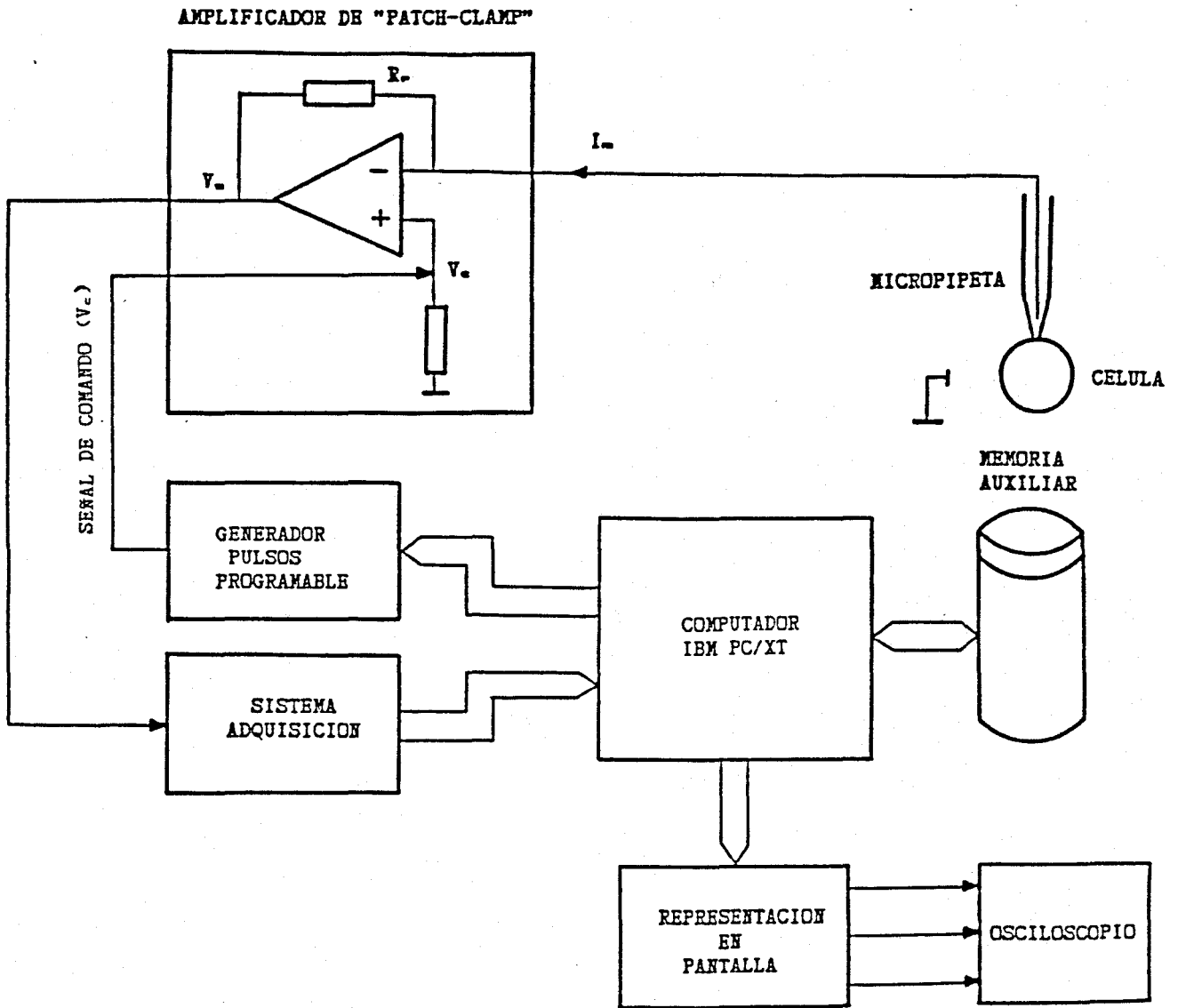


Figura 1. Esquema general del sistema

b) *Sistema de estimulación.*

Los cambios de potencial de membrana necesarios para la activación de conductancias iónicas se obtienen de un generador de pulsos programable (GPP) que proporciona la señal de comando para el amplificador.

c) *Amplificador de "patch-clamp".*

El amplificador se utiliza para el registro y acondicionamiento de corrientes iónicas en células en cultivo y en microáreas de membrana, detectadas mediante electrodos de micropipeta.

d) *Sistema de adquisición.*

Esta etapa convierte a digital la señal analógica registrada por el amplificador con el fin de almacenarla y analizarla digitalmente.

e) *Sistema de representación en pantalla.*

Permite la visualización en pantalla de un osciloscopio de las señales previamente adquiridas.

Una vez dispuesta la preparación celular y seleccionadas las características del patrón de pulso el GPP proporciona la señal de comando (V_c). Esta señal se aplica a la entrada positiva del amplificador operacional del sistema de registro con objeto de controlar el potencial de membrana. De esta forma se activan canales iónicos y se produce una corriente eléctrica (I_m) la cual se registra mediante el convertidor corriente/voltaje (I/V) del amplificador. La señal de salida del convertidor I/V (V_m) se convierte en digital por el sistema de adquisición y se transfiere a memoria RAM para su posterior observación y almacenamiento en disco, o para efectuar sobre ella operaciones de análisis. El número de puntos que se adquieren en cada

barrido es de 500, siendo la velocidad de muestreo (SR) variable y controlable mediante el programa de adquisición.

El sistema de representación en pantalla convierte la matriz de 500 puntos almacenada en RAM en una señal analógica la cual se visualiza directamente en un osciloscopio. Para esta operación se genera una segunda señal de salida que proporciona la onda en diente de sierra que al actuar sobre el amplificador horizontal del osciloscopio lleva a cabo el barrido sincrónicamente con la señal presente en el canal vertical. La señal en la pantalla del osciloscopio puede ser analizada en el momento de su adquisición o posteriormente. En este último caso dicha información se almacena en disco, junto con los parámetros necesarios para realizar su estudio "off-line". El sistema presenta una tercera salida analógica con objeto de poder aplicar a otro canal vertical del osciloscopio una matriz digital previamente almacenada o generada por el ordenador.

Las funciones realizadas por el sistema descrito se muestran esquemáticamente en el diagrama de flujo de la figura 2. En primer lugar se introducen los parámetros generales del experimento tales como: nombre del directorio, ganancia del amplificador de "patch-clamp", potencial de reposo y frecuencia de muestreo. A continuación, siguiendo un proceso lógico de actuación, se procede a la entrada de datos particulares del estímulo seleccionado (amplitudes y duraciones de los pulsos) para iniciar el proceso de estimulación y adquisición. Finalizado éste, el programa presenta la información adquirida en pantalla de un osciloscopio procediéndose a su almacenamiento en disco.

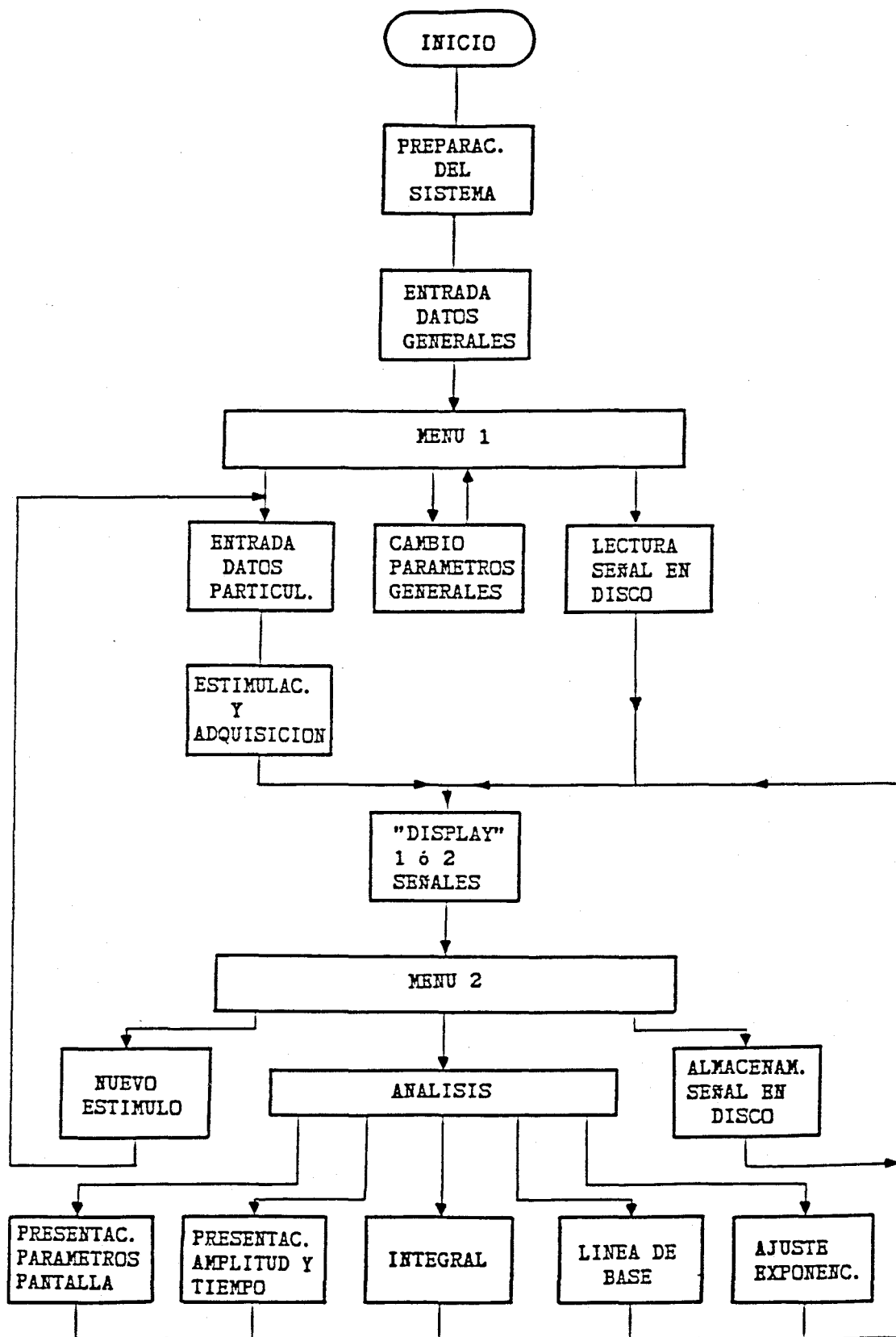


Figura 2. Esquema general de las funciones realizadas por el sistema

El análisis que se lleva a cabo con la señal registrada, consta básicamente de la siguientes posibilidades:

- definición de la línea de base
- presentación en pantalla de los parámetros generales y los particulares del estímulo
- presentación en pantalla de amplitudes y tiempos
- ajuste matemático de un intervalo de señal
- cálculo del área encerrada por la curva

Opcionalmente se puede proceder a la representación de una señal en pantalla del osciloscopio previamente almacenada en disco duro, o bien aplicar un estímulo con características diferentes para realizar un experimento posterior.

En el Apéndice I se muestra el diagrama de flujo general del programa utilizado, así como el significado de las diferentes opciones a ejecutar desde las fases de estimulación, adquisición y análisis.

2. Amplificador de "patch-clamp".

El amplificador de "patch-clamp" se utiliza para el registro y acondicionamiento de las corrientes eléctricas generadas en la membrana. Consta esencialmente de un convertidor corriente/tensión (véase figura 3), compuesto de un amplificador operacional (Burr Brown OP 111) y una resistencia de realimentación R_f de 10 G Ω o de 100 M Ω situados en el "head stage", cerca de la preparación que se pretende estudiar. Con R_f

de $100 \text{ M}\Omega$ se registran corrientes totales en la configuración "whole-cell" (Hamill y col. 1981). Con la R_r de $10 \text{ G}\Omega$, el nivel de ruido del sistema (0.2 pA pico a pico), permite registrar corrientes del orden de pA , que son las que resultan del paso de iones a través canales únicos.

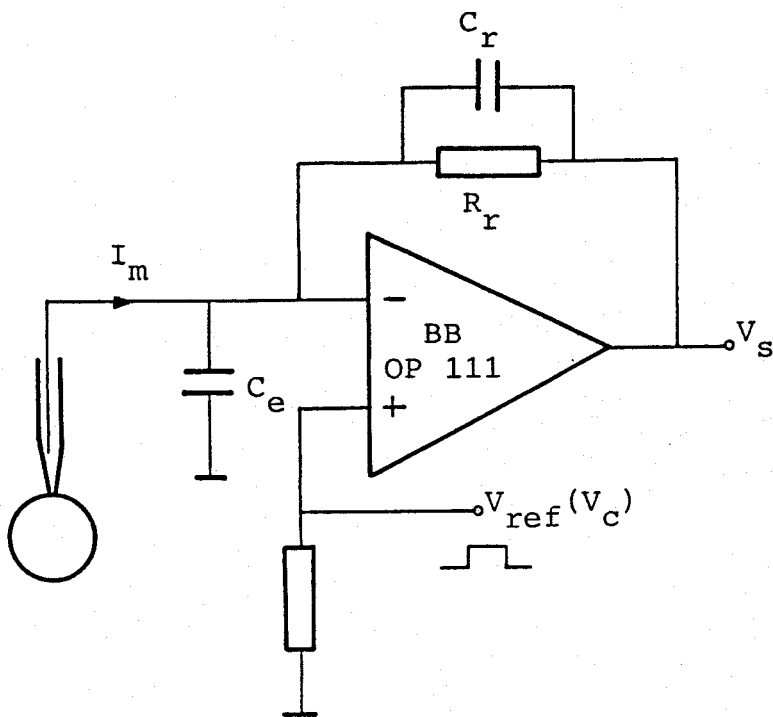


Figura 3. Etapa de entrada del amplificador de "patch-clamp".

Para el registro de corrientes iónicas con las técnicas de "patch-clamp", se establece un sello entre una pipeta pulida con fuego de $0.2\text{-}1\mu$ de diámetro y el exterior de la membrana. La zona de contacto entre el microelectrodo y la membrana debe tener una alta resistencia

($R_m > 10^9 \Omega$), para que el parche de membrana quede aislado por el electrodo. Bajo estas condiciones, la corriente a través de la zona de membrana sellada es captada en su totalidad, sin apenas existir desplazamiento de iones a través de la zona de contacto y el ruido del sistema de registro disminuye en un orden de magnitud (Hamill y col. 1981, Tabares 1986).

El mismo amplificador utilizado como convertidor I/V (Budak, 1974; Graeme, Yobey y Huelsman, 1971), se utiliza para controlar el potencial en el área de membrana aislada por la pipeta. Con este fin, se aplica a la entrada positiva del amplificador la tensión V_{ref} , constituida por pulsos rectangulares o por un valor constante (figura 3).

El amplificador de "patch-clamp" dispone de un sistema para compensación de las capacidades de la pipeta y de entrada al convertidor I/V, las cuales producen transitorios en la corriente cuando comienza y acaba el pulso V_{ref} . La respuesta en frecuencia del amplificador está limitada por la capacidad C_r asociada a la resistencia de realimentación R_r , que junto con el resto de la capacidad a la entrada del amplificador (véase figura 3), hacen que la salida del convertidor I/V aparezca con una constante de tiempo del orden de 1 ms. Este efecto se compensa sumando a la señal de salida del convertidor su primera derivada (véase Sigworth, 1983).

3. Generador de Pulsos Programable.

3.1 Requerimientos generales.

El generador de pulsos se utiliza para modificar el potencial de membrana bajo control y de este modo activar las conductancias dependientes del voltaje. En los estudios de "voltage-clamp" se requieren diversos tipos o protocolos de pulso, los cuales permiten analizar diferentes características cinéticas de cada tipo de corriente iónica. El formato general de los diferentes protocolos se muestra en la figura 4. Consta de un *prepulso PP* con duración DP y amplitud AP y un *pulso P* de duración D y amplitud A . Opcionalmente, el pulso puede ir seguido de una serie de *pulsos de substracción* (PS_1, \dots, PS_n) en número variable ($n=1,2,4$). La amplitud de estos pulsos es la n -ésima parte de la amplitud del pulso P , su duración igual a la de éste y polaridad opuesta. El pulso y prepulso están separados por un intervalo IN , siendo el tiempo entre los pulsos de substracción del orden de 50 ms. Esta última característica no es crítica para los requerimientos del sistema.

Las características temporales del protocolo, tales como, duración del pulso y prepulso e intervalo, pueden variar entre 1-1000 ms, siendo controlada mediante el programa. Las amplitudes del pulso y del prepulso oscilan entre -2560 y 2540 mV, las cuales se dividen por 10 en el amplificador de "patch-clamp" antes de ser aplicada al interior de la pipeta de registro.

Se exponen a continuación los seis protocolos más usados en nuestro laboratorio y sus diferentes aplicaciones electrofisiológicas. Se pueden obtener no obstante, cualquier otro patrón de pulso necesario en casos

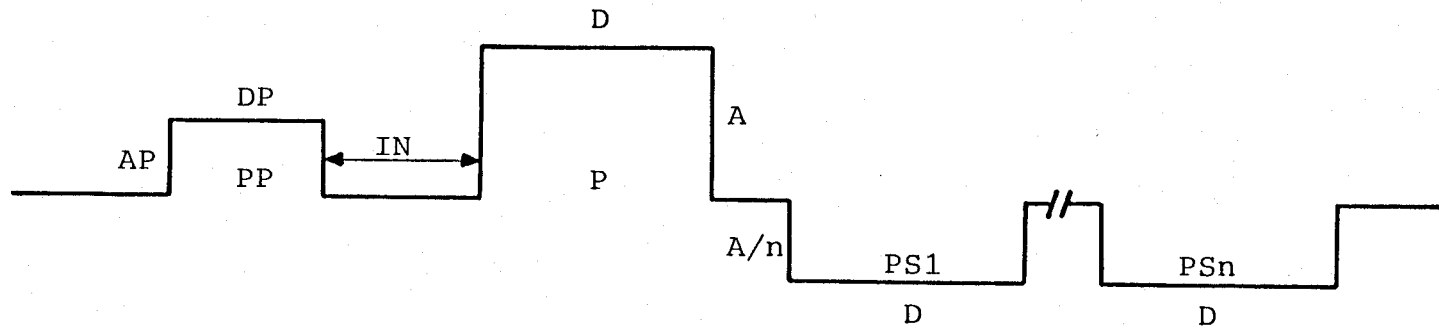


Figura 4. Forma general del estímulo.

particulares. La selección de cada uno de ellos se realiza desde el teclado numérico, mediante la pulsación de los siguientes caracteres:

<u>Num. Protocolo</u>	<u>Carácter a pulsar</u>
1	1
2	2
3	3
4	4
5	6
6	7

A continuación, y en base a la figura 5, se describe cada uno de ellos:

Protocolo nº 1. (Fig. 5a).

- Aplicaciones electrofisiológicas. Medida de resistencia de sello (R_m) y de la resistencia de entrada de la célula en configuración de "whole-cell clamp".

- Características

Pulso:

Amplitud: 100 mV.

Duración: 2 ms.

Inicio de conversión: punto I (1 ms antes de comenzar la generación del pulso).

Protocolo nº 2. (Fig. 5b).

- Aplicaciones electrofisiológicas. Se utiliza para estudiar la activación de conductancias iónicas dependientes del potencial de membrana y el tiempo, así como para la construcción de curvas corriente/voltaje.

- Características

Pulso:

Amplitud A(± 2500 mV.)

Duración D(1-1000 ms.)

Pulsos de substracción: opcional (n=0,1,2,4)

Inicio de conversión: punto II (8 puntos antes del inicio del pulso de "test").

Protocolo nº 3. (Fig. 5c).

- Aplicaciones electrofisiológicas. Prepulso y pulso separados por un intervalo variable. Se usa para estudiar la recuperación de la inactivación de una corriente iónica.

- Características

Prepulso:

Amplitud AP(± 2500 mV.)

Duración DP(1-1000 ms.)

Pulso:

Amplitud A(± 2500 mV.)

Duración D(1-1000 ms.)

Intervalo IN(1-1000 ms.)

Pulsos de substracción: opcional

Inicio de conversión: punto II (8 puntos antes del inicio del pulso de "test".)

Protocolo nº 4. (Fig.5d)

- Aplicaciones electrofisiológicas. Efecto de prepulso de amplitud y duración variables sobre corrientes generadas por un pulso "test" de parámetros constantes. Se utiliza para estudio de inactivación de corrientes iónicas en estado estacionario.

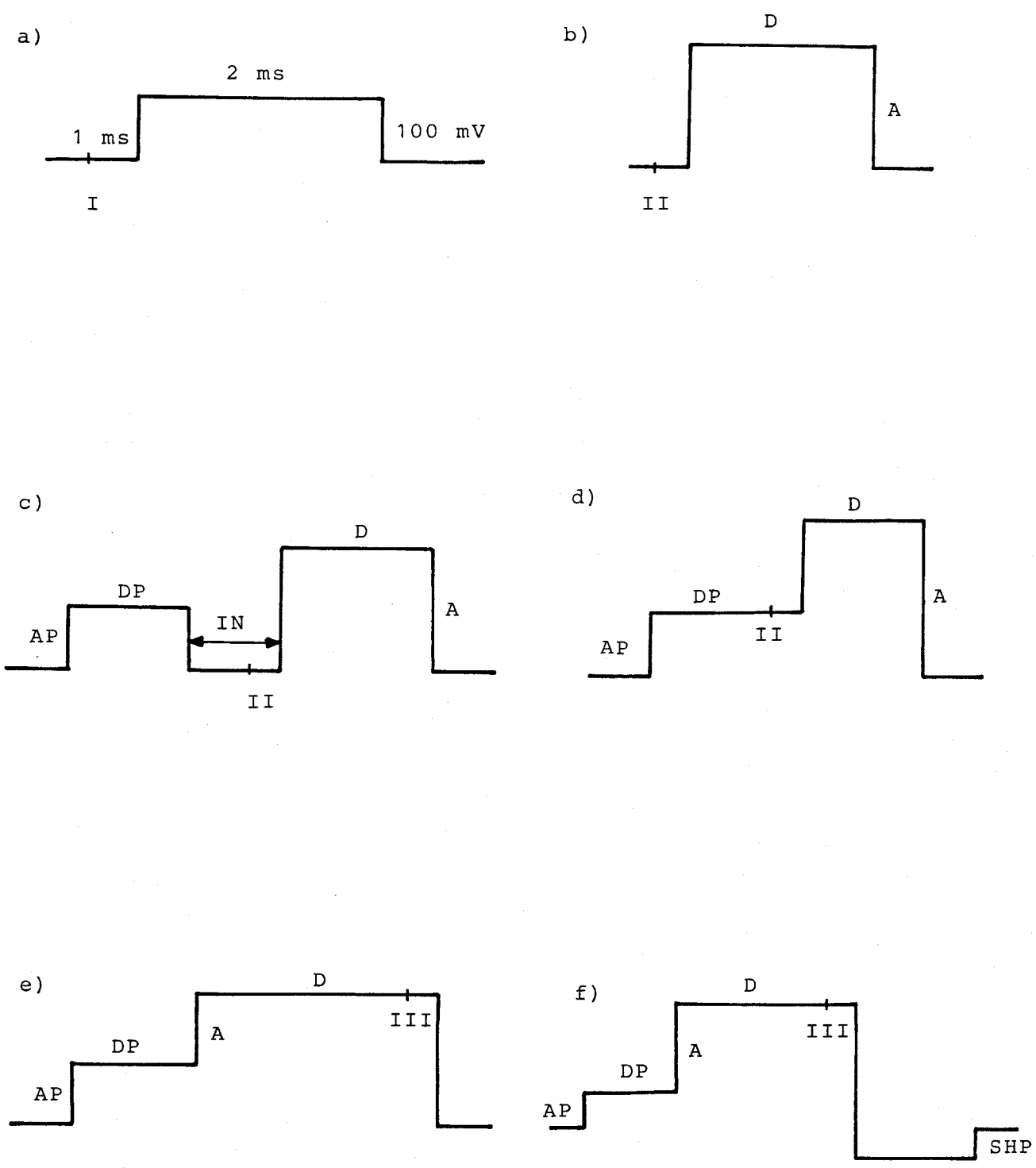


Figura 5. Protocolos particulares producidos por el Generador de Pulsos.

- Características

Prepulso:

Amplitud AP (± 2500 mV.)

Duración DP (1-1000 ms.)

Pulso:

Amplitud A (± 2500 mV.)

Duración D (1-1000 ms.)

Pulsos de substracción: opcional

Inicio de conversión: punto II (8 puntos antes del inicio del pulso de "test".)

Protocolo nº 5. (Fig.5e)

- Aplicaciones electrofisiológicas. Estudio de corrientes de cierre ("tail currents") activadas por un pulso que puede ir precedido de un prepulso.

- Características

Prepulso:

Amplitud AP (± 2500 mV.)

Duración DP (0-1000ms.)

Pulsos:

Amplitud A (± 2500 mV.)

Duración D (1-1000 ms.)

Inicio de conversión: punto III (8 puntos antes de finalizar el pulso "test".)

Protocolo nº 6. (Fig.5f)

- Aplicaciones electrofisiológicas. Idénticas al protocolo 5, pero con la posibilidad de poder variar el potencial de membrana al cual ocurre

el cierre de canales iónicos. Se usa para estudio de cinética de cierre a diferentes potenciales de membrana.

- Características idénticas al anterior pero al finalizar la generación del pulso, la amplitud del mismo permanece constante durante 200 ms, a una tensión llamada "sub-holding potential" (SHP), antes de volver a la línea de base.

3.2 Esquema y elementos del diseño.

El generador de pulsos programable (GPP) se ha construido sobre una Tarjeta Prototipo IBM PC/XT, según el esquema que se muestra en la figura 6 y cuyos componentes se relacionan en el apéndice IV. A continuación se describen sus elementos básicos.

3.2.1 Tarjeta Prototipo IBM PC/XT.

En esta tarjeta (nº ref. 150140) se incluye el GPP además de los elementos que forman el Sistema de Adquisición. En ella se dispone de las señales del canal E/S del microcomputador (véase figura 7) y las conexiones entre los elementos lógicos necesarias para efectuar la interfase con los dispositivos E/S, como indica el diagrama de bloques de la figura 8. Las direcciones asignadas en el IBM PC/XT para esta Tarjeta Prototipo van desde 300H hasta 31fH. Para una descripción más detallada de la lógica de la interfase véase el "Technical Reference Manual" para IBM PC/XT.

3.2.2 Interfase Periférica Programable (IPP 8255A).

La IPP 8255A (NEC Microcomputers, Inc.) es una Interfase Periférica Programable (IPP) compuesta de un registro control (RC) y tres puertas direccionables de forma independiente; puerta A (PA), puerta B (PB) y puerta C (PC) (NEC Microcomputers, IC Master, 1980). El acceso a cada

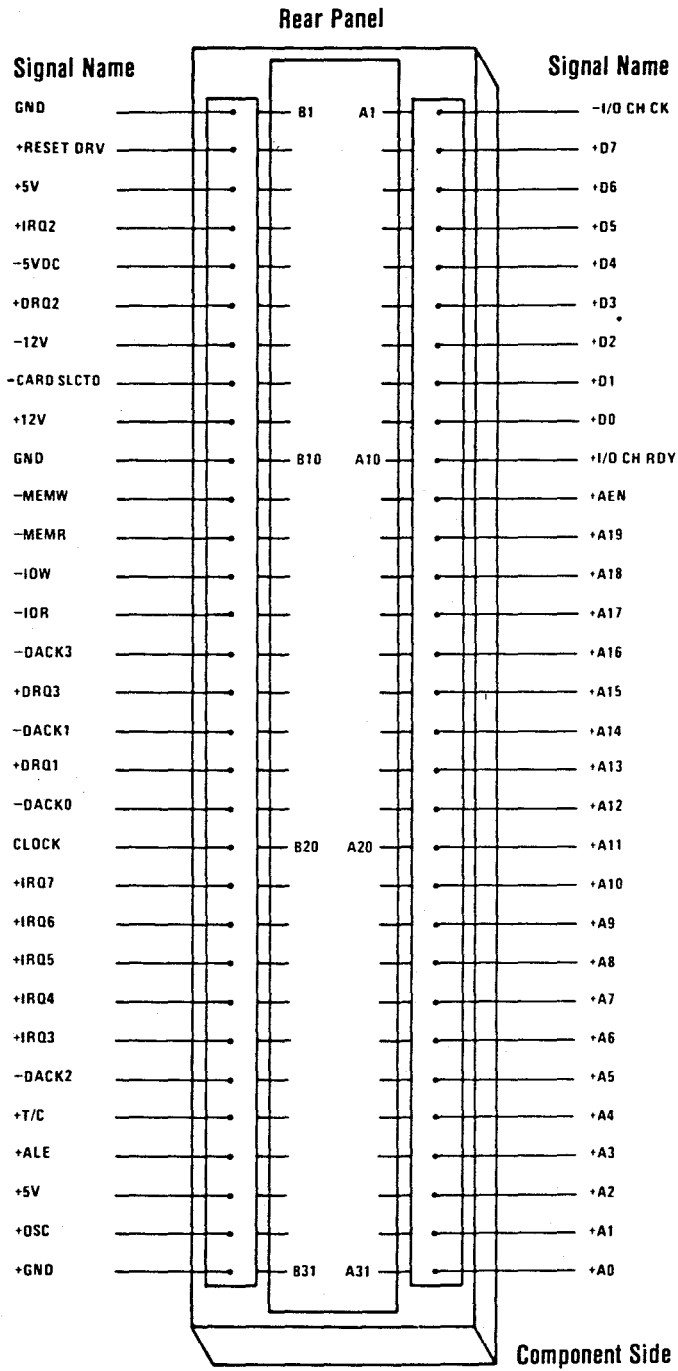


Figura 7. Señales contenidas en el canal de E/S del computador.

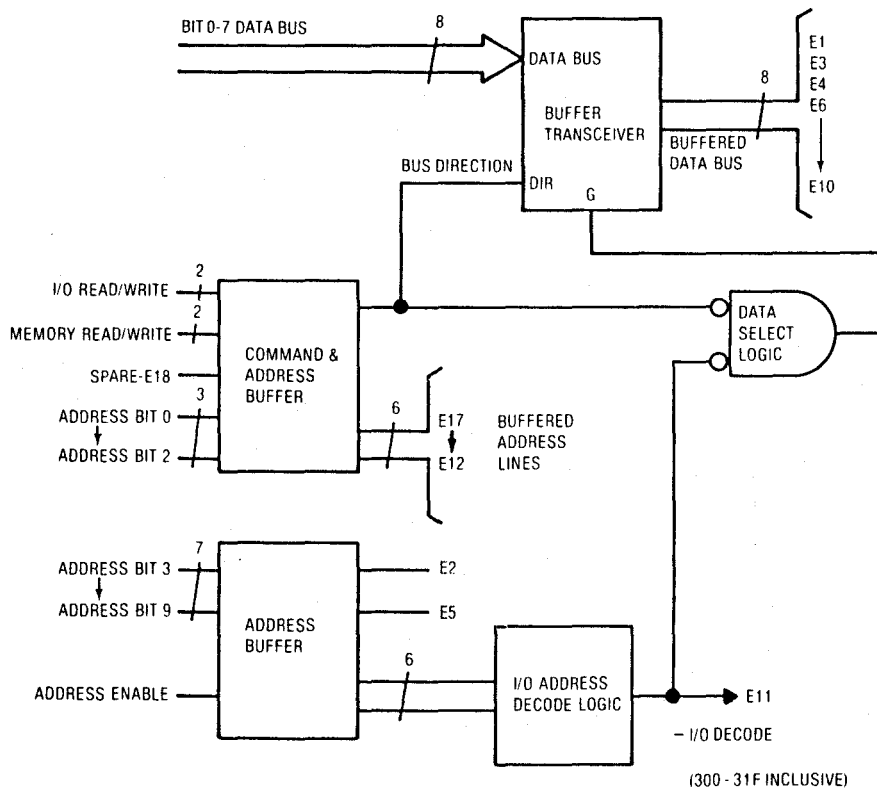


Figura 8. Diagrama de bloques de la Tarjeta Prototipo.

uno de los cuatro registros se lleva a cabo mediante los bits de control A1 y A0 (véase figura 6).

La selección de esta interfase se realiza activando la señal "chip-select" (CS); el flujo de los datos está determinado por las señales RD y WR, las cuales se activan mediante "software" con las instrucciones "IN" y "OUT" respectivamente. La ejecución de la instrucción "IN" transfiere el contenido del "bus" de datos a cualquier registro de la interfase IPP. La instrucción "OUT" realiza la operación inversa. D0-D7 constituye el "bus de datos".

A continuación se presentan las transferencias que se pueden realizar con la interfase según las señales activadas (Liu y Gibson, 1986).

<u>A1</u>	<u>A0</u>	<u>RD</u>	<u>WR</u>	<u>CS</u>	<u>Descripción de la transferencia</u>
0	0	0	1	0	Del PA al Bus de Datos
0	1	0	1	0	Del PB al Bus de Datos
1	0	0	1	0	Del PC al Bus de Datos
0	0	1	0	0	Del Bus de Datos al PA
0	1	1	0	0	Del Bus de Datos al PB
1	0	1	0	0	Del Bus de Datos al PC
X	X	X	X	1	D7...D0 en estado de alta impedancia
X	X	1	1	0	D7...D0 en estado de alta impedancia
1	1	1	0	0	Del Bus de Datos a RC, siempre que D7=1

Si D7=0, la información contenida en el bus de datos es tratada como una instrucción "set/reset" sobre un determinado bit de la Puerta C. Los bits D3-D1 del bus de datos, indican en forma binaria el bit de la PC sobre el que se va a efectuar la acción "set/reset". El valor del

bit D0 determina la acción de "set" (1) o "reset" (0). El resto de los bits no son significativos.

Los bits de las tres puertas están divididos en dos grupos que pueden ser tratados independientemente. El Grupo I formado por los 8 bits de la PA y los 4 bits más significativos (4 MSBs) de la PC, y el Grupo II constituido por los 8 bits de la PB y los 4 bits menos significativos (4 LSBs) de la PC.

La interfase 8255A puede operar de tres formas distintas. El *modo 0* permite operaciones de entrada y salida sobre las puertas A, B y C. El *modo 1* utiliza la señal "strobe" para operaciones de entrada y salida sobre las puertas A y B con "handshaking" a través de la puerta C. El *modo 2* se aplica solo al Grupo I, proporcionando mediante la señal "strobe" operaciones de entrada y salida para la puerta A. Los bit 3-7 de la PC se usan para interrupciones y "handshaking". El modo de trabajo (0,1,2) viene determinado por el contenido del registro control RC. En la descripción que sigue del GPP se ha utilizado el *modo 0*.

En este caso, todas las puertas han sido programadas de salida, para lo cual, la palabra enviada al registro control, mediante la instrucción "OUT", es 10000000b. La PB se ha utilizado para presentar la información a la entrada del convertidor digital/analógico. El bit 6 de la puerta C (PC6) se emplea para disparar el monoestable M1 del sistema de adquisición, e iniciar el proceso de muestreo-conversión. La transición "high-low" del PC6 se realiza con la operación "reset", para lo cual se lleva al RC el octeto 00001100b (Peatman, 1977).

Se han asignado a los cuatro registros de la IPP las siguientes direcciones, de las disponibles para la Tarjeta Prototipo (Technical Reference Manual IBM PC/XT, 1983):

REGISTROSDIRECCIONES

PA	300H
PB	301H
PC	302H
RC	303H

3.2.3 Convertidor digital-analógico (DAC 0808).

El DAC 0808 (National Semiconductor) es un convertidor D/A de 8 bits conectado en modo bipolar. Se ha empleado un amplificador operacional para transformar la salida del convertidor de intensidad a tensión. El valor de ésta (V_o), atendiendo al diagrama general de la figura 6, puede expresarse de la forma siguiente:

$$V_o = \frac{V_{ref} * R_5}{R_{v1}} \left(\frac{PB7}{2} + \dots + \frac{PB0}{256} \right) - \frac{V_{ref} * R_5}{R_{v2}}$$

donde PB7 es el bit más significativo de la PB de la IPP.

La tensión de referencia $V_{ref}=7.837$ V, se ha obtenido a partir de una fuente de tensión estabilizada mediante un diodo zéner.

Los valores de salida están asociados al contenido de la PB de la forma siguiente:

<u>V_o (mV)</u>	<u>PB (decimal)</u>
-2560	0
0	128
2540	255

El sistema puede por lo tanto generar pulsos con una resolución de 20 mV, lo cual permite a nivel celular aplicar estímulos de amplitud

variable en incrementos de 2 mV (Analog Devices, Data Acquisition Components and Subsystems, 1980).

3.2.4 Decodificador - Demultiplexor (74LS154).

El 74LS154 (National Semiconductor) es un decodificador-demultiplexor de 4-16 líneas y sirve para activar la señal CS de las interfases programables correspondientes al GPP y al Sistema de Adquisición. Las entradas al decodificador son los bits de direcciones A2, ... , A9 y la señal "address enable" (AEN), (véase figura 6). La salida Y0 se activa para las direcciones 300H, 301H, 302H y 303H asignadas a los distintos registros de la interfase del generador de pulsos (TTL Data Book, 1980).

3.3 Programa y descripción del sistema.

El programa principal "Anala.Bas" carga inicialmente en el segmento de memoria 1C00H el fichero PRUEBAF, escrito en lenguaje máquina (Microsoft Corp., 1981). Este fichero contiene todas las subrutinas que controlan al GPP. En el Apéndice II se presenta un listado del programa y de las subrutinas contenidas en PRUEBAF.

Las operaciones que se realizan desde programa se muestran en la figura 9 las cuales se describen a continuación. En primer lugar el sistema se dispone con unas condiciones iniciales consistentes en programar la interfase en *modo 0*, situar el PC6 en estado lógico "H" y llevar la salida del GPP a cero voltios. Estas operaciones se realizan con la SUBRTI que se ejecuta al comienzo del programa "Anala.Bas" (véase Apéndice II).

A partir de este momento, y tras la creación del directorio donde se almacenarán como ficheros las corrientes iónicas generadas en la

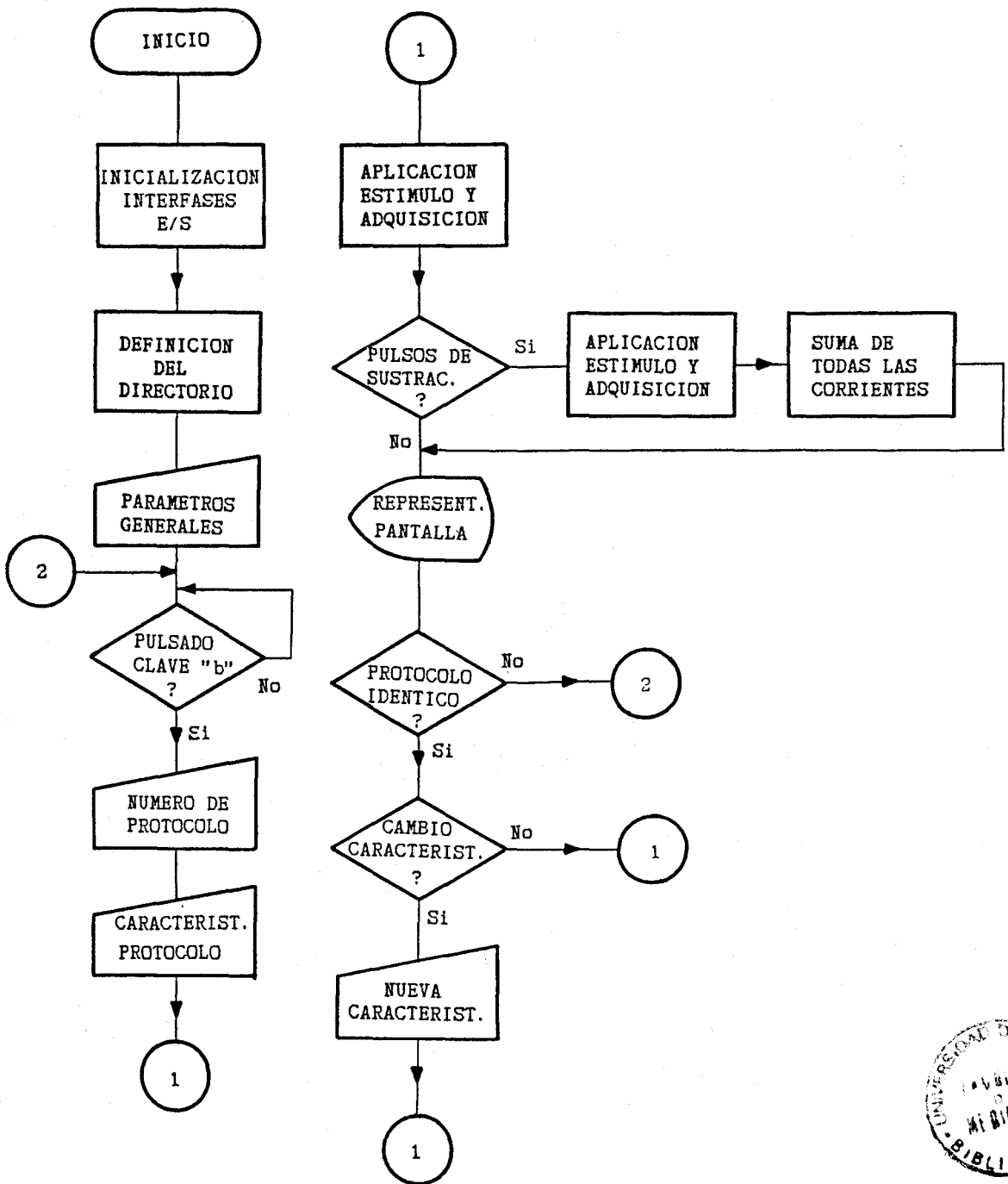


Figura 9. Diagrama de flujo del Generador de Pulsos Programable.



membrana (Microsoft Corp., 1984), el programa principal solicita los siguientes parámetros:

Parámetros generales

- Potencial de reposo (HP)
- Ganancia del amplificador de "patch-clamp" (GC=1,2,5,10)
- Velocidad de muestreo (SR)
- Número de pulsos de substracción (N)

Parámetros particulares del protocolo del GPP

- Número de protocolo (B\$)
- Amplitud del prepulso (AP)
- Duración del pulso (D)
- Amplitud del pulso (A)
- Duración del prepulso (DP)
- Duración del intervalo (IN)
- "Sub-holding potential" (SHP)

Una vez suministrados los datos del protocolo, se procede a la generación del mismo, conjuntamente con la adquisición y almacenamiento en RAM de la respuesta. A continuación, y como se muestra en la figura 9, se lleva a cabo la representación en osciloscopio de la señal registrada. Este proceso puede reiterarse modificando algún parámetro del protocolo (véase Apéndice I).

La ejecución de los protocolos se realiza mediante la ejecución de las siguientes subrutinas:

Protocolo 1	-----	SUBRT1
Protocolos 2,3 y 4	-----	SUBRT2
Protocolos 5 y 6	-----	SUBRT3

Con el fin de poder llamar a estas subrutinas desde Basic, es necesario realizar una serie de operaciones particulares con el fichero que las contiene. En el Apéndice III se presentan todos los pasos llevados a cabo con este fin desde que se escribe el programa con el Editor (Bradley, 1984; Manual de Basic IBM PC/XT, 1983). El funcionamiento detallado de estas subrutinas se muestra en los listados correspondientes en lenguaje ensamblador, contenidos en el Apéndice II.

La generación del pulso se realiza básicamente mediante lazos de espera ejecutados con la instrucción "LOOP", en número proporcional a la duración del mismo. El diagrama de la figura 10, muestra este procedimiento. La subrutinas en lenguaje ensamblador, constan de tres fases principales que son:

a) *Transferencia de parámetros desde Basic.*

Como las características temporales y de amplitud de los distintos protocolos, excepto el número 1, pueden ser variables, los valores que las definen deben ser introducidos desde Basic. Estos parámetros son transferidos a la subrutina correspondiente a través de la sentencia de Basic "CALL" desde el programa "Anala.Bas". La posición de los argumentos de la función "CALL" se referencian en ensamblador sumando un desplazamiento positivo al registro BP del microprocesador, después de que la subrutina llamada mueva el puntero de pila (SP) actual a BP. Por lo tanto, las primeras instrucciones de las subrutinas serán:

```
PUSH BP ; salva el contenido del registro BP
```

```
MOV BP,SP ; se lleva el contenido de SP a BP
```

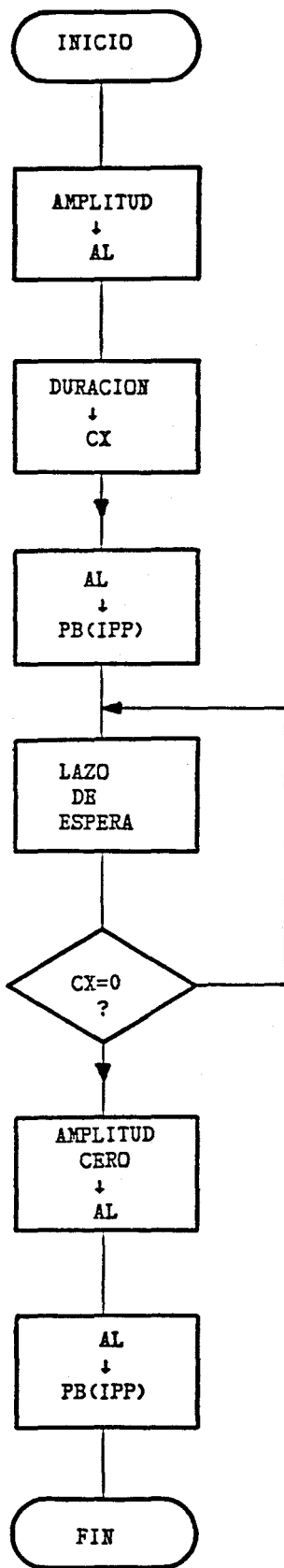


Figura 10. Esquema básico para la generación del pulso.

El desplazamiento dentro de la pila de un determinado argumento se calcula :

$$\text{Desplazamiento de BP} = 2 * (n - m) + 6 \quad (1),$$

donde

n = número de argumentos transferidos

m = posición del argumento en la lista (m = 1,2,...,n), contando desde la izquierda.

Así pues, para llevar al registro SI del microprocesador, la dirección del argumento situado en la última posición en la lista de argumentos de la sentencia "CALL", se ejecuta la instrucción MOV SI, [BP]+6, siendo 6 el desplazamiento dentro de la pila, obtenido en la expresión (1) haciendo m = n. Análogamente se podrían llevar las direcciones de otros argumentos dentro de la lista.

Cuando se acaba la subrutina, se debe ajustar la pila al valor que tenía al inicio de la misma, operación que se lleva a cabo con la instrucción "POP BP". Finalmente, el regreso a Basic se realiza con la sentencia "RET k", siendo k dos veces el número de argumentos en la lista (Manual de Basic IBM PC/XT, 1983; Plouin, 1984).

b) Generación de la amplitud del pulso.

El argumento asociado a la amplitud de la salida al GP se obtiene a partir de la expresión

$$\text{AMP} = \text{CINT}((\text{AM}+256)/2) \quad (2)$$

donde:

AM es la amplitud deseada dividida por 10 expresada en mV

y la función "CINT", toma la parte entera del operando.

Siempre que este valor entero sea llevado a la PB de la IPP, se generará una tensión a la salida del convertidor D/A que variará desde -2560 mV (AMP=0) a 2540 mV (AMP=255), siendo la salida de 0 mV cuando AMP=128. Esta tensión es la que se aplica a la entrada positiva del convertidor I/V del amplificador de "patch-clamp", después de ser dividida por 10.

Las instrucciones que se han usado en ensamblador para realizar esta operación son las siguientes:

MOV DX,301H ; lleva al registro DX la dirección de la PB

MOV AL,AMP ; transfiere al registro AL el valor del argumento
asociado a la amplitud del pulso

OUT DX,AL ; comienza la generación del pulso

c) Control de la duración del pulso.

Los valores temporales de los protocolos (duración del pulso D, duración del prepulso DP e intervalo IN), que varían entre 1-1000 ms, se obtienen mediante lazos de espera controlados por "software". Sin embargo, este método en el IBM PC/XT presenta tres limitaciones importantes a considerar, que modifican el tiempo total del lazo de espera:

1.- Cada 72 ciclos de reloj, el controlador de DMA usa 5 ciclos para refresco de memoria dinámica. Este hecho se puede tener en cuenta con el factor 77/72 cuando se calcula el número de ciclos del lazo.

2.- El reloj del "time of day" interrumpe la ejecución del programa 18.2 veces/s. Este tiempo puede considerarse despreciable, dado el rango de duración de los pulsos que se pretenden generar.

3.- Los tiempos de ejecución tabulados de las instrucciones del microprocesador 8088, no considera normalmente el hecho de que la máxima velocidad de transferencia en la cola de instrucciones del 8088 es de un "byte" por cuatro ciclos de reloj. Este factor ha de tenerse en cuenta en nuestro caso, ya que la instrucción "LOOP", salta a una posición anterior de memoria y hace que la cola de instrucciones se vacíe. Este tiempo de llenado de cola se calcula, pues, multiplicando por 4 el número de "bytes" de la instrucción a la que se accede con "LOOP" (Sargent y Shoemaker, 1985).

Con el fin de estudiar la precisión del método empleado en la generación de las duraciones temporales, se analiza a continuación el programa que actúa como núcleo central en los lazos de espera que determina las diferentes duraciones de pulsos.

Haciendo referencia al diagrama de la figura 6, para generar un pulso cualquiera, la información binaria asociada a la amplitud del mismo, ha de ser mantenida en el registro de la puerta B de la IPP, entrada del convertidor D/A, durante un tiempo prefijado. El programa núcleo empleado, que efectúa tal operación se muestra en la figura 11.

Dado que el rango de duraciones de los pulsos oscila entre 1-1000 ms, se ha empleado la instrucción "IMUL AX", como básica en el lazo, ya que su tiempo de ejecución, 128-154 ciclos de reloj, es suficientemente elevado. Como la duración exacta de la instrucción depende del contenido del operando, se carga el acumulador antes de entrar en el lazo con un valor constante.

```

SUBRT   PROC   FAR
        PUSH   BP
        MOV    BP, SP
        CLI
        MOV    DX, 301H
        MOV    DI, [BP+6]
        ;Se almacena en el registro CX el
        ; número de veces que se ejecuta el
        ; lazo
        MOV    CX, [DI]
        MOV    AL, 230
        ;Comienza la generación del pulso
        OUT   DX, AL
        MOV   AX, 1
A:      IMUL  AX
        LOOP  A
        MOV   AL, 128
        MOV   DX, 301H
        OUT  DX, AL
        ;Finaliza la generación del pulso
        STI
        POP   BP
        RET   2
SUBRT   ENDP

```

Figura 11. Programa básico para controlar la duración de un pulso.

Teniendo en cuenta el número de ciclos de ejecución de las instrucciones, así como los procesos descritos en los puntos 1 y 3, el número de ciclos teóricos asociados al lazo de espera de la figura 11 vale :

$$NC = (CX*(M+17)+8)*77/72$$

donde:

M es el número de ciclos de la instrucción "IMUL AX"

CX es el número de veces que se ejecuta el lazo

Como el tiempo exacto de ejecución de la instrucción "IMUL AX" no es conocido, se ha efectuado una estimación experimental de la duración del lazo de espera.

Los valores experimentales obtenidos para las diferentes duraciones de los pulsos se muestran en la tabla I. La duración media del lazo resulta ser de 31.44 μ s, con una desviación estándar de 46.2 ns/ciclo, lo que representa un error relativo medio de 0.15 % por lazo. Esto permite determinar el número de ciclos (N_c) necesarios para obtener una duración D, expresada en ms, a través de la relación empírica siguiente:

$$N_c = D*1000/31.44$$

Evaluando esta expresión para valores de duraciones comprendidas entre 1 y 1000 ms, se encuentra un error relativo medio del 0.17 % con un valor máximo del 0.39 %.

TABLA I. Valores de la duración del lazo empleado en el programa de la figura 11.

<u>CX</u>	<u>Duración media (ms)</u>	<u>Duración lazo (µs/lazo)</u>
32	1.007	31.47
160	5.04	31.50
320	10.05	31.40
480	15.10	31.46
1600	50.38	31.46
12800	401.80	31.40
19200	602.60	31.39
25600	804.20	31.41
32000	1006.00	31.44

4. Sistema de Adquisición.

4.1 Requerimientos generales.

Las señales eléctricas que se registran en el laboratorio, consisten en corrientes debidas al flujo de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.) a través de la membrana celular. Estas corrientes se producen como respuesta a una excitación del tipo escalón o pulso rectangular. Las características temporales de estas señales eléctricas exigen disponer de varias frecuencias de muestreo en el Sistema de Adquisición (Cherry, 1980; Travis, 1984), con objeto de poder analizar los diversos tipos de corrientes, así como estudiar procesos biofísicos de diferentes cursos temporales en cada una de ellas.

El Sistema de Adquisición diseñado permite operar con velocidades de muestreo seleccionables desde teclado, si bien se utilizan fundamentalmente 20, 50, 100 y 200 μs por muestra (Fleming, 1986). En todos los casos, se adquieren 500 puntos para representar la señal.

4.2 Esquema y elementos del diseño.

El funcionamiento del Sistema de Adquisición utiliza el computador IBM PC/XT como elemento de control de los pulsos de muestreo y conversión. El principio de diseño se muestra en el esquema de la figura 12.

El inicio del proceso de conversión se realiza mediante de una orden generada en el sistema de estimulación, sincronizada con la excitación aplicada (véase el apartado 3.1). Una vez efectuado el muestreo y conversión, se procede al almacenamiento del dato en los

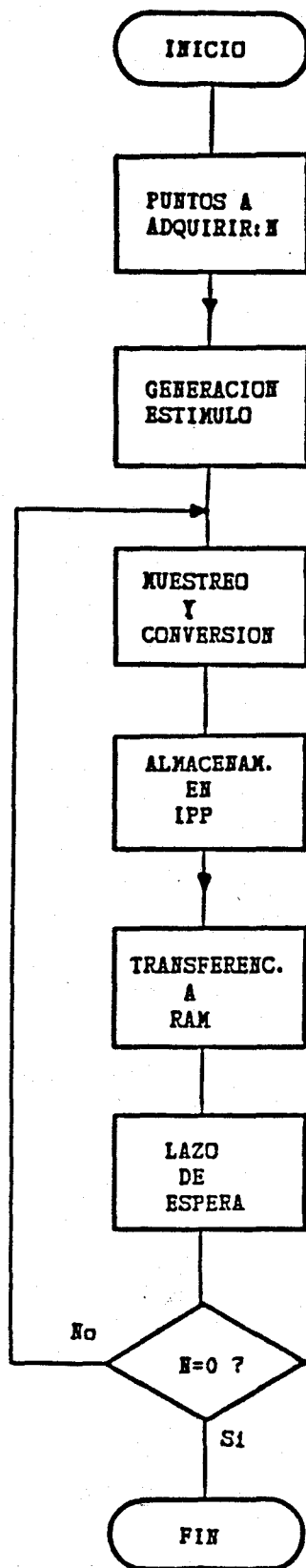


Figura 12. Diagrama de flujo para control del proceso de adquisición y almacenamiento de señales.

registros de la interfase para su posterior transferencia a memoria RAM del ordenador. El proceso se inicia de nuevo tras una pausa determinada por un lazo de espera, cuya duración depende de la frecuencia de muestreo.

La figura 13 muestra la implementación electrónica de la etapa de adquisición, cuyos componentes se relacionan en el apéndice IV. A continuación se describen sus elementos básicos (Jaeger, 1982):

4.2.1 Convertidor analógico-digital (AD578).

El AD578 (Analog Devices) es un convertidor analógico/digital de alta velocidad con un tiempo de conversión nominal de 5.6 μ s. Tiene un resolución de 12 bits y está conectado en modo bipolar para admitir tensiones entre -5 y 4.9976 V. Para facilitar las operaciones en RAM con la señal digitalizada, ésta se almacena en complemento a dos (Analog Devices, Data Book, 1984).

4.2.2 "Sample and Hold" (AD346).

El AD346 (Analog Devices) es un "sample and hold" de alta velocidad (2 μ s a 0.01%), con un "settling time" de 500 ns (Analog Devices, Data Book, 1984).

4.2.3 Interfase Periférica Programable (IPP 8255A).

La IPP 8255 (Nec. Microcomputers, Inc.) ha sido programada para trabajar en modo 1. Con este objeto, el byte enviado al registro control (RC) mediante la instrucción "OUT" es 10111111b, llevándose a cabo operaciones de entrada mediante "strobe" sobre las puertas A, B y "handshaking" a través de la puerta C.

Cuando el bit cuatro de la puerta C (PC4) recibe un pulso "strobe", los datos de la puerta A se almacenan en un "buffer" de entrada, al mismo tiempo que el bit 5 de la puerta C (PC5) pasa a "1"



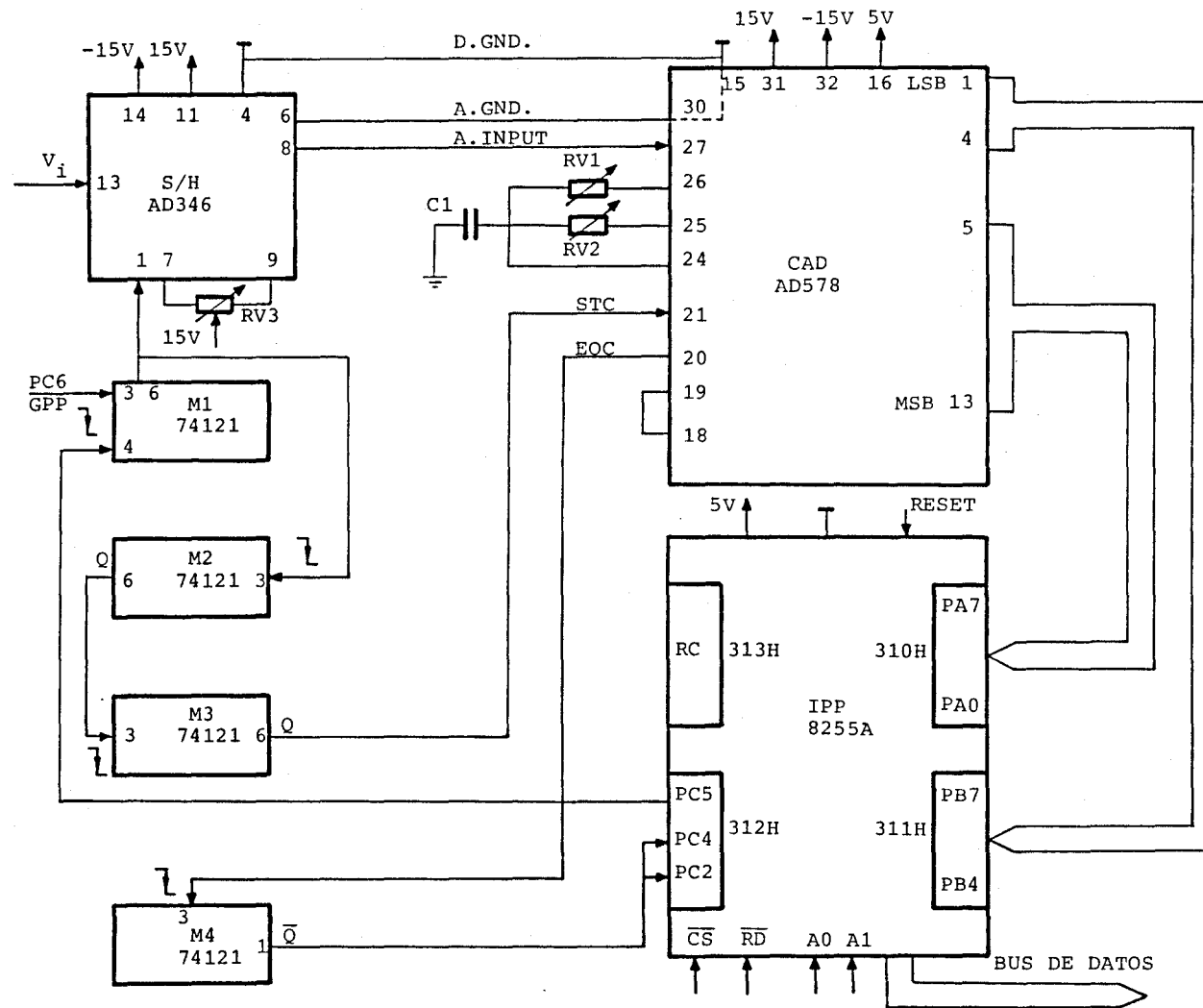


Figura 13. Diagrama general del Sistema de Adquisición.

indicando que la información ha sido almacenada en dicho registro. Cuando los datos son extraídos de la puerta A este bit pasa a cero, indicando que ésta puede recibir más información. Idéntico papel desempeñan PC2 y PC1 para la puerta B, como se muestra en la figura 14.

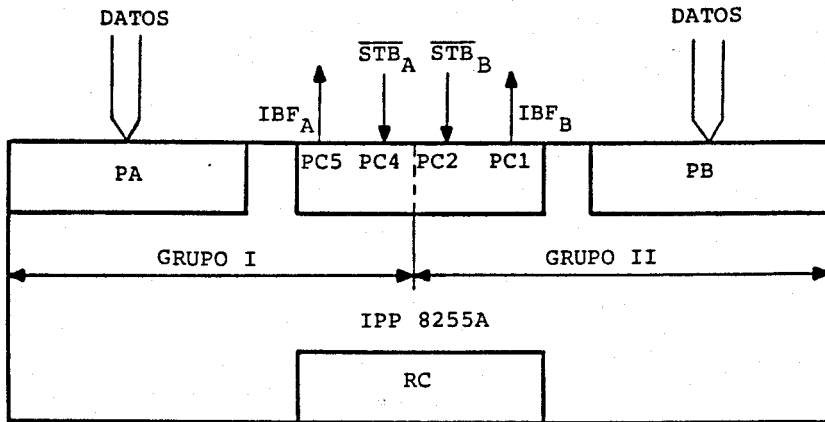


Figura 14. Disposición de la interfase 8255A en modo 1 de operación.

La selección de esta interfase se realiza activando la entrada CS mediante el decodificador de 1-16 líneas 74LS154, utilizado para la selección de la IPP asociada al generador de pulsos.

En este caso, se emplean las direcciones siguientes:

<u>REGISTROS</u>	<u>DIRECCIONES</u>
PA	310H
PB	311H
PC	312H
RC	313H

4.2.4 Monoestables (74121 National Semiconductor).

- Monoestable M1. Genera pulsos de 2 μ s de duración para el muestreo de la señal analógica (TTL Data Book, 1980).

- Monoestable M2. Tiene como misión retrasar el inicio de conversión 500 ns, evitando de esta forma el "settling time" del "sample and hold" (Datel Intersil, Data Acquisition and Conversion Handbook, 1981).

- Monoestable M3. Genera el impulso de inicio de conversión (STC).

- Monoestable M4. Genera una señal "STROBE", al final de conversión, con el fin de almacenar en la interfase los datos presentes en las puertas de entrada A y B.

4.3 Programa y descripción del sistema.

4.3.1 Descripción general.

Las señales que se registran corresponden a corrientes eléctricas debidas al flujo de iones generados por las células durante la aplicación de un pulso, o bien, las producidas durante el cierre de canales iónicos inmediatamente después de finalizar el pulso. En este segundo caso la duración de las corrientes no es superior a 200 ms.

La figura 15 muestra esquemáticamente los instantes para comienzo de conversión en estos dos tipos de estudios. En ambos casos se adquieren 8 puntos antes del inicio de la corriente de interés, dejando 492 puntos para la definición de la corriente generada.

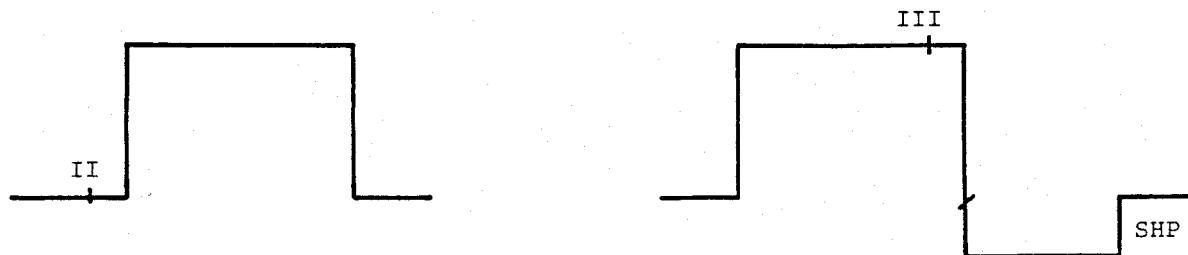


Figura 15. Inicios de conversión empleados en las diferentes subrutinas.

El procedimiento llevado a cabo para efectuar simultáneamente el proceso de adquisición y almacenamiento, así como la generación del patrón de pulsos se describe en la figura 16. Estas operaciones se ejecutan mediante la subrutina SUBRTP, a la cual acceden las subrutinas SUBRT2 y SUBRT3 que generan los protocolos. SUBRT2 inicia la conversión en el punto II y SUBRT3 en el punto III.

Ambas subrutinas son llamadas desde Basic conteniendo, de forma general, los siguientes parámetros:

- Puntos a adquirir durante la generación del pulso (PI).
- Puntos que restan por adquirir tras la generación del pulso (PR).
- Tiempo de espera, después de acabar la adquisición, para llevar la salida del Generador de Pulsos a la línea de base (0 V) (TR).
- Dirección de almacenamiento de la señal en RAM (D1).
- Parámetro identificativo de la frecuencia de muestreo (CO).
- Características que definen el protocolo (A, D, AP, DP, IN, SHP).

En ambos casos, después de la adquisición de 8 puntos, se lleva a cabo un cambio en la amplitud de la señal estímulo. El nuevo valor permanece a la salida del Generador de Pulsos el tiempo que indique la duración del pulso cuando sea utilizada SUBRT2 o durante 200 ms en SUBRT3.

En la SUBRT2, dependiendo del valor de la duración del pulso (D), la SUBRTP efectúa operaciones ligeramente distintas, como se muestra en la figura 16.

a) $D \geq SR * 0.492$

donde:

SR = velocidad de muestreo ($\mu\text{s}/\text{muestra}$)

D = duración del pulso (ms)

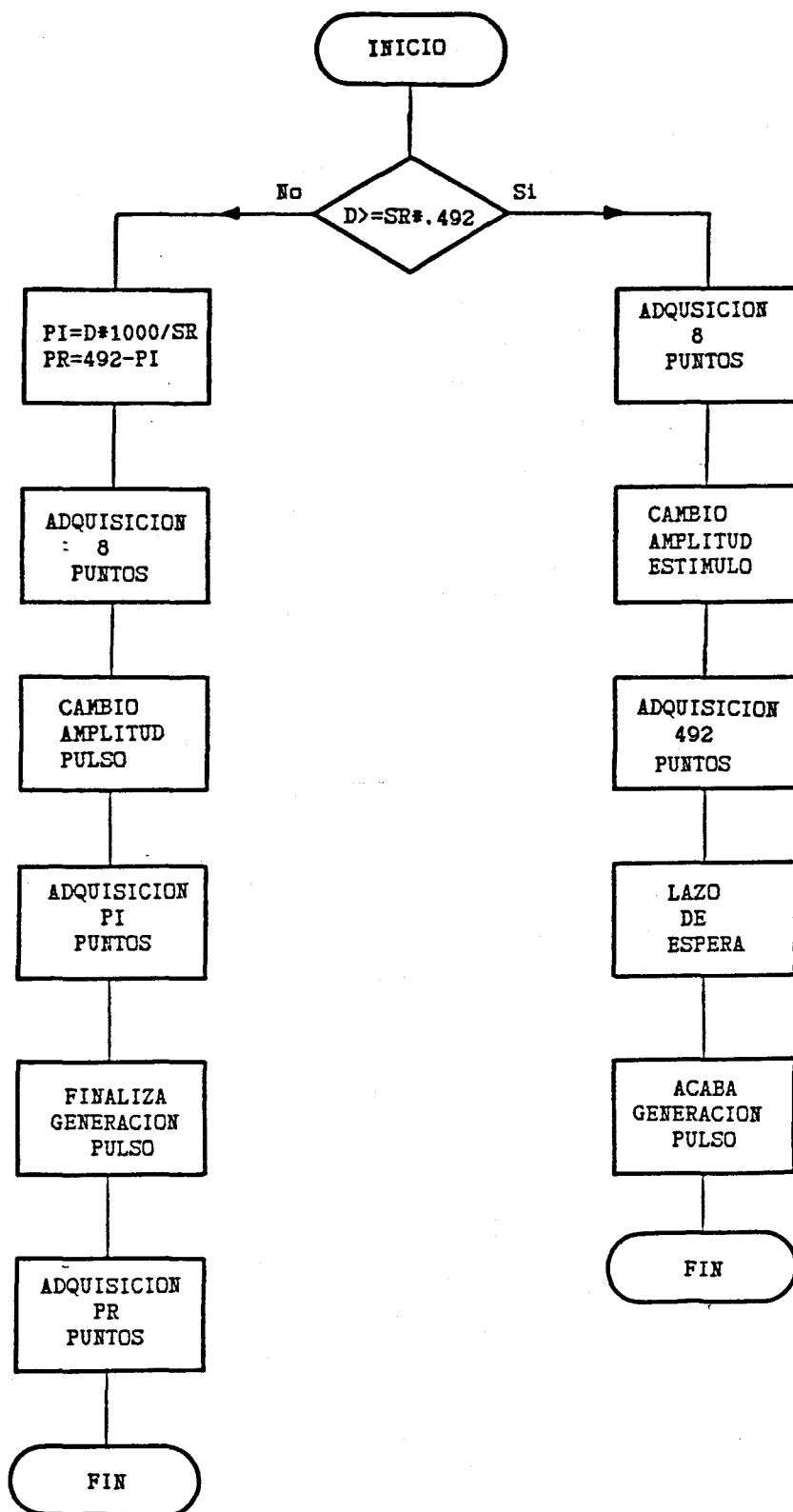


Figura 16. Diagrama de flujo de la subrutina de adquisición SUBRTP.

Inicialmente se adquieren 8 puntos de la señal y posteriormente, 492 puntos tras el cambio en la amplitud del estímulo; esperando a continuación el tiempo que resta para la finalización del protocolo. Para SUBRT2, este tiempo viene dado por la expresión:

$$TR = D - SR * 0.492$$

b) $D < SR * 0.492$

El proceso se inicia de la misma forma que el caso anterior con la adquisición de 8 puntos, seguido de la generación del pulso. Mientras que se realiza éste proceso, se procede a la adquisición de un número de puntos dado por:

$$PI = D * 1000 / SR$$

tras lo cual, se finaliza la generación del estímulo y se adquieren los puntos restantes PR:

$$PR = 492 - PI$$

En SUBRT3, el proceso seguido es similar al descrito anteriormente en el caso a), ya que el periodo de análisis máximo (100 ms), no supera los 200 ms. que es el tiempo de actuación de esta fase. En este caso, el valor de TR viene dado por la expresión:

$$TR = 200 - SR * 0.492$$

Para una correcta ejecución de SUBRTP, las variables VAR, VAR1, VAR2, VAR3 y los registros AH y DI empleadas en su ejecución, deben contener la siguiente información:

Registro	AH:	Amplitud del pulso			
"	DI:	Dirección de almacenamiento de la señal			
Variable	VAR:	Valor del argumento CO			
"	VAR1:	"	"	"	TR
"	VAR2:	"	"	"	PI
"	VAR3:	"	"	"	PR

La SUBRT1 asociada al protocolo número 1, no ha sido incluida en el anterior estudio por tener unas características distintas. En ella, inicialmente se adquieren 50 puntos antes de comenzar a generarse el pulso. A continuación, mientras se aplica éste durante 2 ms, se adquieren 100 puntos, finalizándose la operación con la adquisición de los 350 puntos restantes. Siempre que esta subrutina sea empleada, la velocidad de muestreo SR será de 20 μ s.

En este caso, el único argumento contenido en la llamada a SUBRT1, es la dirección de almacenamiento de la señal en memoria RAM, puesto que los demás parámetros son constantes.

4.3.2 Conversión y almacenamiento.

El proceso de conversión y almacenamiento de la señal se realiza mediante las subrutinas SUBRTA y SUBRTAL, que controlan y sincronizan el sistema de adquisición.

Estas subrutinas emplean los registros DI, SI, CX, y DX para disponer de la siguiente información:

a) registro DI: contiene la dirección de almacenamiento de los puntos a adquirir. Con este fin, se define en Basic la matriz R1 que

almacena los 500 puntos. Su localización en memoria viene determinada por el argumento D1

b) registro SI: debe almacenar la dirección de un argumento que indique la velocidad de muestreo. Se utiliza solo en SUBRTAL

c) registro CX: contiene el número de puntos a adquirir. Su valor es variable y ha sido determinado en el apartado 4.3.1

d) registro DX: almacena la dirección de la puerta A de la Interfase Periférica Programable.

En el Apéndice II, se presenta el listado de ambas subrutinas (SUBRTA Y SUBRTAL), y en la figura 17 un diagrama de flujo mostrando las operaciones que se realizan, las cuales se describen a continuación de forma general.

Una vez efectuada la inicialización de la IPP para que trabaje en Modo 1, y situar a "1" el bit 6 de la puerta C (PC6) de la interfase del Generador de Pulsos, se inicia el muestreo de la señal analógica mediante la operación "reset" del mismo. El resto de los pulsos de muestreo se generan mediante la transición "H-L" del bit 5 de la puerta C de la IPP del Sistema de Adquisición.

Las principales formas de onda que se dan en los distintos elementos del Sistema de Adquisición, se muestran en el diagrama temporal de la figura 18. La conversión se inicia cuando el pulso generado en el monoestable M1, dispara al monoestable M3 iniciándose la conversión. Al final de la misma, la señal EOC pasa a cero y el monoestable M4 produce la señal "strobe", provocando el almacenamiento de los datos correspondientes a la última conversión en la puertas A y B de la interfase. Esta operación hace que el bit 5 de la puerta C (PC5) y el bit 1 (PC1) pasen a "1".

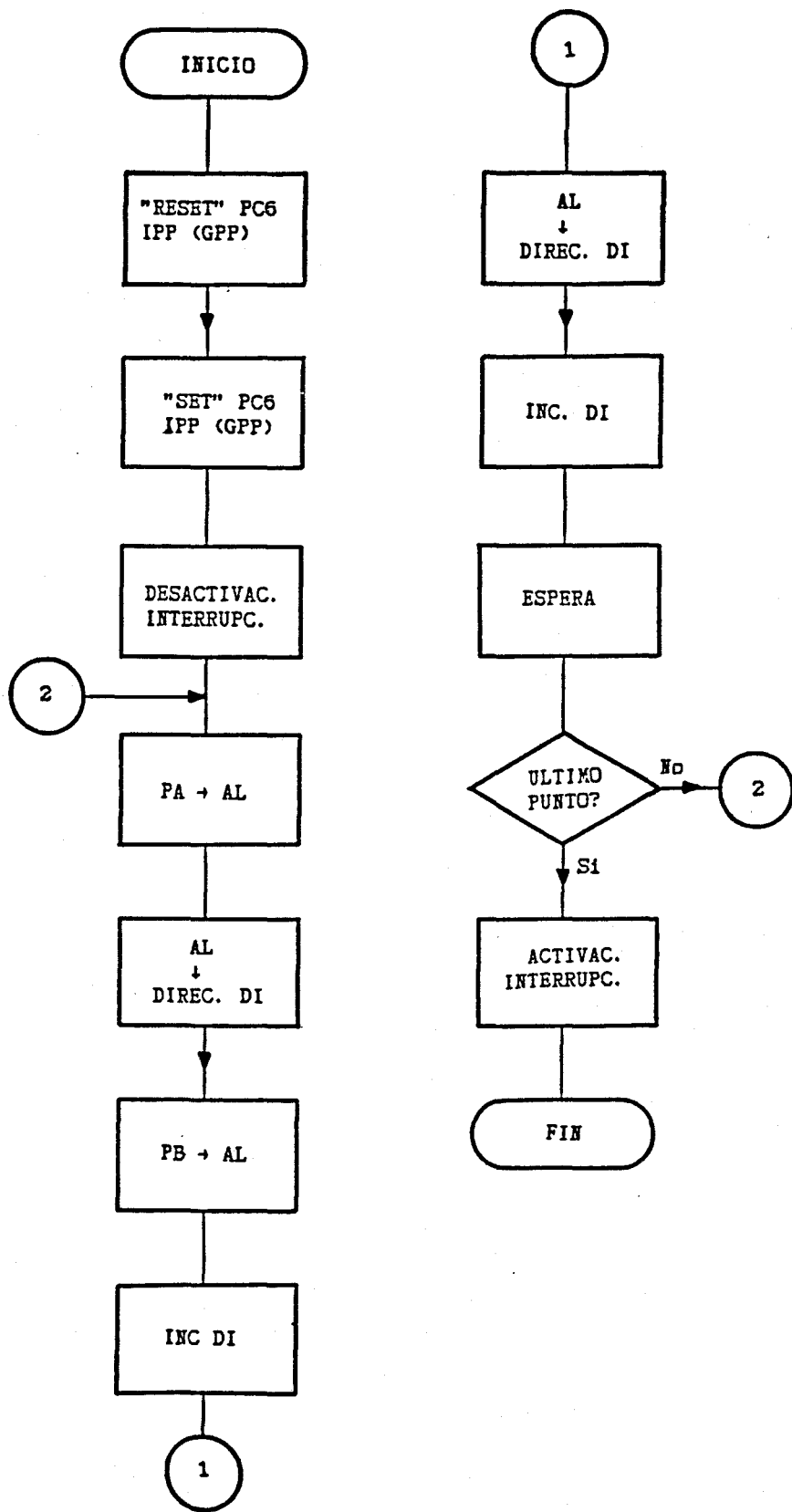


Figura 17. Descripción detallada del proceso de adquisición y almacenamiento.

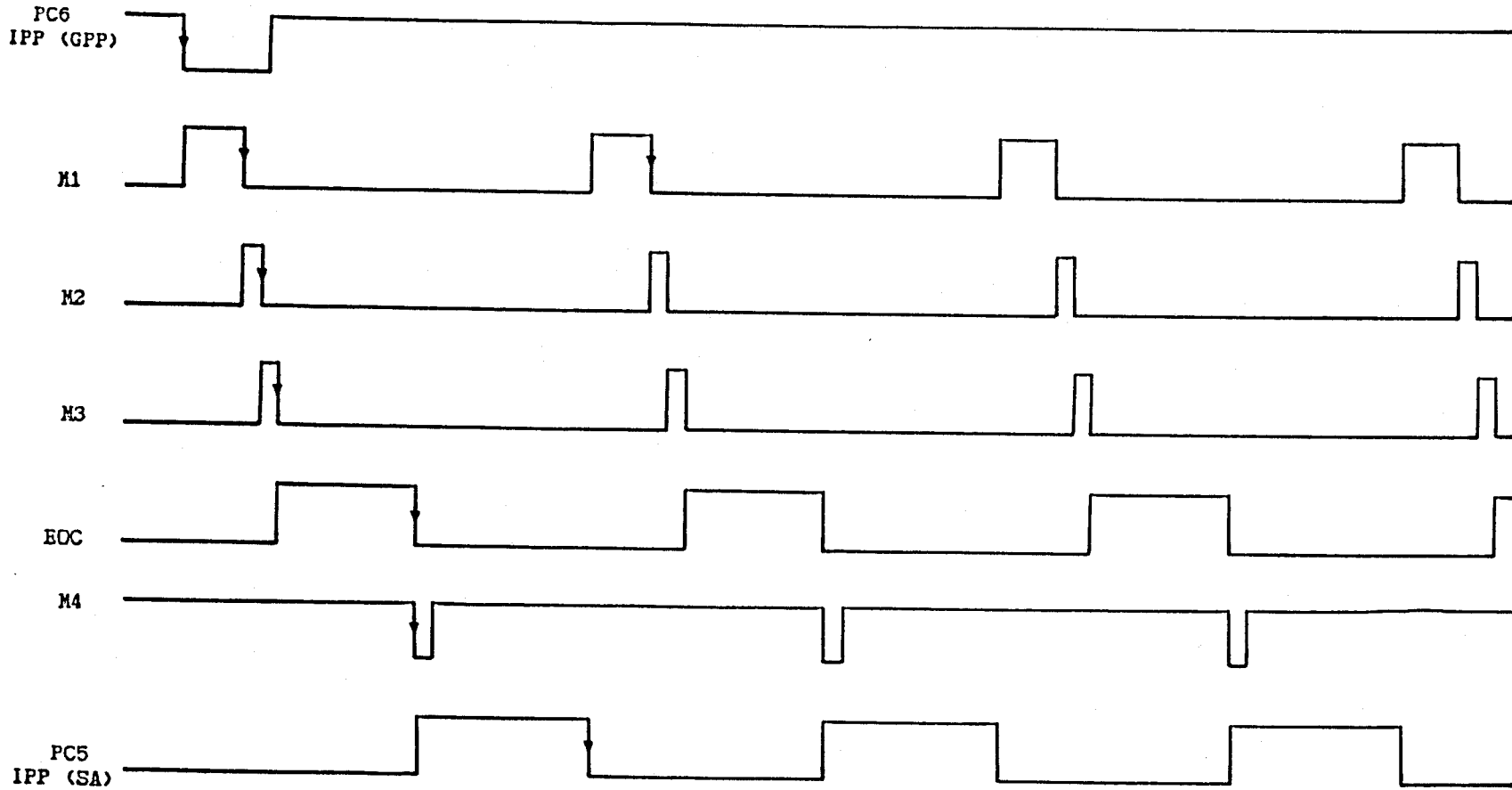


Figura 18. Diagrama temporal de las principales formas de onda del Sistema de Adquisición.

Cuando la información contenida en la puerta A se transfiere al registro acumulador AL con la instrucción "IN", PC5 pasa a cero iniciándose el muestreo y conversión de otro punto. Mientras se realizan estas operaciones, se transfiere el contenido del registro AL y de la puerta B, que corresponden al muestreo del punto anterior, a la dirección de memoria especificada en el registro DI y siguiente. De esta forma queda almacenado el "byte" más significativo en la posición más baja de memoria y el menos significativo en la más alta y ajustado a la izquierda.

El programa debe esperar a continuación un tiempo antes de iniciar otro proceso de muestreo y adquisición. Este tiempo de espera depende de la velocidad de muestreo (SR) seleccionada. En el caso de que SR=20 μ s, este tiempo se obtiene con dos instrucciones "NOP", mientras que para las velocidades de muestreo de 50, 100, y 200 μ s, se consigue con lazos de espera en número variable. El número de veces que se ejecuta el lazo depende del valor del argumento CO. Las instrucciones fundamentales empleadas para efectuar la adquisición y almacenamiento se muestran en la figura 19.

Considerando que el lazo "LOOP 186" se realiza CX veces y el retraso introducido por el controlador de DMA para el refresco de memoria dinámica, el tiempo estimado en la ejecución de este proceso es:

$$T = (110+17*CX)*77/(72*f)$$

donde f = frecuencia del reloj.

Se ha procedido a una comprobación experimental de la frecuencia de

```

185:    IN AL,DX
        MOV BYTE PTR[DI],AL
        INC DX
        IN AL,DX
        INC DI
        MOV BYTE PTR[DI],AL
        INC DI
        DEC DX
        PUSH CX ;se inicia el lazo de espera
        MOV CX,[SI]
        NOP
        NOP
        NOP
        NOP
        NOP
        NOP
186:    LOOP 186
        POP CX ;finaliza el lazo de espera
        LOOP 185

```

Figura 19. Instrucciones empleadas para llevar a cabo la adquisición y almacenamiento de los datos.

muestreo, a través de la señal presente en el bit 5 de la puerta C de la IPP (véase figura 13), activada cuando se extraen los datos de la PA de la IPP con la instrucción "IN". El error medio que resulta entre los valores teóricos y experimentales para el rango de frecuencias empleado es del 7.5%.

Por lo tanto, se han utilizado los datos experimentales para determinar una relación empírica entre el número de veces que se ejecuta el lazo "LOOP 186" y la frecuencia de muestreo. La expresión obtenida es la siguiente:

$$CX = CINT(SR/3.81-8.12)$$

donde SR = velocidad de muestreo expresada en μs por punto.

El máximo valor de SR que se consiguió con esta subrutina (véase figura 19) fué del orden de 35 μs /muestra, en el IBM PC/XT. Para aumentar la frecuencia de muestreo a 20 μs /muestra, el lazo de espera de la subrutina anterior se constituyó con dos instrucciones "NOP".

En estas circunstancias, la repetibilidad de los valores de frecuencia de muestreo generados (20, 50, 100 y 200 μs /muestra), es totalmente aceptable desde un punto de vista práctico. A continuación se muestran las desviaciones estándar y los errores relativos, respecto de la media, asociados a un conjunto de 20 procesos de conversión efectuados a las diferentes velocidades de muestreo:

<u>Valor nominal</u>	<u>Valores exp. (Media)</u>	<u>Desviación Estándar</u>	<u>Error relativo</u>
20 μs	20.496 μs	0.0519	0.025 %
50 μs	50.88 μs	0.0114	0.02 %
100 μs	100.51 μs	0.0978	0.001 %
200 μs	198.85 μs	0.1806	0.0009%

4.4 Sustracción lineal.

En cierto tipo de experimentos se requiere la eliminación de las componentes lineales (corrientes de fuga y capacitativa) de las corrientes totales, al objeto de registrar las corrientes iónicas con la máxima fiabilidad. Para ello, se aplican N pulsos (N=1,2,4), llamados pulsos de sustracción, cuya amplitud es igual a la n-ésima parte del pulso "test", con polaridad opuesta y duración idéntica al mismo. La suma de todos los registros obtenidos con el pulso "test" y los pulsos de sustracción cancela las corrientes capacitativa y de fuga.

La adquisición y almacenamiento de las corrientes iónicas generadas por los pulsos de sustracción se controla mediante la subrutina SUSLIN. La figura 20 muestra un diagrama de flujo de esta subrutina. Su funcionamiento es análogo al de la subrutina de adquisición SUBRT2 descrita anteriormente, si bien el proceso de adquisición ha de repetirse tantas veces como pulsos de sustracción existan. La SUBRTP actúa como núcleo central del proceso, variando en cada caso la dirección de memoria donde deberá almacenar la información adquirida. Estas direcciones figuran como argumentos en la subrutina SUSLIN en las posiciones 5,6,7 y 8. La selección de una u otra dirección se lleva a cabo secuencialmente, calculando previamente el desplazamiento dentro de la pila de un determinado argumento en la lista. El valor del desplazamiento se realiza de la siguiente forma

$$\text{Desplazamiento desde BP} = 2*(n-m)+6$$

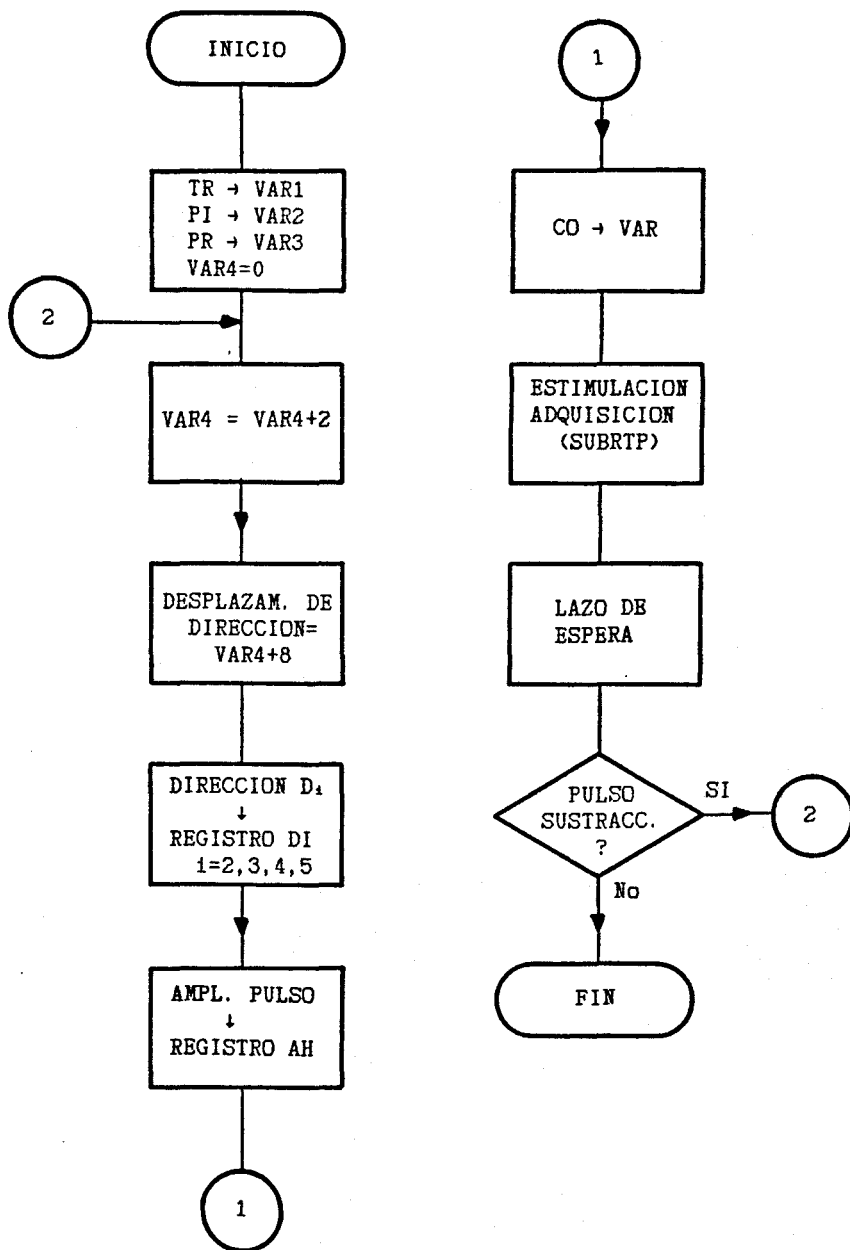


Figura 20. Diagrama de flujo del proceso de adquisición y almacenamiento de la información obtenida mediante los pulsos de sustracción.

donde, $n = n^{\circ}$ de argumentos en la lista

$m =$ posición del argumento en la lista contando desde la izquierda.

En el Apéndice II se presenta un listado de la subrutina SUSLIN.

La suma de las señales obtenidas a partir del pulso "test" y de los pulsos de sustracción, se realiza mediante la subrutina SUBRTS, cuyo diagrama de flujo se muestra en la figura 21. El método empleado consiste en sumar dos señales cuyas direcciones de memoria se encuentran en los registros del microprocesador SI y DI. El resultado se almacena en la zona de memoria indicada por el registro BX. Debido a la forma en que se encuentran almacenados los datos en memoria, el "byte" más significativo en la posición más baja, es preciso intercambiar previamente los octetos de los registros DX y AX que actuarán como operandos. Un listado de SUBRTS se muestra en el Apéndice II.

5. Sistema de Representación en Pantalla.

5.1 *Requerimientos generales.*

Con el fin de poder visualizar en un osciloscopio analógico la señal obtenida por el Sistema de Adquisición, se ha diseñado e implementado sobre una tarjeta prototipo IBM PC/XT un sistema de representación que controlado mediante "software", transmite desde memoria RAM los 500 puntos que constituyen dicha señal al osciloscopio, con una frecuencia lo suficientemente elevada como para provocar sensación de persistencia en la pantalla. Con objeto de poder comparar dos señales, el sistema tiene la posibilidad de representarlas simultáneamente a través de los dos canales del osciloscopio.

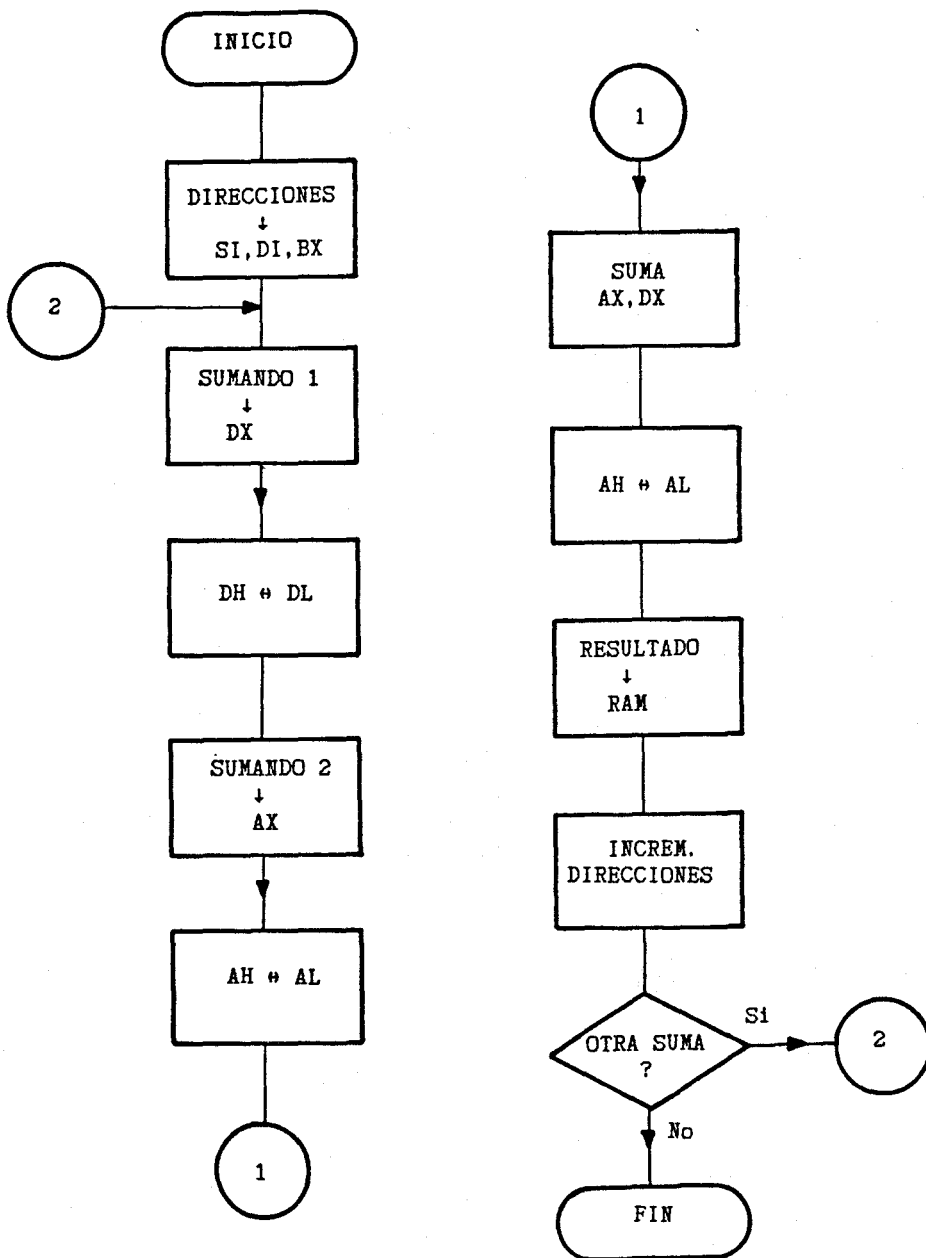


Figura 21. Diagrama de flujo para la adición de dos señales almacenadas en memoria RAM.

Una vez dispuesta las señales en pantalla, se utilizan dos cursores que permiten seleccionar puntos de interés sobre ellas y determinar los parámetros (amplitud y tiempo) correspondiente a cada punto.

Los intervalos delimitados por los cursores pueden ser objeto de análisis en una etapa posterior, para determinar mediante métodos de aproximación la función matemática que mejor lo represente.

5.2 Esquema y elementos del diseño.

El Sistema de Representación en Pantalla se muestra en la figura 22 y la relación de sus componentes en el apéndice IV. Consta esencialmente de tres convertidores digitales/analógicos con sus entradas en comunicación con dos Interfases Periféricas Programables (IPP1, IPP2). Debido a que las tres señales deben generarse sincrónicamente, se interponen entre las puertas de salida de las interfases un conjunto de "latches". De esta forma, si bien la información se recibe secuencialmente, la presentación de la misma a los convertidores puede efectuarse en el mismo instante.

A continuación se pasa a describir los componentes básicos que constituyen el sistema implementado.

5.2.1 Interfase Periférica Programable (IPP 8255A)

La interfase paralelo se programa en *modo 0* con todas sus puertas de salida. Las direcciones asignadas a cada uno de sus cuatro registros son las siguientes:

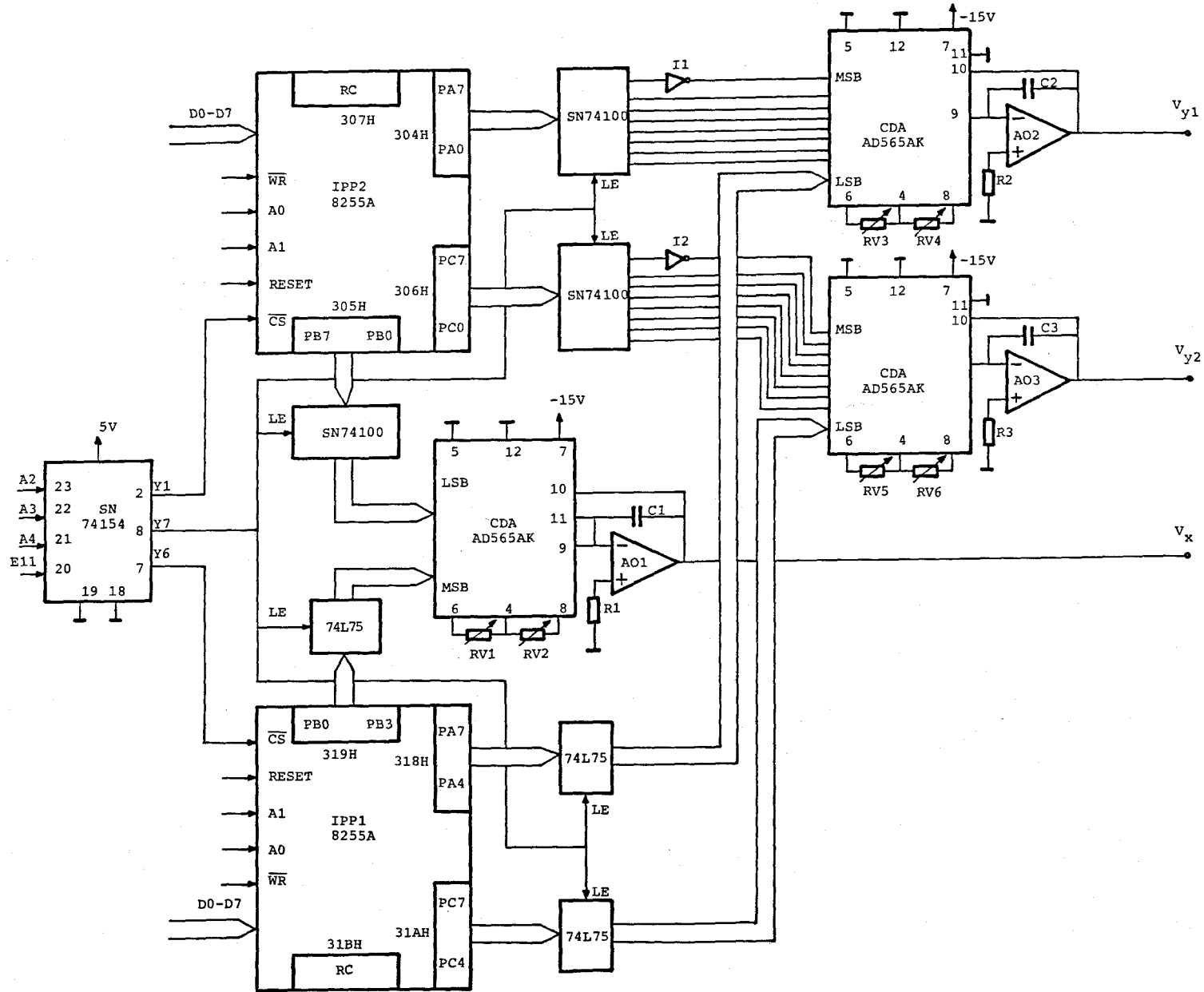


Figura 22. Diagrama general del Sistema de Representación en Pantalla.

<u>INTERFASE</u>	<u>REGISTRO</u>	<u>DIRECCIONES (HEX.)</u>
IPP1	PA	318
IPP1	PB	319
IPP1	PC	31A
IPP1	RC	31B
IPP2	PA	304
IPP2	PB	305
IPP2	PC	306
IPP2	RC	307

Las puertas A y C se usan para representar las señales aplicadas a los canales I y II respectivamente. La puerta B genera la señal de barrido.

5.2.2 Convertidores digital-analógico (AD565AK).

Los convertidores D/A AD565AK (Analog Devices) de 12 bits poseen un "settling time" a 1/2 LSB de 250 ns. y se disponen en modo de trabajo bipolar. Dos de ellos presentan una tensión de salida (V_{y1}, V_{y2}) entre -5 y 4.9976 V, para reproducir las señales analógicas que han sido adquiridas previamente. El tercero genera una tensión (V_x) entre -2.50 y 2.4987 V proporcionando la señal de barrido que actuará sobre el sistema de deflexión horizontal del osciloscopio (Analog Devices, Data Book, 1984).

5.2.3 "Latches" de 8/4 bits (SN74100/74L75).

Como muestra la figura 22, se han utilizado "latches" de 8 y 4 bits para transferir simultáneamente la información presente en las interfases (IPP1, IPP2) a los convertidores D/A (TTL Data Book, 1980).

5.2.4 Decodificador/demultiplexor (74LS154).

El 74LS154 es un decodificador/demultiplexor de 4-16 líneas que emplea como entradas las señales A2, A3, A4 y E11 (A5, A6, A7, A8, A9, AEN)

del canal de E/S (figuras 7 y 8). Las salidas del decodificador utilizadas son:

<u>Salidas</u>	<u>Señal activada</u>
Y1	CS IPP2
Y6	CS IPP1
Y7	"Latch-enable"

Las dos primeras señales se activan con las direcciones descritas anteriormente. La tercera se selecciona con la dirección 31FH (TTL Data Book, 1980).

5.3 Programa y descripción del sistema.

El Sistema de Representación en Pantalla diseñado permite la visualización de una o dos señales analógicas previamente adquiridas y almacenadas en memoria RAM. El funcionamiento del mismo puede describirse esquemáticamente mediante el diagrama de bloques de la figura 23.

En primer lugar se disponen las interfases programables en modo 0 de operación con todas sus puertas de salida, al mismo tiempo que se prefija el número de puntos de la señal a representar en el osciloscopio. A continuación se procede a transferir los valores de las señales adquiridas $f_1(x_i)$ y $f_2(x_i)$ desde memoria RAM a las puertas A y C de las interfases programables (IPP) respectivamente. Posteriormente se transfiere el valor de la señal de barrido correspondiente (x_i) a la puerta B de ambas interfases (véase figura 22); finalmente se activa la etapa de "latches" con el objeto de presentar la información anterior a

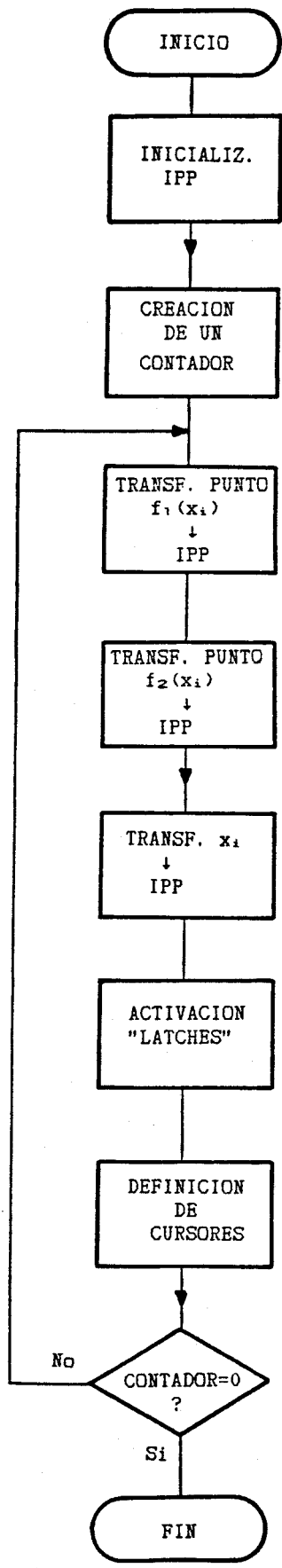


Figura 23. Diagrama de bloques general del Sistema de Representación en Pantalla.

los convertidores D/A simultáneamente. Una vez transmitidas las coordenadas $(x_i, f(x_i))$ del punto a la pantalla se lleva a cabo la generación de cursores, si ha lugar. Este proceso se repite sucesivamente hasta completar los 500 puntos que definen un barrido. En este momento, y con la ayuda de los cursores, se puede efectuar la elección del intervalo de interés para su posterior análisis. Estas operaciones se consideran en un capítulo independiente.

A continuación se describe con cierto detalle el funcionamiento del sistema de representación en pantalla. En primer lugar y para generar la señal de barrido, se define una matriz entera X de 500 elementos al inicio del programa Anala.Bas. Dado que el convertidor D/A empleado para su generación es de 12 bits y el rango de valores elegido a su salida es de ± 2.5 V, la relación entre ambas magnitudes puede expresarse en la forma siguiente:

$$V_x = x/819.21 - 2.5$$

donde: x = valor decimal asociado a la señal de barrido (0-4095)

V_x = tensión proporcional a x (-2.5, 2.4987 V)

Para representar los 500 puntos de la señal adquirida, es necesario restringir las 4096 posibilidades proporcionadas por el convertidor D/A incrementando los valores decimales de la señal de barrido en 8 unidades por punto. De esta forma se prescinde de 96 estados que se distribuyen simétricamente, de forma que la matriz X toma los valores comprendidos en el rango:

$$47 \leq X(i) \leq 4047 \quad \text{con } 0 \leq i \leq 499$$

El proceso de representación en pantalla se inicia con la llamada desde el programa Anala.Bas a la subrutina SUBRTD, cuyo diagrama de flujo se muestra en la figura 24. Los parámetros empleados por esta subrutina son los siguientes:

- Número de señales a representar (CAN)
- Dirección del primer elemento de la señal 1 ($f_1(x_1)$) (D1)
- " " " " " " " " 2 ($f_2(x_1)$) (D)
- " " " " " " " " matriz X (XD)
- Posición del cursor 1 (C1)
- " " " " 2 (C2)
- ASCII del carácter pulsado durante el "display" (C3)

La primera operación que se realiza consiste en el almacenamiento de los parámetros D1, D y XD en los registros del 8088 DI, SI y BX respectivamente. Al mismo tiempo se asignan a la variable VAR4 el número de señales a representar. A continuación y previa creación de un contador para determinar el número de puntos a transmitir, se transfieren sucesivamente los valores de las ordenadas $f_1(x_i)$ y $f_2(x_i)$ a las puertas A y C respectivamente de las IPPs (véase figura 22). Esta transferencia se realiza en dos etapas debido a que se emplean convertidores D/A de 12 bits. El almacenamiento de los datos efectuado en el proceso de adquisición determina que se transfieran en primer lugar los 8 bits más significativos y a continuación los 4 bits restantes. La conversión del modo de almacenamiento de complemento a dos a "offset binary" se lleva a cabo invirtiendo el bit más significativo del valor transferido (Analog Devices, Data Book, 1984).

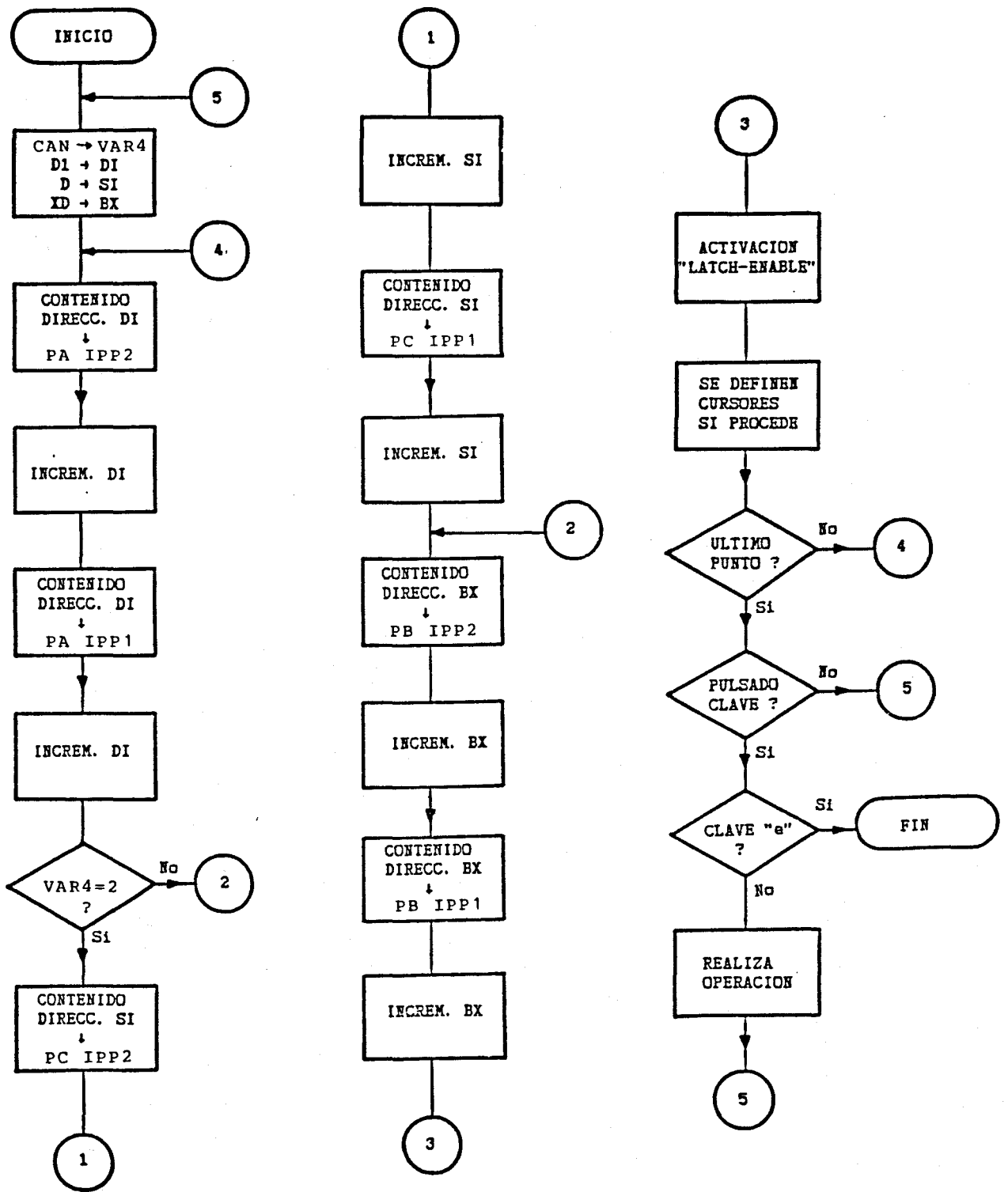


Figura 24. Diagrama de flujo del proceso de representación en pantalla.

La transmisión del valor digital asociado a la señal de barrido se realiza de forma distinta debido a que la matriz X ha sido creada desde Basic con valores enteros. Por ello, se transfiere en primer lugar el bit menos significativo que se encuentra en la posición más baja de memoria y a continuación los 4 bits restantes. Una vez que los datos $f_1(x_1)$, $f_2(x_1)$ y x_1 se encuentran en los registros A, C y B de las interfases programables (IPP1, IPP2), se activan los "latches" para presentar la información simultáneamente a los convertidores D/A. La frecuencia de transmisión de un barrido a pantalla es del orden de 30 Hz.

La generación de un cursor se realiza manteniendo en pantalla un punto durante un tiempo mayor que el correspondiente a los demás. Este tiempo se controla mediante un lazo de espera. La descripción detallada de este proceso se efectuará en el capítulo 6 ("Métodos de Análisis").

Entre dos barridos consecutivos se pueden realizar, mediante control desde el teclado, las siguientes operaciones:

- Almacenamiento en disco de la señal presente en pantalla (s)
- Análisis de la señal adquirida (varios caracteres)
- Presentación en monitor de los parámetros del estímulo (p)
- Aplicación de un nuevo estímulo (i o Ø)

La selección de estas opciones se describen detalladamente en el Apéndice I. El Apéndice II muestra el listado de la subrutina SUBRTD que lleva a cabo la presentación de la señal en el osciloscopio.

6 Métodos de análisis.

6.1 Descripción general.

Una vez efectuada la representación en pantalla de la señal adquirida, se procede a la determinación de los parámetros que la caracterizan. El análisis de la información obtenida se realiza a través de las siguientes operaciones: determinación de la línea de base, cálculo del área encerrada por la curva y aproximación de la función obtenida mediante expresiones matemáticas.

La determinación de la línea de base permite disponer de una referencia para efectuar las medidas de amplitudes sobre la señal. En el caso de que la señal registrada sea una corriente iónica transmembrana, el área encerrada bajo la curva, representa la carga eléctrica que atraviesa la membrana en el intervalo de tiempo considerado. El ajuste matemático de una determinada parte de señal registrada, permite describir de forma precisa el comportamiento cinético de los canales involucrados en el paso de corriente.

6.2 Definición de cursores.

Para llevar a cabo las operaciones mencionadas anteriormente, se requiere la presencia de dos cursores sobre la señal a analizar. La definición de cursores se realiza en el programa mediante lazos de espera que hacen permanecer en pantalla un punto durante un tiempo de 1.85 ms superior al resto de los que definen la señal. Los cursores se pueden desplazar sobre la señal en pantalla con el fin de posicionarlos sobre los puntos de interés y delimitar el intervalo objeto de aproximación matemática.

6.3 Operaciones.

Las operaciones que se efectúan sobre la señal se realizan con subrutinas escritas en Basic. La figura 25 muestra el diagrama de flujo de la subrutina SUBRTD, escrita en ensamblador, que controla la representación en pantalla así como la obtención de los datos necesarios para la ejecución de dichas operaciones. Esta subrutina emplea los registros del microprocesador 8088 -DI,SI,BX,CX- para contener la siguiente información:

DI,SI.- Dirección de almacenamiento en RAM de la señal I y II respectivamente. Argumentos D1 y D.

CX.- Número de puntos a representar.

BX.- Dirección de almacenamiento en RAM de la señal de barrido. Argumento XD

La posición de los cursores 1 y 2 se almacenan en las variables VAR6 y VAR5 respectivamente. Argumentos C1 y C2.

El número de señales a representar se transfiere a la variable VAR4. Argumento CAN.

Inicialmente y tras la asignación de los valores iniciales de VAR6 y VAR5 se transmite un punto de la señal a la pantalla del osciloscopio. En el caso de que el valor del contador CX coincida con los argumentos C1 o C2, se procede a la definición del cursor correspondiente. Una vez finalizada la transmisión de los 500 puntos que definen un barrido, puede llevarse a cabo cualquiera de los procesos analíticos mencionados anteriormente.

La selección de estas operaciones se efectúa pulsando un determinado carácter del teclado. La lectura de este carácter se realiza

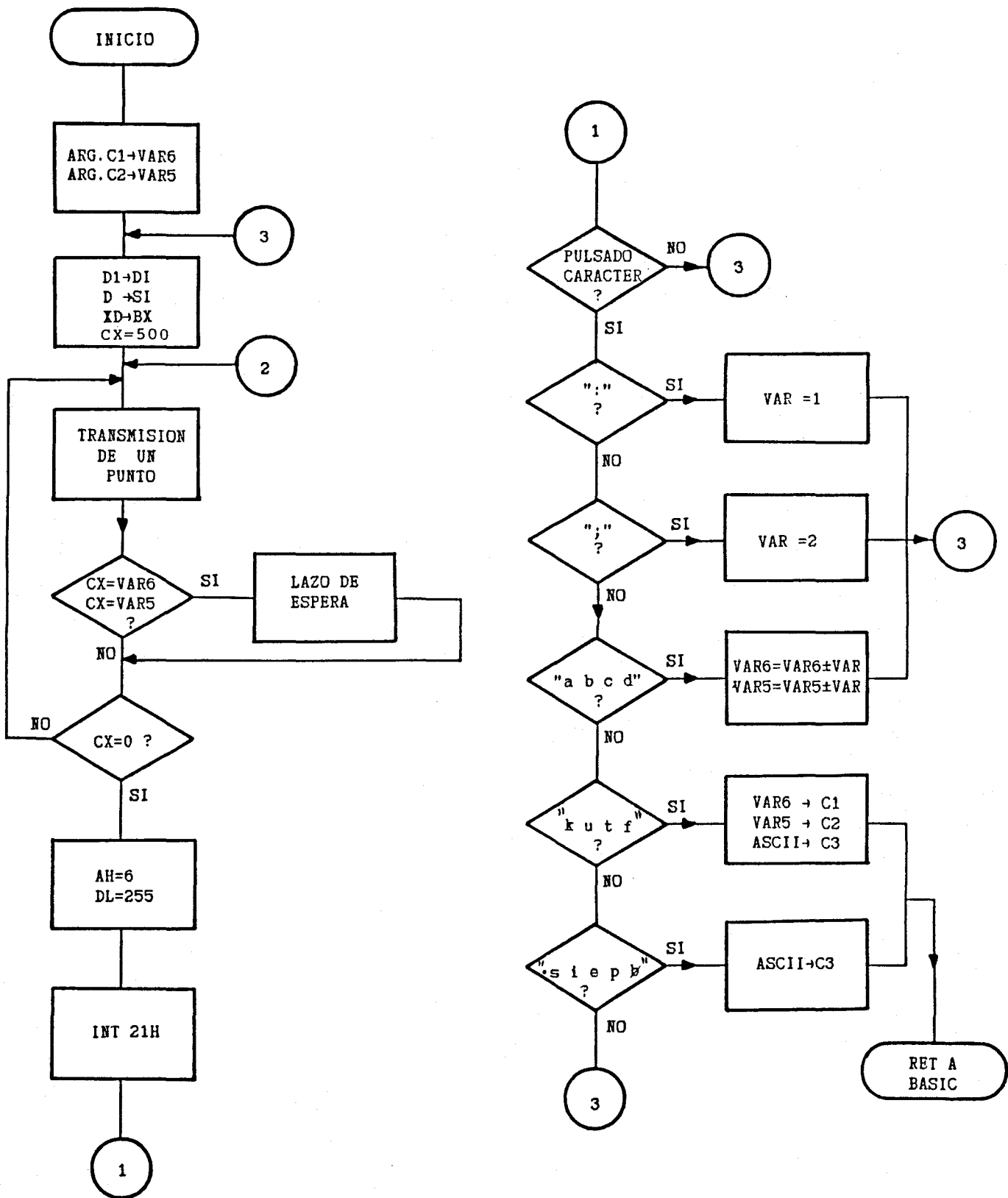


Figura 25. Diagrama de flujo de la subrutina SUBRTD que controla el Sistema de Representación en Pantalla.

a través de la interrupción 21H, previo almacenamiento en AH y DL de los valores 6 y FF respectivamente. El carácter elegido se transfiere en el registro AL y en caso contrario se almacena un cero activándose el "zero flag" (Sargent y Shoemaker, 1985).

Los caracteres ":" y ";" se usan para determinar la velocidad de desplazamiento de los cursores sobre la pantalla, recorriendo los puntos de la señal con incrementos de 1 ó 4 respectivamente. Los caracteres A-B y C-D producen el desplazamiento de los cursores 1 y 2 , hacia la izquierda y derecha respectivamente a las velocidades seleccionadas con anterioridad.

Una vez situados los cursores en los puntos de interés, la selección de los caracteres k,u,t,x y f desde teclado hace que se transfieran a los argumentos C1, C2 y C3 las posiciones de los cursores 1, 2 y el ASCII del carácter pulsado, al objeto de efectuar las siguientes operaciones:

<u>Clave</u>	<u>Operaciones</u>
k	Posiciones de los cursores
u	Cálculo del área
t	Cálculo del intervalo de tiempo entre dos cursores
f	Cálculo de las amplitudes de los cursores.
x	Aproximación matemática de un tramo de la función.

Estas operaciones se realizan desde Basic a partir de la información transferida a los argumentos C1, C2, y C3.

Finalmente la elección de las opciones "s", "ø", "i", "e", "." y "p" transfieren al argumento C3 el ASCII del carácter pulsado. Las operaciones que se realizan desde el programa Anala.Bas son las siguientes:

<u>Clave</u>	<u>Operaciones</u>
s	Almacenamiento de la señal en disco
ø	Generación de un estímulo idéntico al anterior
i	Generación de un estímulo idéntico al anterior, excepto en algún parámetro
.	Definición de la línea de base
p	Presentación en monitor de los parámetros característicos del estímulo además del potencial de reposo (HP) y la velocidad de muestreo (SR)
e	Fin del programa.

6.3.1 Línea de base.

Se ha definido como línea de base el conjunto de puntos con amplitud igual al valor medio de las amplitudes de los puntos 2 y 7 de la señal a transmitir. La elección de estos dos puntos se debe a que la señal adquirida está compuesta por 8 puntos iniciales que se obtienen antes de aplicar a la célula el cambio en el potencial de membrana cuyo efecto se desea analizar. Esta línea se utiliza como referencia para todas las amplitudes que posteriormente se determinen.



La amplitud de la línea de base se obtiene a partir de la expresión:

$$A = (R1(2)+R1(7))/2 \quad (1)$$

donde R1(2) y R1(7) son las amplitudes de los puntos 2 y 7 de la señal representada.

Para realizar el "display" de la línea de base a través del mismo canal que la señal, se transfiere un punto con la amplitud determinada por la expresión (1), por cada 25 puntos de la señal adquirida.

6.3.2 Presentación de parámetros.

a) Parámetros asociados al protocolo.

Mediante la opción "p", en esta fase del programa, se presenta en pantalla los parámetros que se indican a continuación y que están asociados al protocolo:

- Potencial de reposo (HP)
- Ganancia del amplificador de "patch-clamp" (GC)
- Velocidad de muestreo (SR)
- Número de pulsos de sustracción (N)
- Características del estímulo
 - amplitud del pulso (A)
 - amplitud del prepulso (AP)
 - duración del pulso (D)
 - duración del prepulso (DP)
 - "sub-holding potential" (SHP)
 - intervalo (IN)

b) Parámetros asociados a la respuesta.

Los parámetros de la respuesta seleccionados mediante el empleo de cursores consisten en amplitudes e intervalos temporales correspondientes a los puntos delimitados por aquellos.

Las amplitudes de los puntos definidos por los cursores, opción seleccionada por la clave "f", se determinan en Basic a partir de la transferencia de la posición de los cursores a los argumentos C1 y C2 en la subrutina SUBRTD descrita con anterioridad. Desde Basic, el programa Anala.Bas calcula estas amplitudes a través de la matriz que almacena la señal registrada. Para extraer la información adecuadamente de dicha matriz, cuyos valores están almacenados en complemento dos, se procede en primer lugar a transferir dichos datos a "offset binary". Esta operación se realiza mediante la operación XOR entre el "byte" más significativo del dato y el "byte" 10000000. El valor decimal almacenado se obtiene a partir de la expresión siguiente:

$$VA = \text{Peek}(I) * 256 + \text{Peek}(I+1) \quad (2)$$

La amplitud expresada de esta forma oscila entre 0 y 65520, para el rango de tensiones empleado por el convertidor A/D que varía entre -5 y 4.9976v. La amplitud real del punto vendrá dado por la expresión:

$$V = (VA - 32768) / 6.553 \text{ mV} \quad (3)$$

En los experimentos electrofisiológicos que registran corrientes iónicas a través del amplificador de "patch-clamp", la respuesta

adquirida (V) está relacionada con la intensidad de la corriente iónica a través de la relación:

$$I = -V / (GC * R_r) \quad (4)$$

donde: GC es la ganancia del amplificador de "patch-clamp" y
R_r es la resistencia de realimentación del convertidor I/V del sistema de registro

El intervalo de tiempo comprendido entre los cursores, opción seleccionada por la clave "t", se calcula desde Basic a partir de la transferencia de las posiciones de los cursores a los argumentos C1 y C2 de la subrutina SUBRTD. El tiempo entre ambos cursores viene dado por la expresión

$$T = (C2 - C1) * SR \quad (5)$$

donde: C1 = posición del cursor 1
C2 = " " " 2
SR = velocidad de muestreo

6.3.3 Integración.

En experimentos electrofisiológicos donde se registran corrientes iónicas, la cantidad de iones que atraviesa la membrana durante un intervalo de tiempo determinado, puede ser de gran interés desde el punto de vista biofísico. El valor de esta carga eléctrica se calcula simplemente evaluando el área encerrada por la señal asociada a la corriente iónica durante el intervalo de tiempo considerado, mediante la opción "u". Una vez transferida desde ensamblador los valores de las

posiciones de los cursores, se procede al cómputo de este área a partir de la expresión:

$$S = SR * \sum (y_n + y_{n+1}) / 2 \quad 1 \leq n \leq N-1$$

donde: SR = velocidad de muestreo

y_n, y_{n+1} = ordenadas de los puntos n y $n+1$

$N = C2 - C1 + 1$. Número de puntos contenidos en el intervalo a integrar.

6.3.4 Ajuste exponencial.

En gran número de experimentos es conveniente llevar a cabo el estudio de la cinética del cierre de los canales iónicos tras la aplicación del estímulo. Con este fin, y mediante la opción "x", se realiza el ajuste del tramo de la señal registrada que ha sido previamente seleccionado mediante los cursores. En la mayoría de los casos, la señal a analizar puede representarse con gran aproximación mediante una función exponencial cuya constante de tiempo nos proporciona la información requerida. El ajuste exponencial se realiza utilizando el método de los mínimos cuadrados.

Con objeto de comparar la función exponencial obtenida y la señal registrada, se representan ambas señales en la pantalla del osciloscopio.

VERIFICACION DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

1 Verificación general.

El objetivo de esta sección consiste en efectuar una verificación del funcionamiento de la unidad implementada y del cumplimiento de los requerimientos impuestos a la misma. Se muestran figuras tomadas directamente de un osciloscopio correspondientes a las señales de mayor interés proporcionadas por el Generador de Pulsos, Sistema de Adquisición y Sistema de Representación en Pantalla.

En primer lugar se presentan los oscilogramas correspondientes a los protocolos obtenidos por el Generador de Pulsos, a continuación se ilustra la operación del Sistema de Adquisición a diferentes velocidades de muestreo, y finalmente se procede a valorar la calidad de la imagen transmitida al osciloscopio. Los oscilogramas se han realizado con un osciloscopio Tektronix 2230 utilizando dos cursores para las medidas temporales y de amplitud.

1.1 Generador de Pulsos.

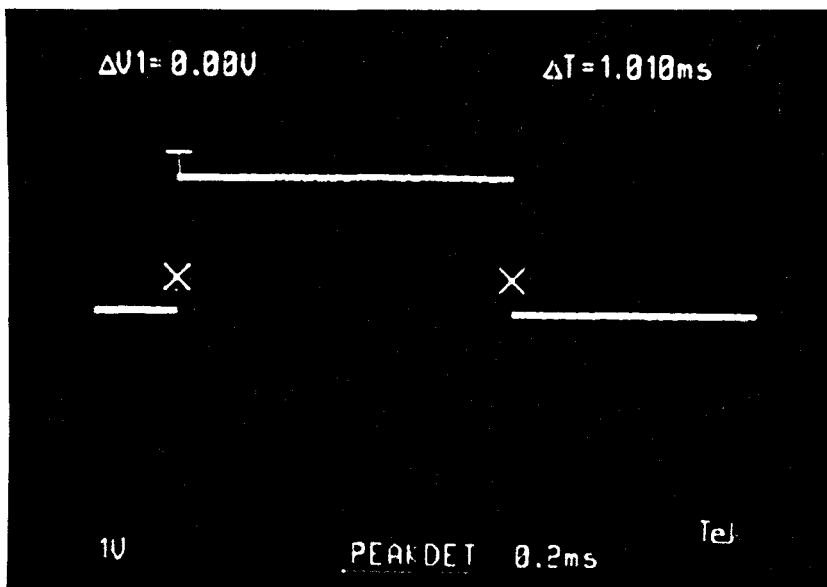
Con el fin de estudiar la precisión del método empleado en la obtención de los diferentes protocolos, se muestran varios oscilogramas de pulsos con diferentes duraciones. El control del tiempo se lleva a cabo con el programa de la figura 11. Como se ha mencionado anteriormente, la relación empírica existente entre el número de veces (CX) que se ejecuta el lazo de espera en el programa y la duración deseada del pulso (D), expresada en ms, viene dada por la expresión:

$$CX = D \cdot 1000 / 31.44$$

En los oscilogramas 1-6 (figuras 26 y 27), se observan pulsos obtenidos mediante lazos de espera ejecutados 32, 148, 3200, 12800, 25600 y 32000 veces, correspondientes a duraciones comprendidas en el intervalo 1-1000 ms.

El error relativo medio entre los valores teóricos y experimentales es del 0.08%. El error máximo obtenido adopta un valor de 0.39%, que corresponde al oscilograma nº 1. En este ejemplo el error es de 4 μ s lo cual está muy por debajo de lo que se puede considerar como aceptable, en base a la precisión exigida en los experimentos electrofisiológicos que se realizan.

La amplitud de los pulsos es función del número de bits del convertidor A/D empleado. En este caso la utilización de un convertidor de 8 bits operando en un rango de tensión de ± 2.5 V le otorga una resolución de 20 mV. Esta señal se divide por 10 en el amplificador de "patch-clamp" y por lo tanto se pueden aplicar pulsos de ± 2 a ± 250 mV en etapas de 2 mV. Los oscilogramas 7 y 8 muestran, en el canal I,

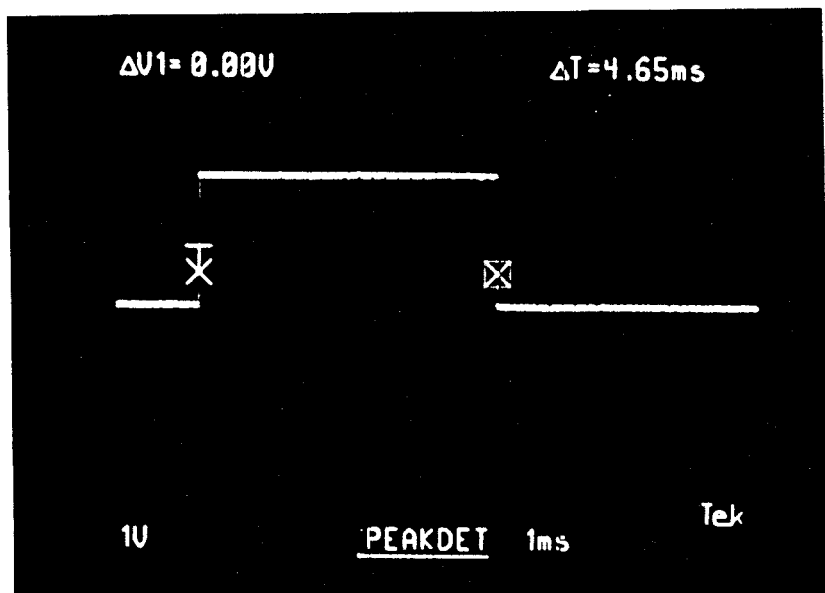


OSCILOGRAMA 1

Valor de CX=32

Duración teórica=1'006 ms

Duración experimental=1'010 ms

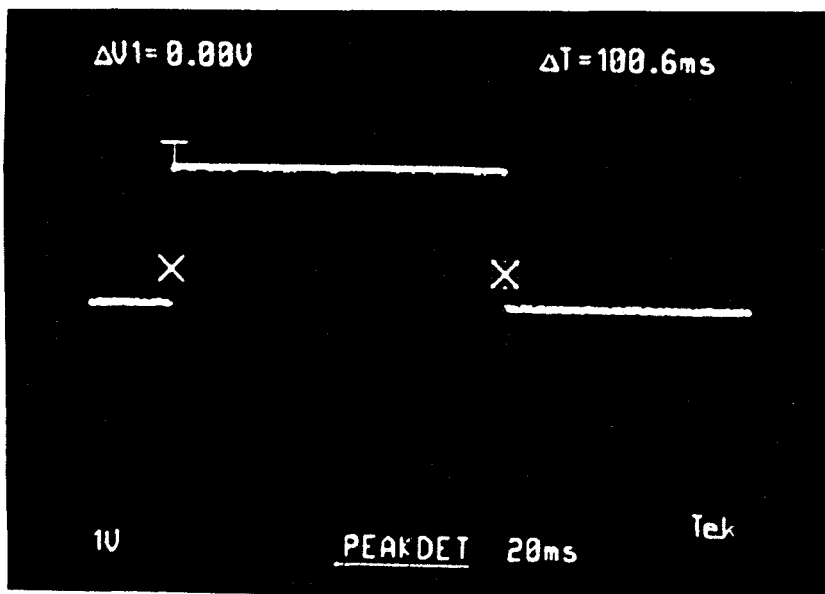


OSCILOGRAMA 2

Valor de CX=148

Duración teórica=4'653 ms

Duración experimental=4'65 ms



OSCILOGRAMA 3

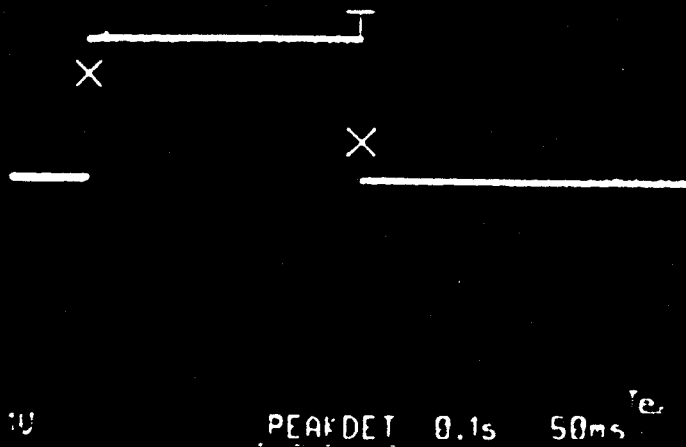
Valor de CX=3200

Duración teórica=100'608 ms

Duración experimental=100'6 ms

Figura 26

$\Delta V1 = 0.95V$ $DLY > = 1.768s$ $\Delta T = 0.402s$



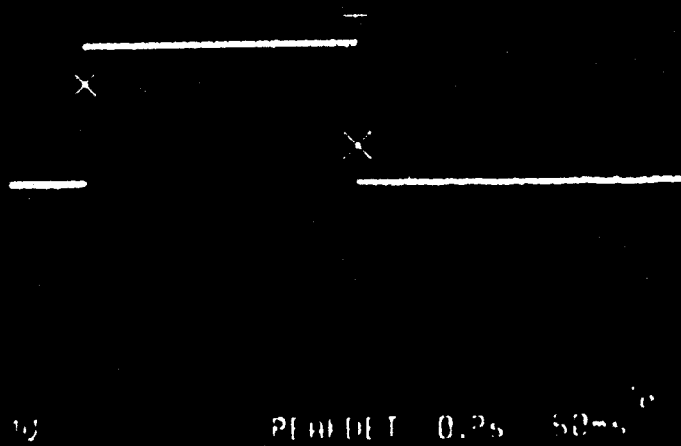
OSCILOGRAMA 4

Valor de CX=12800

Duración teórica=402'43 ms

Duración experimental=402 ms

$\Delta V1 = 0.92V$ $DLY > = 3.536s$ $\Delta T = 0.804s$



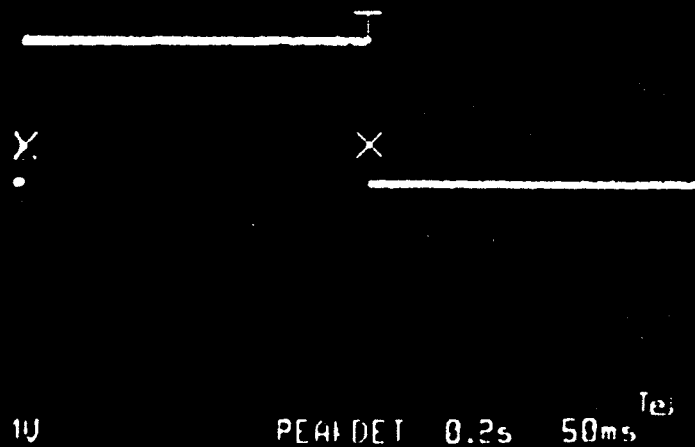
OSCILOGRAMA 5

Valor de CX=25600

Duración teórica=804'86 ms

Duración experimental=804 ms

$\Delta V1 = 0.84V$ $DLY > = 3.536s$ $\Delta T = 1.006s$



OSCILOGRAMA 6

Valor de CX=32000

Duración teórica=1006'08 ms

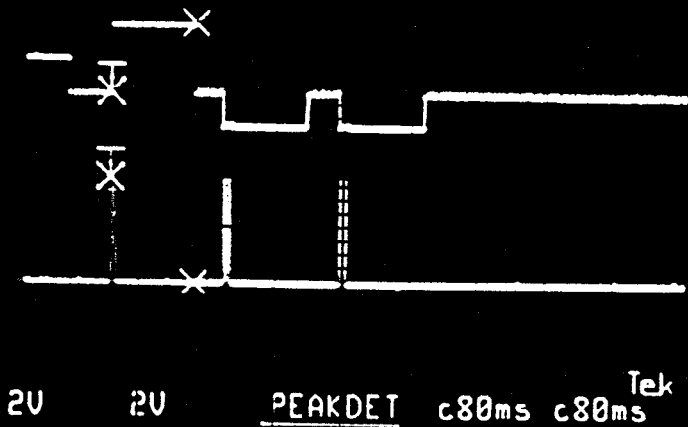
Duración experimental=1006 ms

Figura 27



OSCILOGRAMA 7

$\Delta V1 = 2.00V$ $DLY > = 102.4ms$ $\Delta T = 100.0ms$
 $\Delta V2 = 3.12V$



Protocolo n°3

Prepulso:

Amplitud = 1 V
Duración = 50 ms

Pulso:

Amplitud = 2 V
Duración = 100 ms
Intervalo = 50 ms

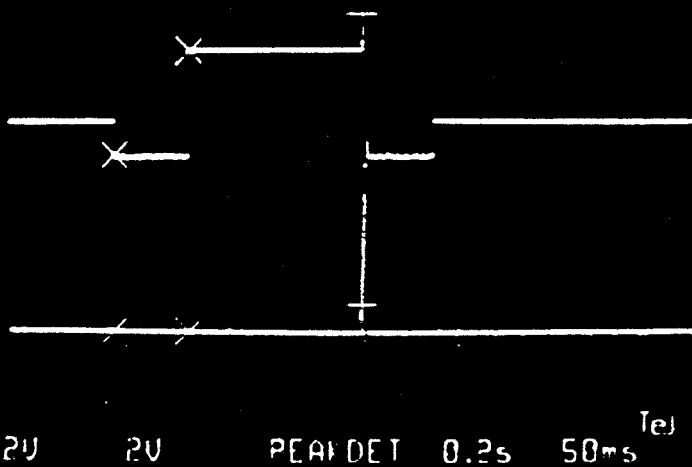
Pulsos de sustracción:

Amplitud = 1 V
Duración = 100 ms

Inicio de conversión:

Punto II

$\Delta V1 = 2.95V$ $DLY > = 3.536s$ $\Delta T = 0.216s$
 $\Delta V2 = 0.02V$



OSCILOGRAMA 8

Protocolo n°6

Prepulso:

Amplitud = -1 V
Duración = 215 ms

Pulso:

Amplitud = 2 V
Duración = 500 ms

"Sub holding potencial":

Amplitud = -1V
Duración = 200 ms

Inicio de conversión:

Punto III

Figura 28

formas de ondas asociadas a diversos protocolos obtenidos por el Generador de Pulsos. En el canal II se observa la señal responsable del proceso de adquisición producida por el bit 5 de la puerta C de la interfase del Sistema de Adquisición (véase figura 13). El oscilograma 7 corresponde al protocolo nº 3 constituido por un prepulso, un pulso "test" y dos pulsos de sustracción. El inicio de la adquisición se produce 8 puntos antes de comenzar a generarse el pulso "test" y de cada pulso de sustracción. El oscilograma 8 presenta la señal generada por el protocolo nº 6. Consta de un prepulso, seguido de un pulso "test" al final del cual la salida del generador permanece durante 200 ms a una tensión constante ("sub-holding potential"), antes de volver a la línea de base. El proceso de adquisición se inicia 8 puntos antes de acabar el pulso "test", ya que este protocolo se usa para el estudio de la cinética de cierre de los canales en la membrana celular.

1.2 Sistema de Adquisición.

En los oscilogramas 9-17 se muestra el funcionamiento del Sistema de Adquisición correspondiente a la figura 13.

El oscilograma nº 9 presenta en el canal I la orden de inicio del proceso de adquisición producida por el GPP (PC6 IPP). En el canal II se visualiza la señal que actúa sobre el "sample-hold" para efectuar el proceso de muestreo. La velocidad de muestreo resultante en este caso es de 20.4 μ s. El exceso de 0.4 μ s sobre el valor teórico se debe fundamentalmente a que el control de la velocidad de muestreo se realiza mediante lazos de espera cuyo tiempo de ejecución depende de la duración de las instrucciones que lo constituyen. No obstante, este error puede ser admitido porque en el análisis de las corrientes iónicas interesa

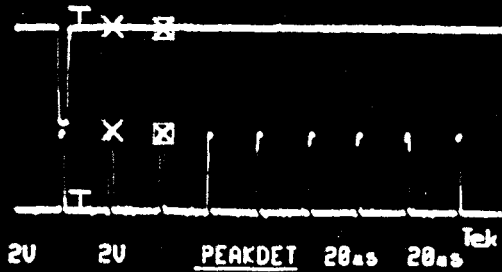
básicamente lograr una repetibilidad de esta operación de frecuencia conocida.

El oscilograma nº 10 muestra la señal de inicio y final de conversión asociadas al convertidor A/D. El tiempo empleado para la conversión de un punto es de 5.8 μ s. El tiempo que transcurre desde el final de conversión hasta el inicio de la siguiente se emplea en transferir a RAM la información presente en la interfase (IPP) que corresponde al punto anterior. Antes de ejecutar la siguiente orden de muestreo el sistema espera durante un tiempo que depende de la velocidad de muestreo. Idéntica información se presenta en el oscilograma nº 11 efectuado a una velocidad de muestreo de 50 μ s por punto.

En los oscilogramas 12, 13 y 14 se observa en el canal I la señal "strobe" que actuando sobre los bits 2 y 4 de la puerta C de la interfase, provoca el almacenamiento de los datos presentes en las puertas de entrada A y B. Estos pulsos se generan al finalizar la conversión de cada punto. La señal del canal II corresponde con la forma de onda obtenida por el bit 5 de la puerta C de la interfase. La transición "H-L" de la misma se realiza cuando se transfieren los datos de la puerta A al acumulador del microprocesador. Esta operación se lleva a cabo en ensamblador mediante la instrucción "IN". Se presentan tres ejemplos distintos a velocidades de muestreo de 20, 50 y 200 μ s por punto.

El cambio de amplitud del estímulo efectuado durante la adquisición, lleva consigo un pequeño incremento del tiempo total de adquisición, debido al uso del mismo microprocesador para controlar ambos procesos. En el oscilograma nº 15 se muestra, a través del bit 5

$\Delta V1=0.08V$ DLY>=25.6 μs $\Delta T=20.4\mu s$
 $\Delta V2=0.08V$



OSCILOGRAMA 9

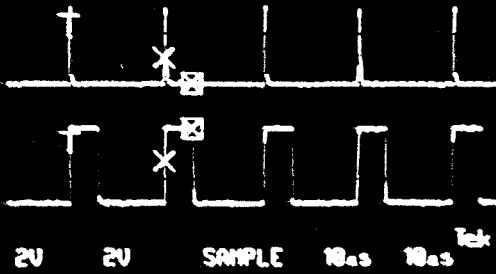
Canal I

Señal de sincronismo entre
 Generador de Pulsos y el
 Sistema de Adquisición.

Canal II

Señal de muestreo.

$\Delta V1=1.04V$ DLY>=12.8 μs $\Delta T=5.8\mu s$
 $\Delta V2=1.36V$



OSCILOGRAMA 10

Canal I

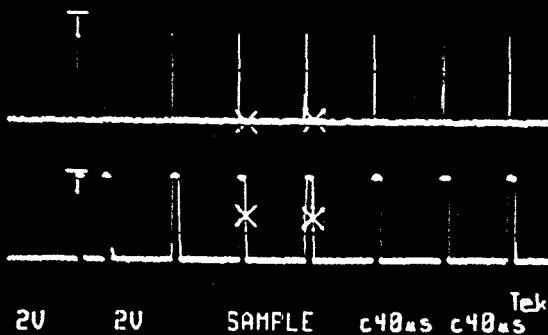
Inicio de conversión.

Canal II

Final de conversión.

Velocidad de muestreo = 20 μs

$\Delta V1=0.08V$ DLY>=51.2 μs $\Delta T=49.6\mu s$
 $\Delta V2=0.03V$



OSCILOGRAMA 11

Canal I

Inicio de conversión.

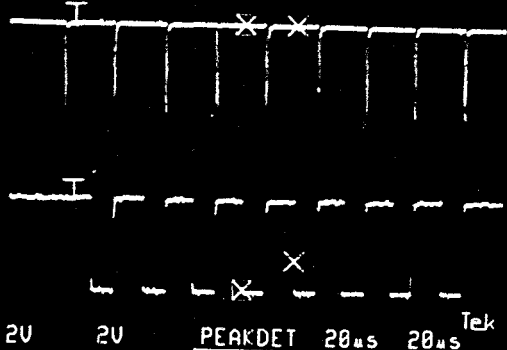
Canal II

Final de conversión.

Velocidad de muestreo = 50 μs

Figura 29

$\Delta V1 = 0.80V$ $DLY > = 25.6 \mu s$ $\Delta T = 20.4 \mu s$
 $\Delta V2 = 1.20V$



OSCILOGRAMA 12

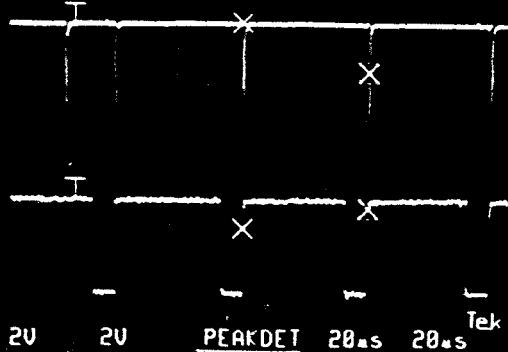
Canal I

Almacenamiento de datos en la IPP.

Canal II

Transferencia de datos desde la IPP al acumulador (transición H-L).
Velocidad de muestreo = $20 \mu s$

$\Delta V1 = 1.92V$ $DLY > = 25.6 \mu s$ $\Delta T = 50.0 \mu s$
 $\Delta V2 = 0.80V$



OSCILOGRAMA 13

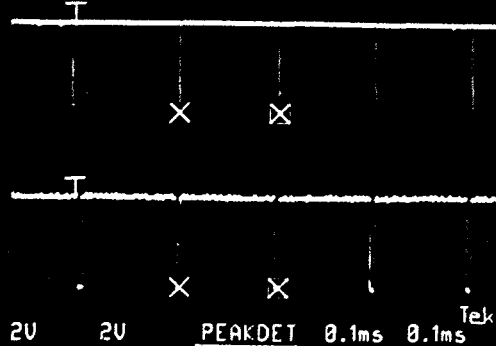
Canal I

Almacenamiento de datos en la IPP.

Canal II

Transferencia de datos desde la IPP al acumulador (transición H-L).
Velocidad de muestreo = $50 \mu s$

$\Delta V1 = 0.80V$ $DLY > = 0.128 ns$ $\Delta T = 0.200 ns$
 $\Delta V2 = 0.80V$



OSCILOGRAMA 14

Canal I

Almacenamiento de datos en la IPP.

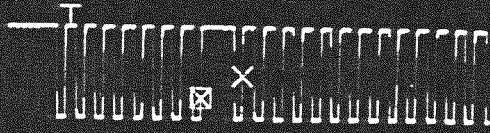
Canal II

Transferencia de datos desde la IPP al acumulador (transición H-L).
Velocidad de muestreo = $200 \mu s$

Figura 30

$\Delta V_1 = 0.88V$

$\Delta T = 42.5ms$



2U

PEAKDET 50ms

Tek

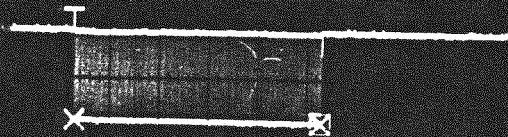
10

OSCILOGRAMA 15

Tiempo empleado en el cambio de amplitud del estímulo.

$\Delta V_1 = 0.00V$

$\Delta T = 25.00ms$



2U

PEAKDET 5ms

Tek

10

OSCILOGRAMA 16

Tiempo total de conversión y adquisición.
Velocidad de muestreo = 50 μs

$\Delta V_1 = 2.72V$

$\Delta T = 50.2ms$



2U

PEAKDET 10ms

Tek

10

OSCILOGRAMA 17

Tiempo total de conversión y adquisición.
Velocidad de muestreo = 100 μs

Figura 31

de la puerta C de la IPP, la adquisición inicial de 8 puntos seguida de la pausa correspondiente al cambio de amplitud. En este caso se ha realizado la adquisición a una velocidad de 20 μs por punto aproximadamente. Del oscilograma podemos concluir que el tiempo requerido para el cambio de amplitud oscila alrededor de 22.5 μs . En el caso más desfavorable ($\text{SR}=20 \mu\text{s}$ por punto), el cambio de amplitud en el estímulo implica la pérdida de la información asociada a un punto. Este efecto no tiene ninguna consecuencia práctica ya que se adquieren 500 puntos para definir la señal. No obstante puede disminuir sensiblemente si se utilizan ordenadores PC/XT o PC/AT con relojes de más alta frecuencia.

Finalmente en los oscilogramas 16 y 17, se pueden observar los tiempos totales para la adquisición de 500 puntos a través del bit 5 de la puerta C, siendo las velocidades de muestreo 50 y 100 μs por punto respectivamente. El tiempo total empleado es de 25 y 50.2 ms respectivamente.

1.3 Sistema de Representación en Pantalla y Análisis.

El funcionamiento del Sistema de Representación en Pantalla se describe en los oscilogramas 18-23 correspondientes al diagrama de la figura 22.

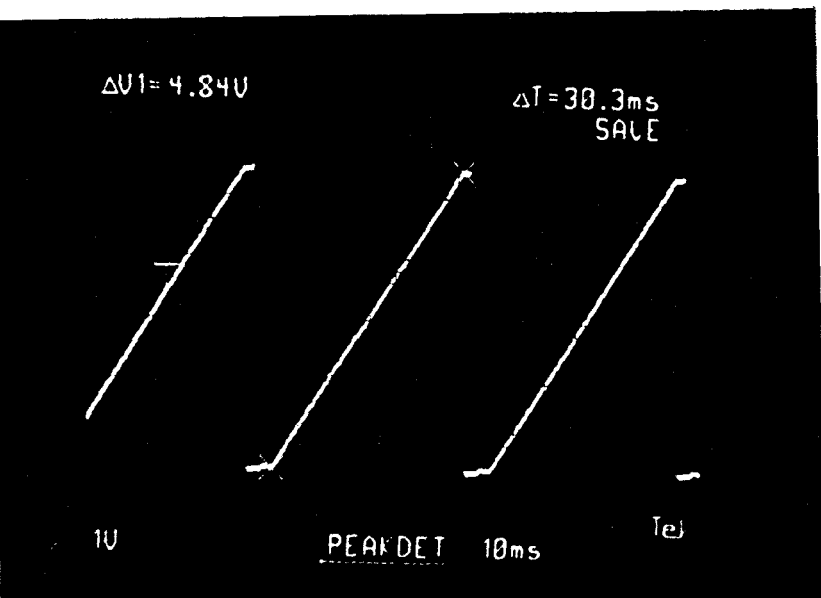
En el oscilograma 18 se muestra la señal en diente de sierra que actúa como señal de barrido para el osciloscopio empleado. La frecuencia de representación de la imagen en pantalla es aproximadamente 30 Hz. La pequeña meseta inicial corresponde a la primera situación de los cursores y la meseta final refleja el tiempo empleado para el proceso de lectura de algún carácter introducido desde el teclado. En el

oscilograma 19 se puede observar el desplazamiento de la meseta inicial cuando un cursor se posiciona en un punto central de la pantalla.

El oscilograma 20 representa la respuesta de un circuito RC, que simula la membrana celular, a un pulso rectangular para la verificación del proceso de adquisición. Esta figura muestra la calidad del sistema de adquisición y la buena relación señal/ruido. El oscilograma 21 muestra las señales que se adquieren cuando se genera un pulso de sustracción junto con el pulso "test". La suma de ambas señales genera la señal que se presenta en el oscilograma 22. El nivel de ruido de dicha señal es del orden de 9 mV.

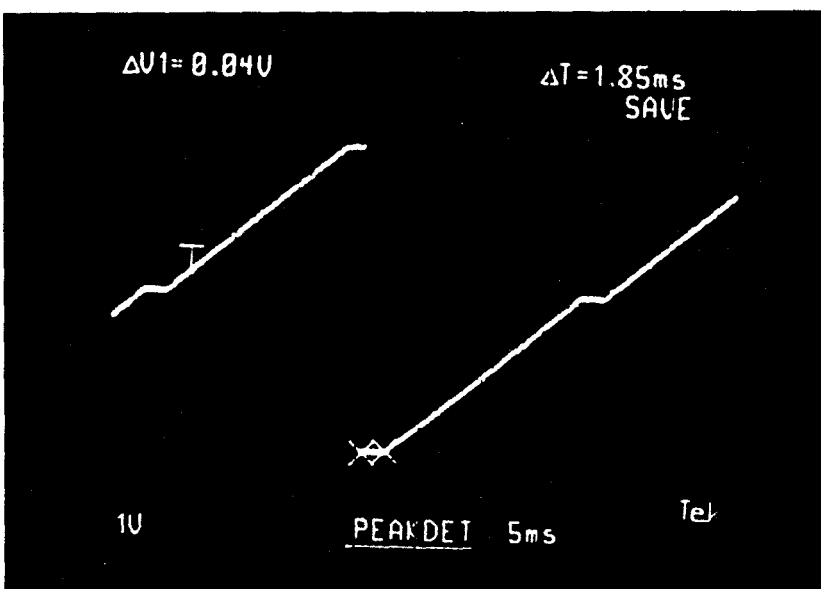
El oscilograma 23 muestra la representación de la línea de base y una señal previamente adquirida. Ambas señales se transmiten simultáneamente por el mismo canal del osciloscopio, para lo cual es necesario crear una única matriz en memoria RAM que las defina. Un punto de la línea de base tiene lugar cada 25 puntos de la señal que se muestra en la pantalla. El valor de la tensión asociada a la línea de base viene definida por el valor medio de la tensión asociada a los puntos 2 y 7 de la señal registrada.

La comprobación del ajuste matemático de una función exponencial se ha realizado sobre la respuesta de un circuito RC a un pulso rectangular. Los oscilogramas 24 y 25 muestran el ajuste obtenido cuando fueron empleados 25 y 325 puntos respectivamente.



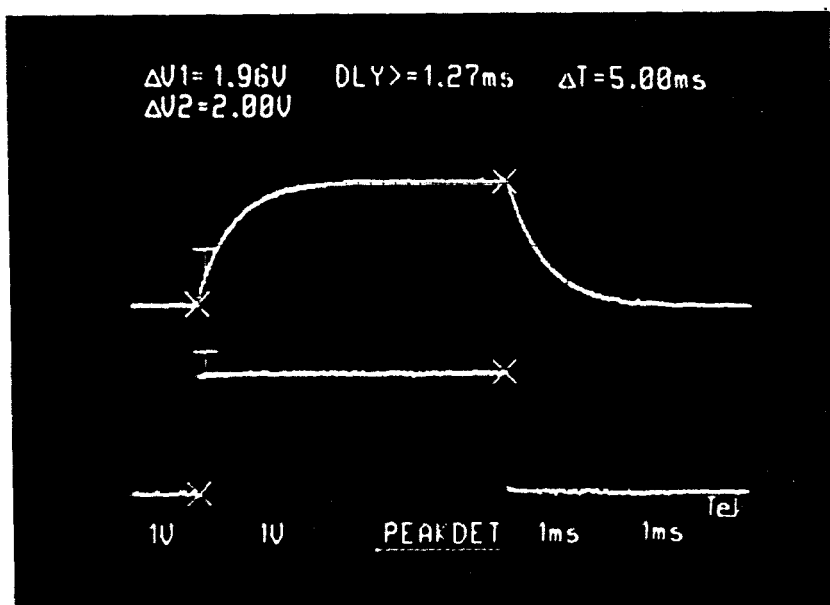
OSCILOGRAMA 18

Señal de barrido horizontal del Sistema de Representación en Pantalla.
 Cursores en posición inicial.



OSCILOGRAMA 19

Señal de barrido horizontal del Sistema de Representación en Pantalla.
 Cursor 1 en posición inicial y cursor 2 en posición intermedia.

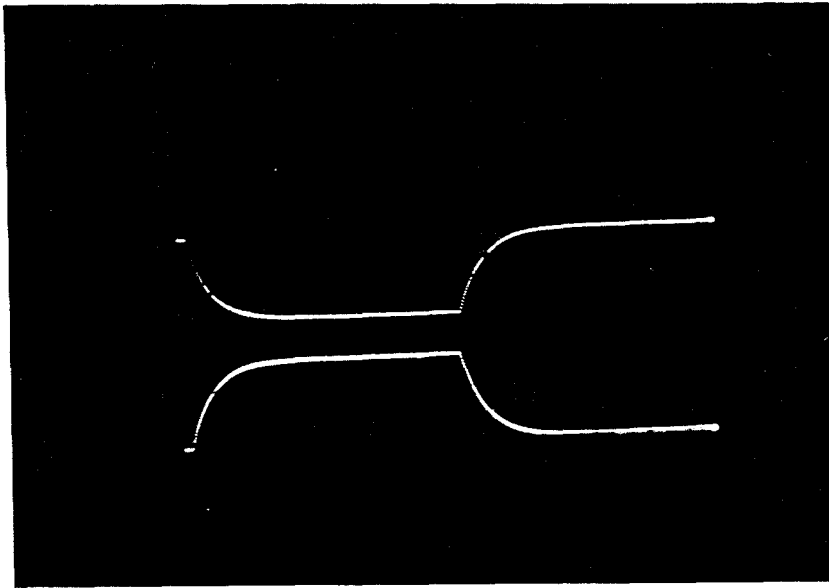


OSCILOGRAMA 20

Señal prueba para la verificación del Sistema de Representación en Pantalla.

Figura 32

OSCILOGRAMA 21



Señales obtenidas mediante el Sistema de Representación en Pantalla.
"Display" de señales respuesta de un circuito RC a un pulso rectangular de idéntica duración, amplitud y polaridad opuesta.

OSCILOGRAMA 22

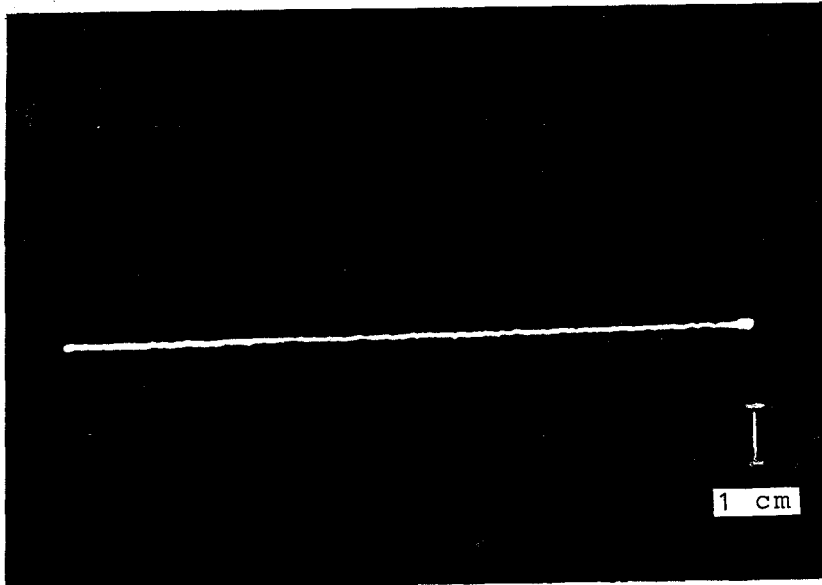
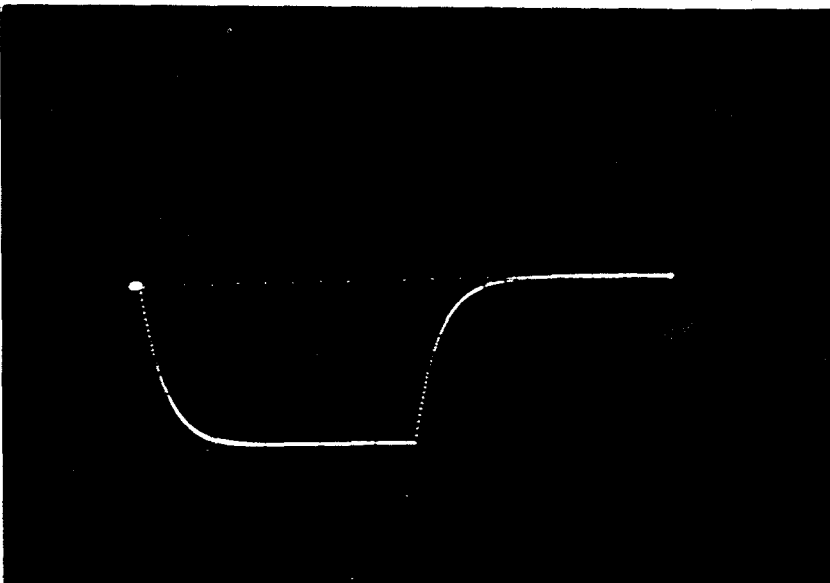


Imagen resultante de la suma de las señales anteriores.
Nivel de ruido aproximado de 9mV

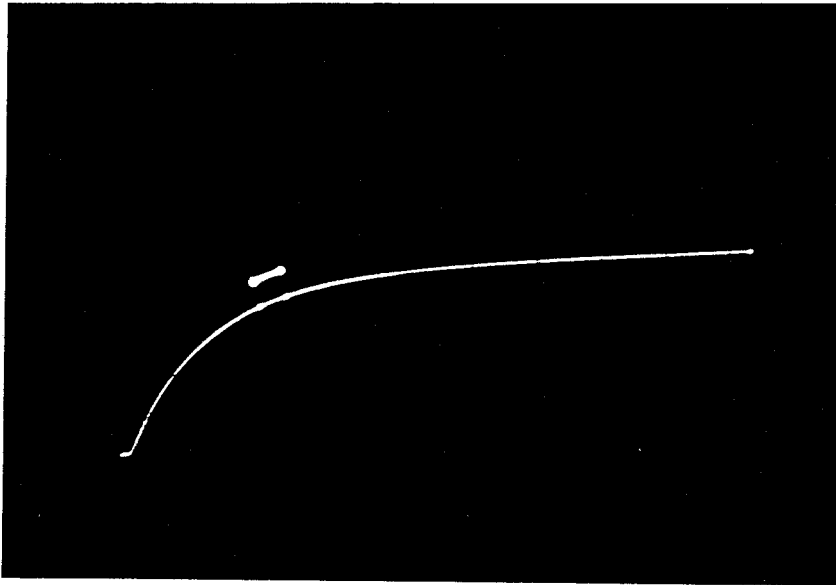
OSCILOGRAMA 23



Representación de la línea de base.

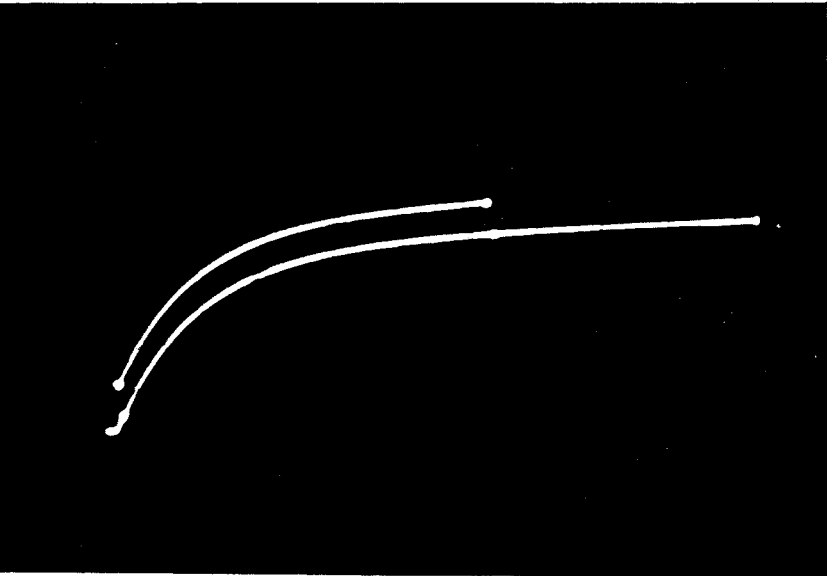
Figura 33

OSCILOGRAMA 24



Comparación de la señal
obtenida mediante aproxi-
mación matemática con la
función original.
Número de puntos empleados
para el ajuste=25.

OSCILOGRAMA 25



Comparación de la señal
obtenida mediante aproxi-
mación matemática con la
función original.
Número de puntos empleados
para el ajuste=325.

Figura 34

2 Registros de corrientes iónicas.

Con objeto de comprobar el funcionamiento del sistema descrito en el presente trabajo, cuyo esquema general se representa en la figura 1, se procedió al registro de corrientes de potasio generadas por células Y01. Los registros presentados en las figuras 35-38, se han obtenido con un "holding potential" (HP) de -70 mV, siendo la resistencia de realimentación del amplificador de "patch clamp" utilizado de 100 M Ω . La solución interna contenía: ClK (140 mM), Cl₂Mg (2 mM), Hepes (10 mM) y EGTA (0.5 mM); y la solución externa: POWER COMP. en mM.

La utilización del protocolo num. 1 (véase figura 5) para medida de la resistencia de sello y resistencia de entrada de la célula en configuración "whole-cell clamp", se presenta en la figura 35 a una velocidad de muestreo de 20 μ s. La figura 35A muestra el registro obtenido al establecer el sello entre la membrana celular y el microelectrodo, después de ser compensada la capacidad del electrodo y de la pequeña área de membrana en contacto con él. La figura 35C corresponde a la corriente registrada al romper la membrana, observándose un incremento de la capacidad. Ambas situaciones se ilustran en las figuras 35B y 35D. La figura 35E representa una primera aproximación del circuito eléctrico equivalente para esta configuración, donde C_m y R_m representan la capacidad y resistencia de la membrana respectivamente siendo R_a la resistencia de acceso al parche de membrana (resistencia en serie). Para determinar la capacidad de la célula se procede a la estimación de la carga total que atraviesa la membrana tras la aplicación de un pulso. La medida de esta carga eléctrica se lleva a cabo por integración de la corriente capacitativa registrada, como muestra la figura 35F, resultando en este caso un valor

de 0.15 pC. La capacidad que corresponde a esta carga es de 15 pF ya que la amplitud del pulso fué de 10 mV.

Asumiendo que la capacitancia específica de la membrana es en promedio $1 \pm 0.1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cole, 1968), el diámetro de la célula donde se realizan estas medidas, considerándola esférica, resulta ser aproximadamente de 21.78 μm . Este valor es similar al que se midió directamente mediante el microscopio.

El cálculo de la resistencia en serie R_s , de gran valor experimental, ya que permite medir con exactitud el potencial transmembrana (véase Sigworth, 1983), se obtiene partiendo de la relación

$$i(t) = \frac{V_{ref}}{R_s + R_m} \left[1 - \exp\left(- \frac{R_s + R_m}{R_s R_m C_m} t \right) \right] + \frac{V_{ref}}{R_s} \exp\left(- \frac{R_s + R_m}{R_s R_m C_m} t \right)$$

donde, $i(t)$ es la corriente registrada y V_{ref} es la amplitud del pulso de tensión aplicado.

Debido a que en la mayor parte de las células estudiadas $R_m \gg R_s$, la expresión anterior adopta la forma

$$i(t) = \frac{V_{ref}}{R_s} \exp\left(- \frac{t}{R_s C_m} \right)$$

donde la constante de tiempo vendrá dada por

$$\tau = R_s * C_m$$

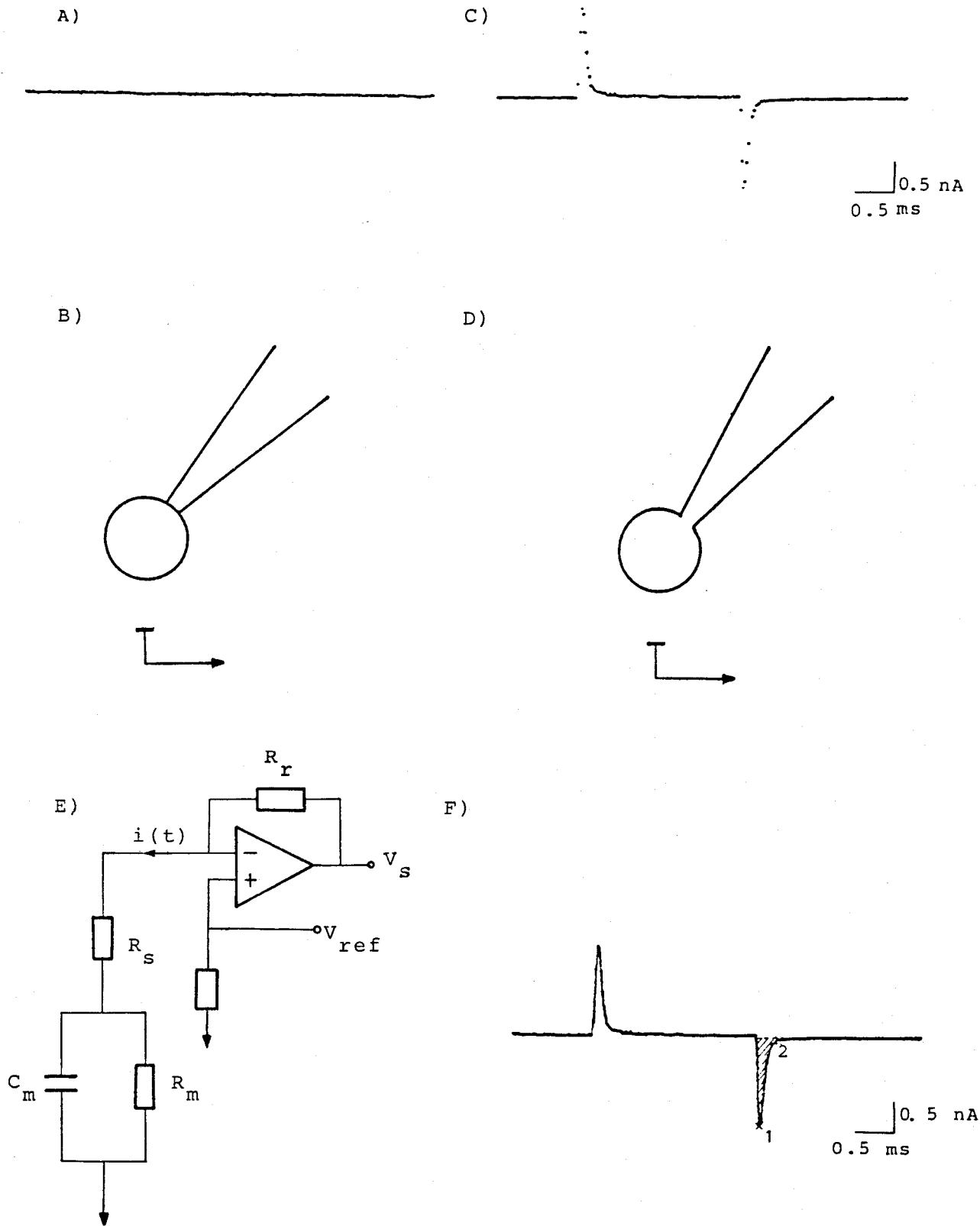


Figura 35

Esta igualdad nos permite determinar la resistencia en serie R_s mediante el ajuste exponencial del tramo de la curva comprendido entre los puntos 1 y 2 (véase figura 35F) obteniendo una constante de tiempo de 50 μ s, resultando por lo tanto un valor para R_s de 3.33 M Ω .

La figura 36 muestra registros de corrientes iónicas de K^+ obtenidos a potencial de membrana controlado mediante pulsos de duración 50 ms correspondientes al protocolo num. 2. En todos los casos la velocidad de muestreo (SR) fué de 200 μ s, el potencial de reposo ("holding potential") - 70 mV y la ganancia del amplificador de "patch-clamp" (GC) igual a 1. La figura 36A muestra la respuesta de la célula cuando la amplitud del pulso es de 130 mV (despolarización a +60 mV). La eliminación de las corrientes capacitativas y de fuga, se realizó mediante la aplicación del mismo estímulo pero con 4 pulsos de sustracción, registrándose la corriente de la figura 36B. La figura 36C presenta la corriente anterior tras realizar un filtrado mediante el promedio de tres puntos consecutivos de la misma. Las figuras 36D, 36E y 36F corresponden a los registros obtenidos mediante un proceso idéntico al anterior pero utilizando un pulso de 90 mV de amplitud (despolarización a +20 mV). En A-C, la corriente es mayor que en D-F debido a la diferencia en ambas situaciones experimentales del gradiente electroquímico para los iones de K^+ . En A y D el inicio de la activación y el cierre están contaminados por los transientes capacitativos los cuales se eliminan por la sustracción lineal realizada en los casos B y E que permiten un análisis detallado de ambos. La figura 37A muestra una serie de registros en los que se aprecia la activación de una corriente de K^+ desde el interior al exterior de la célula con un curso temporal sigmoideo típico de estas corrientes, y al final del pulso una corriente

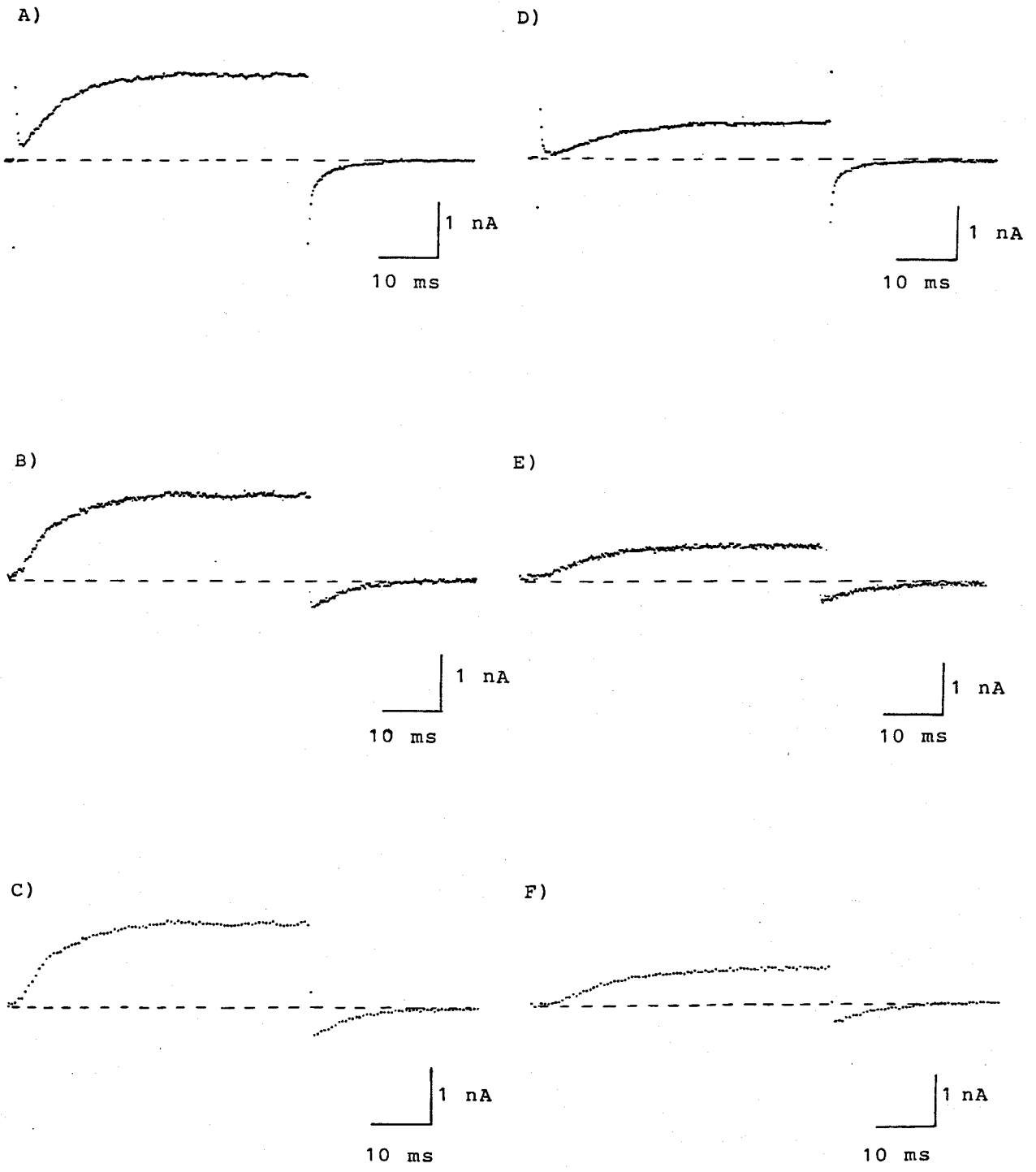
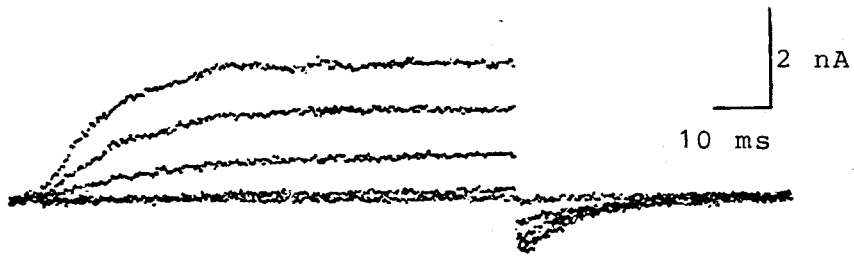
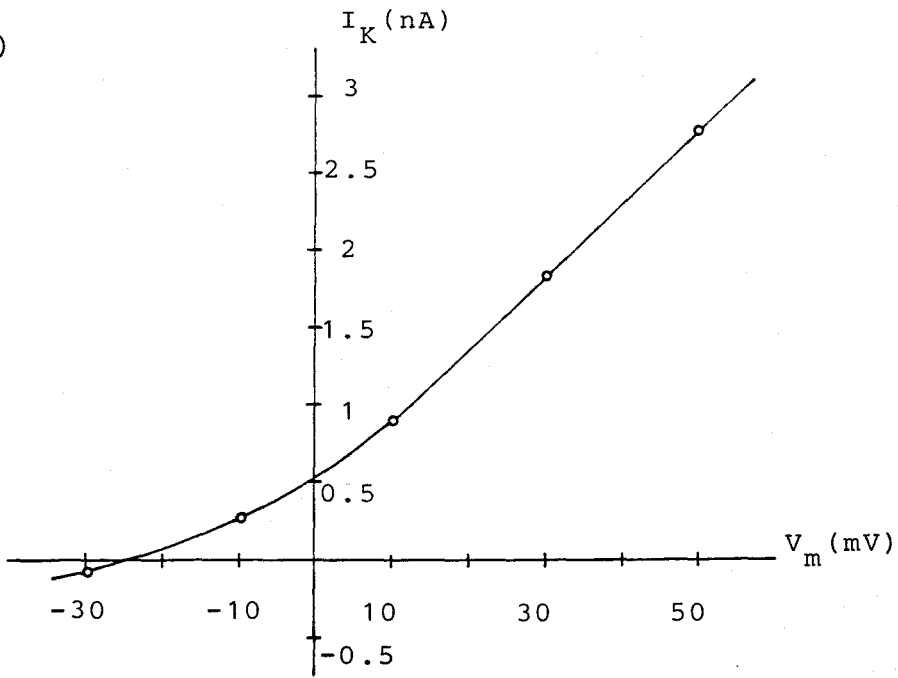


Figura 36

A)



B)



C)

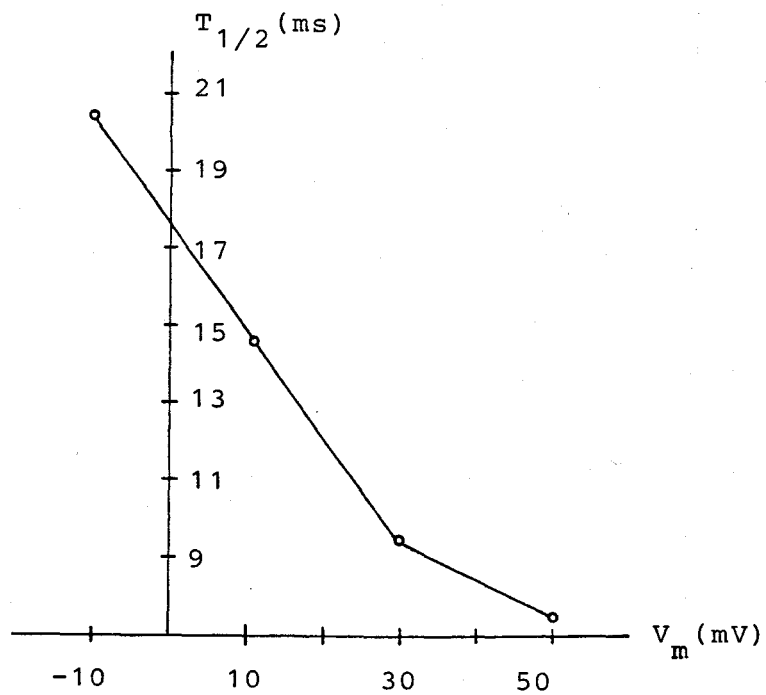


Figura 37

de cola debido al cierre paulativo de los canales previamente abiertos. Todas estas corrientes fueron registradas mediante la utilización del protocolo num. 2 al aplicar pulsos de amplitudes 40,60,80,100 y 120 mV, todos ellos con una duración de 50 ms. En todos los casos la adquisición se llevó a cabo con sustracción lineal ($N=4$), con una velocidad de muestreo de 200 μ s y siendo la ganancia del amplificador de "patch clamp" igual que el caso anterior. La figura 37B es la representación I_k/V_m (corriente de potasio/potencial de membrana), observándose en ella un aumento de la corriente conforme el potencial de membrana se hace menos negativo y el gradiente electroquímico para los iones de K^+ aumenta. La figura 37C representa en el eje de ordenadas la magnitud $T_{1/2}$ (tiempo para el cual la amplitud de la corriente es la mitad de la amplitud máxima) y en el eje de abcisas la variable V_m (potencial de membrana). Esta relación muestra que la cinética de activación de la corriente es más rápida conforme la amplitud de la despolarización de la membrana es mayor.

En la figura 38 se ilustra la utilización del protocolo num. 5 para estudiar las corrientes de cola ("tail currents"). La figura 38A es la respuesta de la célula a un pulso generado por el protocolo num. 2. Con objeto de registrar el efecto del cierre de los canales, se comienza la adquisición 8 puntos antes de la finalización del estímulo, como se indica en esta figura. Para ello, se genera un pulso de 120 mV de amplitud y 50 ms de duración, registrándose la corriente de la figura 38B. El estudio de la cinética de cierre de los canales se realiza mediante el ajuste exponencial del tramo de dicha corriente comprendido entre los puntos 1 y 2, resultando la función exponencial de la figura 38C. En la figura 38D, se muestra la representación conjunta de la

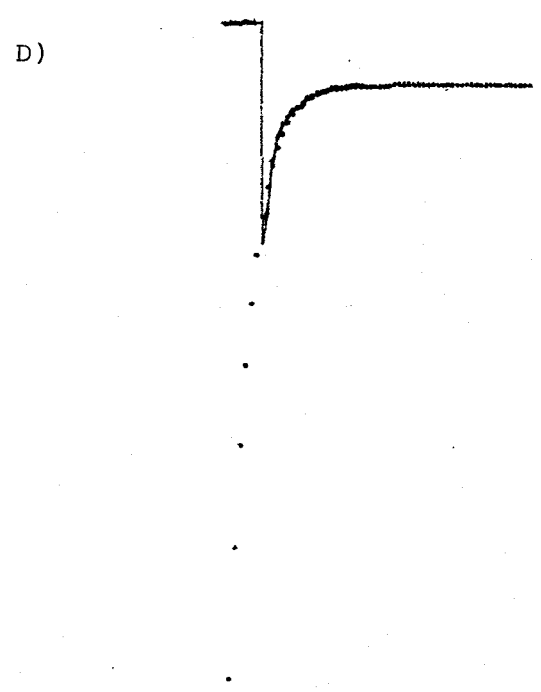
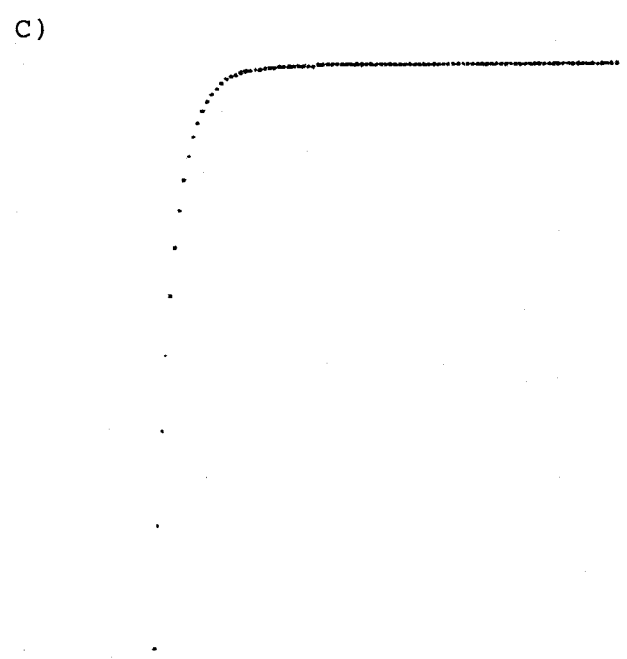
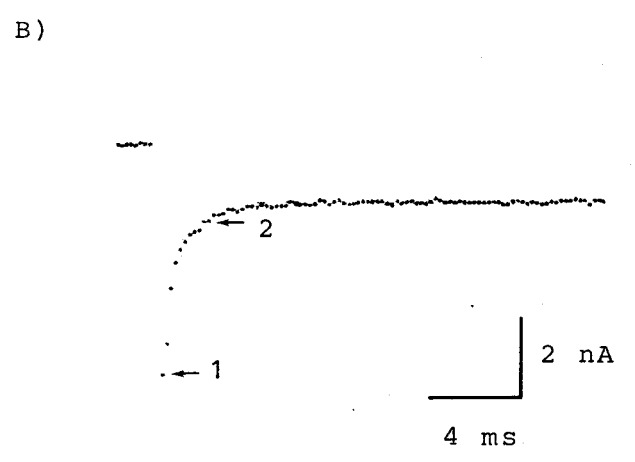
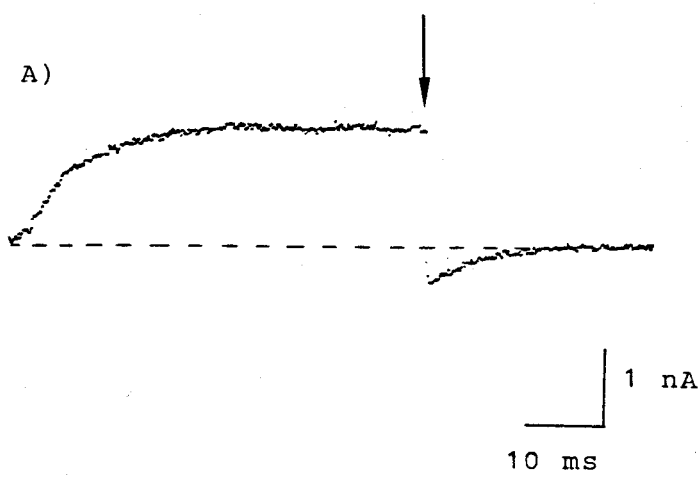


Figura 38

corriente (trazo continuo) y de la función exponencial (trazo discontinuo). Con objeto de cuantificar la calidad de dicho ajuste, se procedió a la determinación del coeficiente de correlación resultando un valor de 0.974.

CONCLUSIONES

- 1) En el presente trabajo se ha diseñado e implementado un sistema de activación, adquisición, almacenamiento y análisis de corrientes iónicas transmembrana, generadas en células en cultivo y registradas mediante la técnica de "patch-clamp".
- 2) El sistema se ha diseñado en base a un ordenador IBM PC/XT, pudiendo ser utilizado con los microprocesadores compatibles al 8088 de Intel.
- 3) El control de todo el sistema se realiza mediante un programa principal en Basic y varias subrutinas escritas en Ensamblador.
- 4) La unidad de estimulación diseñada permite generar protocolos de pulsos con características seleccionables desde el teclado del ordenador.

5) Los protocolos definidos permiten obtener información sobre aspectos biofísicos de los canales iónicos presentes en la membrana celular. La utilización de nuevos protocolos es posible siempre que se proceda a su definición previa mediante una subrutina.

6) Las características temporales de los patrones de pulso empleados, se han obtenido mediante lazos de espera controlados desde programa.

7) La frecuencia de muestreo del sistema de adquisición se seleccionada desde teclado adoptando un valor máximo de 50 KHz, la cual es suficiente para realizar el registro de las señales que se pretenden analizar.

8) El inicio de conversión está sincronizado para cada protocolo con el pulso aplicado mediante el sistema de estimulación.

9) El número de puntos que se adquieren en cada activación celular es de 500. Esta información es suficiente para analizar las corrientes iónicas que de forma transitoria se generan en la membrana. Este número puede ser ampliado con ligeras modificaciones en el programa.

10) El control mediante programa de la velocidad de muestreo se realiza con un lazo de espera a partir de una relación obtenida entre este parámetro y el contador que indica el número de veces que se ejecuta dicho lazo. La duración aproximada de éste es 3.8 μ s.

11) El sistema de representación en pantalla diseñado permite visualizar la señal adquirida sin necesidad de utilizar un osciloscopio digital. La

disposición de dos salidas hacen posible la representación de dos señales simultáneamente.

12) Se han definido dos cursores para seleccionar diferentes tramos de la señal a analizar.

13) El análisis de la corriente iónica adquirida conlleva el cálculo de la carga eléctrica involucrada en el proceso, la valoración de la cinética de apertura y cierre de canales permite la realización de modelos cinéticos del funcionamiento de los diferentes tipos de canales iónicos de la membrana celular.

14) La posibilidad de almacenamiento en disco de la señal, junto con sus parámetros, permite el análisis "off-line" de la misma.

A P E N D I C E I

A continuación se muestra el diagrama de flujo general del sistema de estimulación, adquisición, representación en pantalla y análisis, así como el modo de selección de las distintas funciones realizadas por cada uno de ellos. El programa Anala.Bas solicita durante su ejecución la información que se especifica a continuación:

- Parámetros generales

Nombre del directorio

Potencial de reposo

Ganancia del amplificador de "patch-clamp"

Velocidad de muestreo

Número de pulsos de sustracción

- MENU 1

Cambio del potencial de reposo y ganancia del amplificador de "patch-clamp". Clave "c"

Cambio en el número de pulsos de sustracción. Clave "n"

Cambio de la velocidad de muestreo. Clave "r"

Generación de estímulo. Clave "b"

Número de protocolo

Características del protocolo

Amplitud del prepulso

Duración del prepulso

Amplitud del pulso "test"

Duración del pulso "test"

Intervalo entre prepulso y pulso

"Sub-holding potential"

Representación en pantalla. Clave "l"

Fin del programa. Clave "f"

- MENU 2

Almacenamiento de la señal así como los parámetros generales y característicos. Clave "s"

Generación de un estímulo idéntico al anterior. Clave "y"

Generación de un estímulo idéntico al anterior en el que varía una única característica. Clave "i"

Presentación en pantalla de parámetros generales y característicos. Clave "p"

Presentación posición de cursores. Clave "k"

Presentación de amplitudes de ambos cursores. Clave "f"

Definición de la línea de base. Clave "."

Intervalo de tiempo entre los dos cursores. Clave "t"

Ajuste exponencial. Clave "x"

Cálculo del área encerrada por la señal. Clave "u"

Salida a MENU 1. Clave "e"

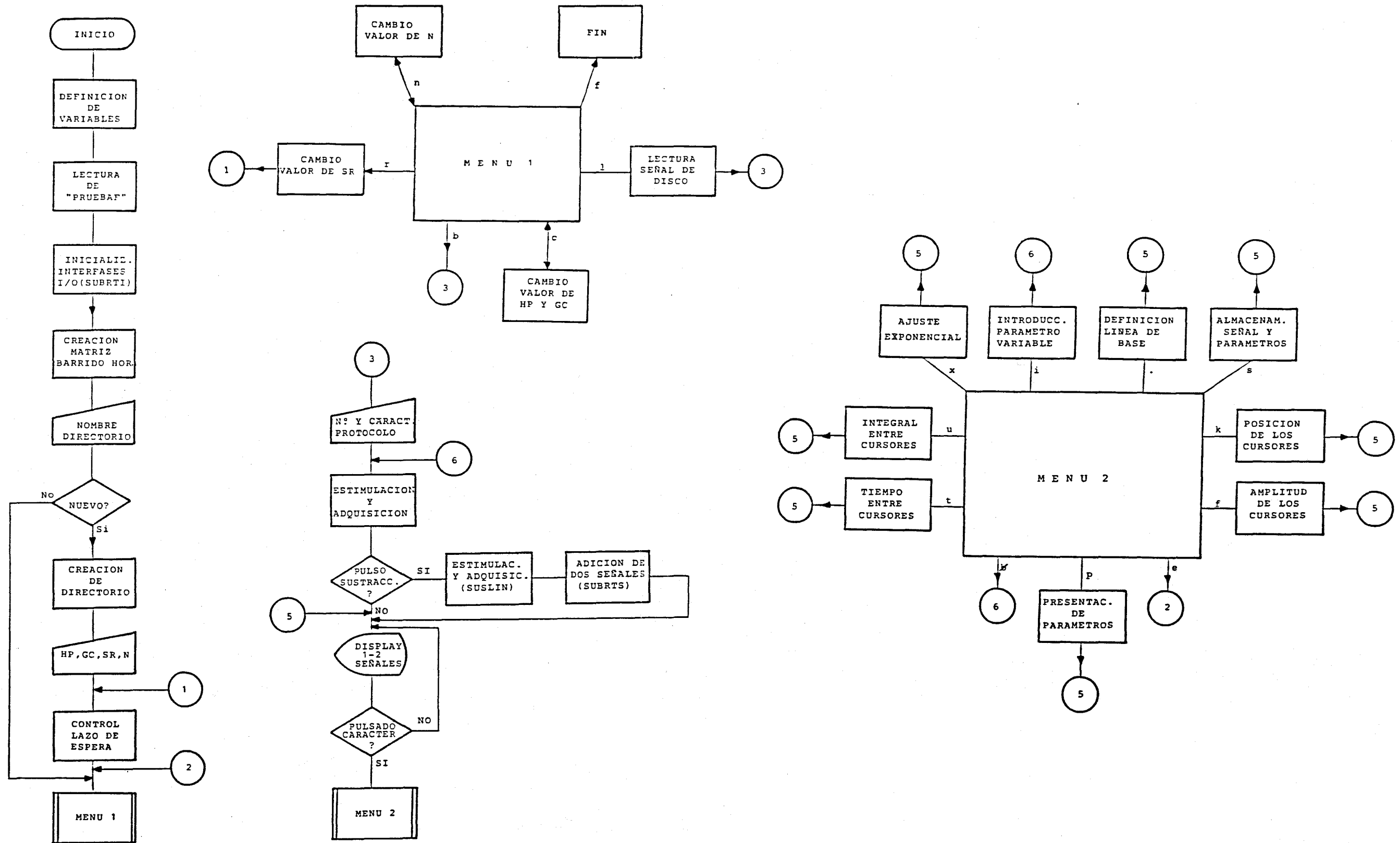


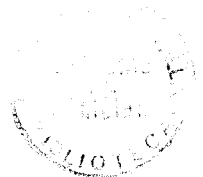
Figura 39. Diagrama de flujo general.

A P E N D I C E I I

```

10  REM
20  REM                      PROGRAMA  ANALA
30  REM
40  REM
50  REM INICIALIZACION DE VARIABLES
60  REM
70  DEFINT A-X:YF=1000/31.44
80  DIM X(500),R1(512),R2(500),R3(500),R4(500),R5(500),R(512),ZE(500),V(500),
    RA(500),YIN(500)
90  XD=0:D1=0:D2=0:D3=0:D4=0:D5=0:D=0:SUBRT1=0:SUBRTS=0:SUSLIN=0:SUBRTI=0:
    SUBRCH=0:A=0:HP=0:GC=0:CO=0:A$="":SR=0:B$="":B=0:DU=0:TR=0:H=0:C1=2 :
    SUBRT2=0:SUBRT3=0:SUBRTR=0:SUBRT3=0:SUBRT4=0:SUBRT5=0:SUBRTD=0:CAN=0:T=0:
100 YSR=0:XR=0:YB2=0:C2=7:C3=0:S$="":NF$="":F$="":J=0:I=0:SUBRCH=0:V$="":AI=0:
    DI=0:API=0:AP=0:HPI=0:T=0 :SHPI=0
110 AI$="":DUI$="":V=0:Y2=0:V1=0:V2=0:Y1=0:DR=0:NT=0:PR=0:PI=0:N=0:IN=0:DP=0:
    ZA=0:ZB=0:Z=0:LB=0:B1=0:B2=0:YB1=0:C=0:R=0:Z1=0:Z2=0:Z3=0:Z4=0:Z5=0:Z6=0
120 REM
130 REM SE CARGA "PRUEBAF" Y SE INICIALIZAN LAS INTERFASES
140 REM
150 DEF SEG=&H1C00:BLOAD "pruebaf",0 :SUBRTI=&HE:CALL SUBRTI:DEF SEG
160 REM
170 REM CREACION DE LA MATRIZ X QUE DEFINE LA SEÑAL DE BARRIDO
180 REM
190 J=0:FOR I=47 TO 4047 STEP 8:X(J)=I:J=J+1:NEXT I
200 REM
210 REM INTRODUCCION DE LOS PARAMETROS GENERALES
220 REM
230 PRINT:INPUT "DIRECTORIO":F$
240 PRINT:INPUT "DISCO FLEXIBLE (A), DISCO DURO (C)":X$:F$=X$+"": "+F$
250 PRINT:INPUT "NEW (1), OLD (0)":Q
260 IF Q=0 THEN 390
270 IF Q=1 THEN 290
280 GOTO 250
290 MKDIR F$:PRINT:INPUT "HP(mv),GAIN ":HP,GC
300 PRINT:INPUT "SR":SR:PRINT:INPUT "N":N
310 REM
320 REM DEFINICION DE LA VARIABLE CO SEGUN EL VALOR DE LA VELOCIDAD DE
    MUESTREO
330 REM
340 IF SR=20 THEN CO=0:GOTO 390
350 CO=CINT(SR/3.81-8.12)
360 REM
370 REM MENU 1
380 REM

```



```

390 A$=INKEY$: IF A$="" THEN 390
400 IF ASC(A$)=110 THEN PRINT: INPUT "n"; N: GOTO 390
410 IF ASC(A$)=98 THEN 470
420 IF ASC(A$)=114 THEN PRINT: INPUT "SR"; SR: GOTO 340
430 IF ASC(A$)=99 THEN PRINT: INPUT "HP,GC"; HP,GC: GOTO 390
440 IF ASC(A$)=108 THEN 1890
450 IF ASC(A$)=102 THEN END
460 PRINT: PRINT "CLAVE ERRONEA": GOTO 390
470 REM
480 PRINT: PRINT: PRINT "PROTOCOLO ?"
490 REM
500 B$=INKEY$: IF B$="" GOTO 500
510 IF ASC(RIGHT$(B$,1))=79 THEN B=1: PRINT "1": GOTO 570
520 IF ASC(RIGHT$(B$,1))=80 THEN B=2: PRINT "2": GOTO 650
530 IF ASC(RIGHT$(B$,1))=81 THEN B=3: PRINT "3": GOTO 770
540 IF ASC(RIGHT$(B$,1))=75 THEN B=4: PRINT "4": GOTO 960
550 IF ASC(RIGHT$(B$,1))=77 THEN B=5: PRINT "5": GOTO 1160
560 IF ASC(RIGHT$(B$,1))=71 THEN B=6: PRINT "6": GOTO 1380
570 REM
580 REM PROTOCOLO 1
590 REM
600 IF C=0 THEN TIME$="00:00:00": V$=TIME$
610 C1=2: C2=7: D1=VARPTR(R1(0)): DEF SEG=&H1C00: SUBRT1=%HED : CALL SUBRT1(D1):
DEF SEG: CAN=1: GOTO 1580
620 REM
630 REM PROTOCOLO 2
640 REM
650 PRINT: INPUT "AMPLITUD, DURACION"; AI$, DI$ : T=0: AI=VAL(AI$): DI=VAL(DI$)
660 A=(AI+256)/2: D=DI*YF
670 IF RIGHT$(AI$,1)="v" AND T=1 THEN PRINT: INPUT "Amplitud del pulso"; AI:
A=(AI+256)/2: GOTO 690
680 IF RIGHT$(DI$,1)="v" AND T=1 THEN PRINT: INPUT "Duración del pulso"; DI:
D=DI*YF
690 IF N<>0 THEN H=-AI/N: H=(H+256)/2
700 IF C=0 THEN TIME$="00:00:00": V$=TIME$
710 IF DI<SR*.492 THEN TR=0: PI=(DI*1000)/SR: PR=492-PI: GOTO 740
720 TR=(DI-CINT(SR*.492))*YF: PI=492: PR=0
730 IF TR=0 THEN TR=1
740 D1=VARPTR(R1(0)): AP=128: DP=1: IN=1: DEF SEG=&H1C00: SUBRT2=%H120:
CALL SUBRT2(IN, AP, DP, PR, PI, D1, TR, CO, A): DEF SEG: C1=2: C2=7
750 IF N=0 THEN CAN=1: GOTO 1580
760 GOTO 1490
770 REM
780 REM PROTOCOLO 3
790 REM
800 PRINT: PRINT "PULSO"
810 PRINT: INPUT "Amplitud, duración"; AI, DI: A=(AI+256)/2: D=DI*YF:
TR=(DI-CINT(SR*.492))*YF
820 IF TR=0 THEN TR=1
830 IF N<>0 THEN H=-AI/N: H=(H+256)/2
840 PRINT: PRINT "PREPULSO"

```

```

850 PRINT: INPUT "Amplitud, duración"; API, DPI: AP=(API+256)/2: DP=DPI*YF
860 PRINT: INPUT "INTERVALO"; INI: IN=INI*YF
870 IF C=0 THEN TIME$="00:00:00": V$=TIME$
880 IF DI<SR*.492 THEN TR=0: PI=(DI*1000)/SR: PR=492-PI: GOTO 900
890 PI=492: PR=0
900 D1=VARPTR(R1(0)): DEF SEG=&H1C00: SUBRT2=&H120:
CALL SUBRT2(IN, AP, DP, PR, PI, D1, TR, CD, A): DEF SEG: C1=2: C2=7
910 IF N=0 THEN CAN=1 : GOTO 1580
920 GOTO 1490
930 REM
940 REM PROTOCOLO 4
950 REM
960 PRINT: PRINT "PREPULSO"
970 PRINT: INPUT "Amplitud, duración"; API$, DPI$: T=0: API=VAL(API$): DPI=VAL(DPI$)
980 PRINT: PRINT "PULSO"
990 PRINT: INPUT "Amplitud, duración"; AI$, DI$: AI=VAL(AI$): DI=VAL(DI$)
1000 AP=(API+256)/2: A=(AI+256)/2: DP=DPI*YF: D=DI*YF
1010 IF RIGHT$(API$,1)="v" AND T=1 THEN PRINT: INPUT "Amplitud del prepulso"; API:
AP=(API+256)/2: GOTO 1050
1020 IF RIGHT$(DPI$,1)="v" AND T=1 THEN PRINT: INPUT "Duración del prepulso"; DPI:
DP=DPI*YF: GOTO 1050
1030 IF RIGHT$(AI$,1)="v" AND T=1 THEN PRINT: INPUT "Amplitud del pulso"; AI:
A=(AI+256)/2: GOTO 1050
1040 IF RIGHT$(DI$,1)="v" AND T=1 THEN PRINT: INPUT "Duración del pulso"; DI:
D=DI*YF
1050 IF N<>0 THEN H=-AI/N: H=(H+256)/2
1060 IF C=0 THEN TIME$="00:00:00": V$=TIME$
1070 IF DI<SR*.492 THEN TR=0: PI=(DI*1000)/SR: PR=492-PI: GOTO 1100
1080 TR=(DI-CINT(SR*.492))*YF: PI=492: PR=0
1090 IF TR=0 THEN TR=1
1100 D1=VARPTR(R1(0)): IN=1: DEF SEG=&H1C00: SUBRT2=&H120:
CALL SUBRT2(IN, AP, DP, PR, PI, D1, TR, CD, A) : DEF SEG: C1=2: C2=7
1110 IF N=0 THEN CAN=1: GOTO 1580
1120 GOTO 1490
1130 REM
1140 REM PROTOCOLO 5
1150 REM
1160 PRINT: PRINT "PREPULSO"
1170 PRINT: INPUT "Amplitud, duración"; API$, DPI$: T=0: API=VAL(API$): DPI=VAL(DPI$)
1180 PRINT: PRINT "PULSO"
1190 PRINT: INPUT "Amplitud, duración"; AI$, DI$: AI=VAL(AI$): DI=VAL(DI$)
1200 AP=(API+256)/2: A=(AI+256)/2: DP=DPI*YF: D=(DI-8*SR*.001)*YF:
TR=(200-SR*.492)*YF
1210 IF TR=0 THEN TR=1
1220 IF RIGHT$(API$,1)="v" AND T=1 THEN 1270
1230 IF RIGHT$(DPI$,1)="v" AND T=1 THEN 1280
1240 IF RIGHT$(AI$,1)="v" AND T=1 THEN 1290
1250 IF RIGHT$(DI$,1)="v" AND T=1 THEN 1300
1260 GOTO 1460
1270 IF T<>0 THEN INPUT "Amplitud del prepulso"; API: AP=(API+256)/2: GOTO 1320

```

```

1280 IF T<>0 THEN INPUT "Duración del prepulso";DPI:DP=DPI*YF:GOTO 1320
1290 IF T<>0 THEN INPUT "Amplitud del pulso";AI:A=(AI+256)/2:GOTO 1320
1300 IF T<>0 THEN INPUT "Duración del pulso";DI:D=(DI-8*SR*.001)*YF
1310 IF C=0 THEN TIME$="00:00:00":V$=TIME$
1320 D1=VARPTR(R1(0)):SHP=128:DEF SEG=&H1C00 :SUBRT3=&H185:
CALL SUBRT3(D1,CO,SHP,TR,D,A,DP,AP):DEF SEG:C1=2:C2=7
1330 IF N=0 THEN CAN=1:GOTO 1580
1340 GOTO 1490
1350 REM
1360 REM PROTOCOLO 6
1370 REM
1380 PRINT:PRINT"PREPULSO"
1390 PRINT:INPUT"Amplitud,duración";API,DPI:AF=(256+API)/2:DF=DPI*YF
1400 PRINT:PRINT"PULSO"
1410 PRINT:INPUT "Amplitud,duración";AI,DI:A=(256+AI)/2:D=(DI-SR*8*.001)*YF
1420 TR=(200-SR*.492)*YF
1430 IF TR=0 THEN TR=1
1440 PRINT:INPUT"SHP";SHP:SHPI:SHP=(SHPI+256)/2
1450 IF C=0 THEN TIME$="00:00:00":V$=TIME$
1460 D1=VARPTR(R1(0)):DEF SEG=&H1C00:SUBRT3=&H185:
CALL SUBRT3(D1,CO,SHP,TR,D,A,DP,AP):DEF SEG :C1=2:C2=7
1470 IF N=0 THEN CAN=1:GOTO 1580
1480 GOTO 1490
1490 REM
1500 REM SUMA DE SEÑALES
1510 REM
1520 D2=VARPTR(R2(0)):D3=VARPTR(R3(0)):D4=VARPTR(R4(0)):D5=VARPTR(R5(1)):
DEF SEG=&H1C00:SUSLIN=&H421
1530 CALL SUSLIN(PR,PI,N,H,D5,D4,D3,D2,TR,CO):DEF SEG
1540 IF N=1 THEN D=VARPTR(R(0)):D1=VARPTR(R1(0)):D2=VARPTR(R2(0)):
DEF SEG=&H1C00:SUBRTS=&H3BE:CALL SUBRTS(D,D1,D2):DEF SEG:D1=D:CAN=1:
GOTO 1580
1550 IF N=2 THEN D=VARPTR(R(0)):D1=VARPTR(R1(0)):D2=VARPTR(R2(0)):
D3=VARPTR(R3(0)):DEF SEG=&H1C00:SUBRTS=&H3BE:CALL SUBRTS(D,D1,D2):
CALL SUBRTS(D,D,D3):DEF SEG:D1=D:CAN=1:GOTO 1580
1560 IF N=4 THEN D=VARPTR(R(0)):D1=VARPTR(R1(0)):D2=VARPTR(R2(0)):
D3=VARPTR(R3(0)):D4=VARPTR(R4(0)):D5=VARPTR(R5(0)):DEF SEG=&H1C00:
SUBRTS=&H3BE:CALL SUBRTS(D,D1,D2):CALL SUBRTS(D,D,D3)
1570 CALL SUBRTS(D,D,D4):CALL SUBRTS(D,D,D5):DEF SEG:D1=D:CAN=1
1580 REM
1590 REM REPRESENTACION EN PANTALLA DE 1 O 2 SEÑALES
1600 REM
1610 C1=500-C1:C2=500-C2
1620 XD=VARPTR(X(0)):DEF SEG=&H1C00:SUBRTD =&H1D7 :
CALL SUBRTD(D,CAN,C3,C1,C2,XD,D1):DEF SEG
1630 REM
1640 REM MENU 2
1650 REM
1660 IF C3=32 AND B=1 THEN 570
1670 IF C3=32 AND B=2 THEN 740

```



```

1680 IF C3=32 AND B=3 THEN 900
1690 IF C3=32 AND B=4 THEN 1100
1700 IF C3=32 AND B=5 THEN 1320
1710 IF C3=32 AND B=6 THEN 1460
1720 IF C3=105 AND B=1 THEN 570
1730 IF C3=105 AND B=2 THEN T=1:GOTO 670
1740 IF C3=105 AND B=3 THEN 860
1750 IF C3=105 AND B=4 THEN T=1:GOTO 1010
1760 IF C3=105 AND B=5 THEN 1210
1770 IF C3=105 AND B=6 THEN T=1:GOTO 1440
1780 IF C3=108 THEN DEF SEG:GOTO 1920
1790 IF C3=115 THEN 2110
1800 IF C3=112 THEN 1990
1810 IF C3=101 THEN 390
1820 IF C3=107 THEN 2390
1830 IF C3=46 THEN 2460
1840 IF C3=102 THEN 2500
1850 IF C3=116 THEN 2550
1860 IF C3=117 THEN 2610
1870 IF C3=120 THEN 2700
1880 PRINT:PRINT"CLAVE ERRONEA":GOTO 1580
1890 REM
1900 REM CARGADO DE UN BARRIDO EN MEMORIA Y DISPLAY
1910 REM
1920 PRINT:PRINT:INPUT "SWP";S$:C1=2:C2=7
1930 PRINT:INPUT "PROTDCOLO";B
1940 IF RIGHT$(S$,1)="b" THEN CAN=2:D=VARPTR(R(0)):
  NF#=F$+"\swp"+LEFT$(S$,LEN(S$)-1):BLOAD NF#,D:SR=R(500):GOTO 1580
1950 CAN=1:NF#=F$+"\swp"+S$:D1=VARPTR(R1(0)):BLOAD NF#,D1:SR=R1(500):GOTO 1580
1960 REM
1970 REM PRESENTACION DE PARAMETROS
1980 REM
1990 PRINT:PRINT:PRINT"SR   =";R1(500);"micro seg."
2000 PRINT"N     =";R1(501)
2010 PRINT"HP   =";R1(502);"mV"
2020 PRINT"GANANCIA=";R1(503)
2030 PRINT"AMP   =";R1(504);"mV"
2040 PRINT"DUR   =";R1(505);"ms"
2050 PRINT"TIM   =";R1(506);":":R1(507);":":R1(508)
2060 PRINT"AMP-P=";R1(509);"mV"
2070 PRINT"DUR-P=";R1(510);"ms"
2080 PRINT"INT   =";R1(511);"ms"
2090 PRINT"SHF   =";R1(512);"Mv"
2100 D1=VARPTR(R1(0)):GOTO 1580
2110 REM
2120 REM ASIGNACION DE PARAMETROS
2130 REM
2140 IF B=1 THEN 2300
2150 V#=TIME$:IF N=0 THEN 2230
2160 IF B<>3 THEN INI=0
2170 IF B<>6 THEN SHPI=0

```

```

2180 R(500)=SR:R(501)=N:R(502)=HP:R(503)=GC:R(504)=AI:R(505)=DI
2190 R(506)=VAL(LEFT$(V$,2)):R(507)=VAL(MID$(V$,4,2)):R(508)=VAL(RIGHT$(V$,2))
2200 IF B=2 THEN R(509)=0:R(510)=0:R(511)=0:R(512)=0:GOTO 2360
2210 R(509)=API:R(510)=DPI:R(511)=INI:R(512)=SHPI
2220 GOTO 2360
2230 IF B<>3 THEN INI=0
2240 IF B<>6 THEN SHPI=0
2250 R1(500)=SR:R1(501)=N:R1(502)=HP:R1(503)=GC:R1(504)=AI:R1(505)=DI:
R1(506)=VAL(LEFT$(V$,2)):R1(507)=VAL(MID$(V$,4,2)):
R1(508)=VAL(RIGHT$(V$,2))
2260 IF B=2 THEN R1(509)=0:R1(510)=0:R1(511)=0:R1(512)=0:GOTO 2360
2270 R1(509)=API:R1(510)=DPI:R1(511)=INI:R1(512)=SHPI
2280 GOTO 2360
2290 IF B=2 THEN R1(509)=0:R1(510)=0:R1(511)=0:R1(512)=0:GOTO 2360
2300 R1(500)=20:R1(501)=N:R1(502)=HP:R1(503)=GC:R1(504)=10:R1(505)=2
2310 R1(506)=VAL(LEFT$(V$,2)):R1(507)=VAL(MID$(V$,4,2))
2320 R1(508)=VAL(RIGHT$(V$,2)):FOR I=509 TO 512:R1(I)=0:NEXT I
2330 REM
2340 REM ALMACENAMIENTO DE LA SEÑAL Y PARAMETROS
2350 REM
2360 C=C+1:NF$=F$+"\swp"+RIGHT$(STR$(C),LEN(STR$(C))-1)
2370 IF N=0 THEN D1=VARPTR(R1(0)):BSAVE NF$,D1,&H402:PRINT"swp";C:C1=2:C2=7:
CAN=1:GOTO 1580
2380 C1=2:C2=7:D=VARPTR(R(0)):BSAVE NF$,D,&H402:D1=D:PRINT"swp";C:CAN=1:
GOTO 1580
2390 REM
2400 REM POSICION DE LOS CURSORES
2410 REM
2420 C1=500-C1:C2=500-C2:PRINT"POSICION CURSOR 1=";C1:
PRINT"POSICION CURSOR 2=";C2:GOTO 1580
2430 REM
2440 REM REPRESENTACION DE LA LINEA DE BASE
2450 REM
2460 LB=(R1(2)+R1(7))/2:FOR I=0 TO 500 STEP 25:R1(I)=LB:NEXT I:C1=500-C1:
C2=500-C2:GOTO 1580
2470 REM
2480 REM AMPLITUD DE LOS CURSORES
2490 REM
2500 C1=500-C1:C2=500-C2:D1=VARPTR(R1(1)):GOSUB 2930:GOSUB 2830:
Y1=PEEK(D1+2*C1)*256+PEEK(D1+2*C1+1):Y2=PEEK(D1+2*C2)*256+PEEK(D1+2*C2+1):
V1=CINT((Y1-32768!)/6.553)-LB:V2=CINT((Y2-32768!)/6.553)-LB
2510 PRINT"AMPLITUD DEL CURSOR 1=";V1:PRINT:PRINT"AMPLITUD DEL CURSOR 2=";V2:
GOSUB 2930:GOTO 1580
2520 REM
2530 REM TIEMPO ENTRE LOS CURSORES
2540 REM
2550 GOSUB 2940
2560 C1=500-C1:C2=500-C2:XR=(C1-C2)*YSR
2570 PRINT:PRINT"DURACION";XR;"micro sg.":GOTO 1580

```

```

2580 REM
2590 REM INTEGRAL
2600 REM
2610 ZT=0:C1=500-C1:C2=500-C2
2620 IF C1=C2 THEN 2690
2630 D1=VARPTR(R1(0)):GOSUB 2930:FOR I=C1 TO C2 :
YIN(I)= PEEK(D1+2*I)*256+PEEK(D1+2*I+1):NEXT I:GOSUB 2830
2640 FOR I=C1 TO C2:V(I)=(YIN(I)-32768!)/6.553-LB:ZT=ZT+V(I):NEXT I
2650 ZT=ZT-(V(C1)+V(C2))/2
2660 GC=R1(503)
2670 GOSUB 2940
2680 ZT=(ZT*YSR)/(10^5*GC)
2690 PRINT:PRINT"INTEGRAL="; ZT;"pC.":GOSUB 2930:GOTO 1580
2700 REM
2710 REM AJUSTE EXPONENCIAL
2720 REM
2730 D1=VARPTR(R1(0)):GOSUB 2930 :C1=500-C1:C2=500-C2:N=C2-C1+1:GOSUB 2830
2740 Z1=0:Z2=0:Z3=0:Z4=0:Z5=0:Z6=0:J=0:FOR I=0 TO 1000 STEP 2:
ZE(J)= PEEK(D1+I)*256+PEEK(D1+I+1):V(J)=-CINT((ZE(J)-32768!)/6.553) +LB:
J=J+1:NEXT I
2750 FOR I=C1 TO C2 :Z1=Z1+I:Z2=Z2+I*LOG(V(I)):Z3=Z3+I^2:Z4=Z4+LOG(V(I)):
NEXT I:Z5=Z1*Z1:Z6=N*Z3
2760 Z=(Z1*Z2-Z3*Z4)/(Z5-N*Z3):ZA=EXP(Z):ZB=(N*Z2-Z1*Z4)/(N*Z3-Z5):
D=VARPTR(RA(C1))
2770 FOR I=C1 TO C2 :ZE(I)=ZA*EXP(ZB*I):NEXT I
2780 FOR I=C1 TO C2 :RA(I)=(LB-ZE(I))*6.553+32768!:NEXT I
2790 J=0:FOR I=C1 TO C2 :C=FIX(RA(I)/256):R=RA(I)-256*C:POKE D+J,C:
POKE D+J+1,R :J=J+2:NEXT I:GOSUB 2940
2800 T=YSR/ZB:PRINT:PRINT"CONSTANTE DE TIEMPO=";T;"MICRO SEG."
2810 D1=VARPTR(RA(0)):GOSUB 2930:D1=VARPTR(R1(0)):GOSUB 2930 :CAN=2:
D1=VARPTR(R1(0)):D=VARPTR(RA(0)):GOTO 1580
2820 REM
2830 IF B=5 OR B=6 THEN 2910
2840 REM
2850 REM SE DEFINE LA LINEA DE BASE COMO MEDIA ENTRE LOS PUNTOS 2 Y 7
(PROTOCOLOS 1-4)
2860 REM
2870 YB1=PEEK(D1+4)*256+PEEK(D1+5):YB2=PEEK(D1+14)*256+PEEK(D1+15):
B1=CINT((YB1-32768!)/6.553):B2=CINT((YB2-32768!)/6.553):LB=(B1+B2)/2:RETURN
2880 REM
2890 REM SE DEFINE LA LINEA DE BASE COMO MEDIA ENTRE LOS PUNTOS 494 Y 498
(PROTOCOLOS 5 Y 6)
2900 REM
2910 YB1=PEEK(D1+988)*256+PEEK(D1+989):YB2=PEEK(D1+996)*256+PEEK(D1+997)
2920 B1=CINT((YB1-32768!)/6.553):B2=CINT((YB2-32768!)/6.553):LB=(B1+B2)/2:RETURN
2930 DEF SEG=&H1C00:SUBRCH =&H493:CALL SUBRCH(D1):DEF SEG:RETURN
2940 IF B=1 THEN SR=20
2950 IF SR=20 THEN YSR=20.496:RETURN
2960 IF SR=50 THEN YSR=50.88:RETURN
2970 IF SR=100 THEN YSR=100.51:RETURN
2980 IF SR=200 THEN YSR=198.85
2990 RETURN

```

```

0000          cseg      segment
0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000
0002 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000
0004 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000
0006 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000
0008 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000
000A 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000
000C 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000

          ;SUBROUTINA DE INICIALIZACION DE INTERFASES

000E          subrti   proc      far
          ;Iniciación del sistema de
          ;estimulación (G.P.F.)
000E BA 0303      mov      dx,303h
0011 B0 80        mov      al,10000000b
0013 EE          out      dx,al
          ;PC6
          set
0014 B0 0D        mov      al,00001101b
0016 EE          out      dx,al
          ;Salida del G.P.F. a 0 V
0017 B0 80        mov      al,128
0019 BA 0301      mov      dx,301h
001C EE          out      dx,al
          ;Iniciación del sistema de
          ;representación en pantalla
001D BA 031B      mov      dx,31bh

0020 B0 80        mov      al,10000000b
0022 EE          out      dx,al
0023 BA 0307      mov      dx,307h
0026 EE          out      dx,al
          ;Iniciación del sistema de
          ;adquisición
0027 BA 0313      mov      dx,313h

002A B0 BF        mov      al,10111111b
002C EE          out      dx,al
          ;Retorno a Basic
002D CB          ret
002E          subrti   endp

          ;SUBROUTINA DE GENERACION DEL ESTIMULO Y ADQUI-
          ;SICION DE LA RESPUESTA

002E          subrtip  proc      near
002E 2E: 83 3E 0002 R 00      ;Se pregunta por la duración del pulso
0034 74 53      cmp      var1,0
          je      11a
          ;A) DURACION DEL PULSO >SR*.492
          ;Se pregunta por la frecuencia de
          ;muestreo (20 micro seg. o restantes)

```

```

0036 B3 F9 00          cmp     cx,0
0039 74 1E              je      11
;A.1)Frecuencia de muestreo<>50 Kz (CO<>0)
;Inicio de conversión:PC6 "reset"
003B B0 0C              mov     al,00001100b
003D BA 0303           mov     dx,303h
0040 EE                out     dx,al
0041 B0 0D              mov     al,00001101b
0043 EE                out     dx,al
0044 B9 000B           mov     cx,8
;Conversión y adquisición de 8 puntos
0047 EB 03F0 R         call    subrtal
;Se inicia la generación del pulso
004A BA 0301           mov     dx,301h
004D B6 E0             xchg   ah,al
004F EE                out     dx,al
0050 B9 01EC           mov     cx,492
;Conversión y adquisición de los
;492 puntos restantes
0053 EB 03F0 R         call    subrtal
0056 EB 1C 90          jmp     12
;A.2)Frecuencia de muestreo=50 Kz (CO=0)
11:
0059 B0 0C              mov     al,00001100b
005B BA 0303           mov     dx,303h
005E EE                out     dx,al
005F B0 0D              mov     al,00001101b
0061 EE                out     dx,al
0062 B9 000B           mov     cx,8
0065 EB 040D R         call    subrta
0068 B6 E0             xchg   ah,al
006A BA 0301           mov     dx,301h
006D EE                out     dx,al
006E B9 01EC           mov     cx,492
0071 EB 040D R         call    subrta
;Tiempo de espera (según valor de TR)
;antes de finalizar la generación
;del pulso
0074 2E: 8B 0E 0002 R   12:    mov     cx,var1
0079 BB 0001             mov     ax,1
007C F7 EB             13:    imul   ax
007E E2 FC             loop   13
;Finalización del protocolo
0080 B0 80              mov     al,12B
0082 BA 0301           mov     dx,301h
0085 EE                out     dx,al
0086 EB 64 90          jmp     11f
;B) DURACION DEL PULSO<=SR*.492
11a:  mov     cx,var
0089 2E: 8B 0E 0000 R   11a:   cmp     cx,0
008E B3 F9 00          je      11b
0091 74 2E              je      11b
;B.1)Frecuencia de muestreo<>50 Kz (CO<>0)
0093 B9 000B           mov     cx,8

```

```

                                ;Inicio de conversión :FC6 "reset"
0096 B0 0C                      mov     al,00001100b
0098 BA 0303                    mov     dx,303h
009B EE                          out     dx,al
009C B0 0D                      mov     al,00001101b
009E EE                          out     dx,al
                                ;Conversión y adquisición de 8 puntos
009F EB 03F0 R                  call    subrtal
                                ;Se inicia la generación del pulso
00A2 B6 E0                      xchg   ah,al
00A4 BA 0301                    mov     dx,301h
00A7 EE                          out     dx,al
00AB 2E: 8B 0E 0004 R          mov     cx,var2
                                ;Conversión y adquisición de "PI"
                                ;puntos
00AD EB 03F0 R                  call    subrtal
                                ;Final de la generación del pulso
00B0 B0 80                      mov     al,128
00B2 BA 0301                    mov     dx,301h
00B5 EE                          out     dx,al
00B6 2E: 8B 0E 0006 R          mov     cx,var3
                                ;Conversión y adquisición de "FR"
                                ;puntos
00BB EB 03F0 R                  call    subrtal
00BE EB 2C 90                    jmp     11f
                                ;B.2)Frecuencia de muestreo 50 Kz (CO=0)
00C1 B9 0008                    11b:   mov     cx,8
00C4 B0 0C                      mov     al,00001100b
00C6 BA 0303                    mov     dx,303h
00C9 EE                          out     dx,al
00CA B0 0D                      mov     al,00001101b
00CC EE                          out     dx,al
00CD EB 040D R                  call    subrta
00D0 B6 E0                      xchg   ah,al
00D2 BA 0301                    mov     dx,301h
00D5 EE                          out     dx,al
00D6 2E: 8B 0E 0004 R          mov     cx,var2
00DB EB 040D R                  call    subrta
00DE BA 0301                    mov     dx,301h
00E1 B0 80                      mov     al,128
00E3 EE                          out     dx,al
00E4 2E: 8B 0E 0006 R          mov     cx,var3
00E9 EB 040D R                  call    subrta
00EC C3                          11f:   ret
00ED                               subrt1 proc    far
                                ;Obtención del argumento DI
00ED 55                          push   bp
00EE 8B EC                      mov     bp,sp
00F0 8B 7E 06                    mov     di,[bp]+6

```

```

                                ;GENERACION DEL PROTOCOLO NUM. 1

```

```

00ED                               subrt1 proc    far
                                ;Obtención del argumento DI
00ED 55                          push   bp
00EE 8B EC                      mov     bp,sp
00F0 8B 7E 06                    mov     di,[bp]+6

```

```

00F3 BB 3D          mov     di,[di]
00F5 B9 0032       mov     cx,50
                    ;Inicio la conversión:PC6 "reset"
00F8 B0 0C          mov     al,00001100b
00FA BA 0303       mov     dx,303h
00FD EE           out     dx,al
                    ;PC6 "set"
00FE B0 0D          mov     al,00001101b
0100 EE           out     dx,al
                    ;Conversión y adquisición de 50 puntos
0101 EB 040D R     call    subrta
                    ;Se genera a la salida del GPP una
                    ;tensión de 100 mV
0104 B0 B5          mov     al,133
0106 BA 0301       mov     dx,301h
0109 B9 0064       mov     cx,100
010C EE           out     dx,al
                    ;Conversión y adquisición de 100 puntos
010D EB 040D R     call    subrta
                    ;Se situa la salida del GPP a 0 V
0110 B0 B0          mov     al,128
0112 BA 0301       mov     dx,301h
0115 B9 015E       mov     cx,350
0118 EE           out     dx,al
                    ;conversión y adquisición de 350 puntos
0119 EB 040D R     call    subrta
011C 5D            pop     bp
011D CA 0002       ret     2
0120                subrt1 endp

```

```

;GENERACION DE LOS PROTOCOLOS NUM.2, NUM.3
;Y NUM. 4

```

```

0120                subrt2 proc     far
                    ;Obtención de cinco argumentos:CO,TR,
                    ;D1,PI,PR
0120 55            push    bp
0121 8B EC         mov     bp,sp
0123 8B 76 0B     mov     si,[bp]+8
0126 8B 0C         mov     cx,[si]
012B 2E: B9 0E 0000 R  mov     var,cx
012D 8B 5E 0A     mov     bx,[bp]+10
0130 8B 1F         mov     bx,[bx]
0132 2E: B9 1E 0002 R  mov     var1,bx
0137 8B 5E 0C     mov     bx,[bp]+12
013A 8B 3F         mov     di,[bx]
013C 8B 5E 0E     mov     bx,[bp]+14
013F 8B 1F         mov     bx,[bx]
0141 2E: B9 1E 0004 R  mov     var2,bx
0146 8B 5E 10     mov     bx,[bp]+16
0149 8B 1F         mov     bx,[bx]
014B 2E: B9 1E 0006 R  mov     var3,bx
                    ;Generación del prepulso

```

```

                                ;Obtención de la amplitud del prepulso
                                ;(argumento AF)
0150  BB 5E 14      mov     bx,[bp]+20
0153  8A 07         mov     al,[bx]
0155  51            push    cx
                                ;Obtención de la duración del prepulso
                                ;(argumento DF)
0156  BB 5E 12      mov     bx,[bp]+18
0159  BB 0F         mov     cx,[bx]
015B  BA 0301       mov     dx,301h
015E  EE           out     dx,al
015F  BB 0001       mov     ax,1
                                ;Lazo de espera que controla la
                                ;duración del prepulso
0162  F7 EB        15:    imul   ax
0164  E2 FC         loop   15
                                ;Generación del intervalo
0166  B0 80         mov     al,128
                                ;Obtención de la duración del intervalo
                                ;(argumento IN)
0168  BB 5E 16      mov     bx,[bp]+22
016B  BB 0F         mov     cx,[bx]
016D  BA 0301       mov     dx,301h
0170  EE           out     dx,al
0171  BB 0001       mov     ax,1
                                ;Lazo de espera que controla la
                                ;duración del intervalo
0174  F7 EB        16:    imul   ax
0176  E2 FC         loop   16
                                ;Obtención de la amplitud del pulso
                                ;(argumento A)
0178  BB 5E 06      mov     bx,[bp]+6
017B  8A 27         mov     ah,[bx]
                                ;Generación del pulso y adquisición de la
                                ;respuesta
017D  59            pop     cx
017E  EB 002E R     call   subrt2
                                ;Recupero BP y retorno a Basic
0181  5D            pop     bp
0182  CA 0012       ret     18
0185  subrt2  endp

                                ;GENERACION DE LOS PROTOCOLOS NUM.6 Y NUM.7

0185  subrt3  proc    far
                                ;Obtención de los argumentos:AP,DF,TR,
                                ;y direcciones de D y A
0185  55            push   bp
0186  BB EC         mov    bp,sp
0188  BB 7E 06      mov    di,[bp]+6
018B  8A 05         mov    al,[di]
018D  BB 76 08      mov    si,[bp]+8
0190  BB 0C         mov    cx,[si]

```



```

0192 8B 76 0E          mov     si,[bp]+14
0195 8B 34              mov     si,[si]
0197 2E: 89 36 0002 R   mov     var1,si
019C 8B 5E 0C          mov     bx,[bp]+12
019F 8B 7E 0A          mov     di,[bp]+10
                                ;Generación del prepulso
01A2 BA 0301          mov     dx,301h
01A5 EE              out     dx,al
01A6 8B 0001          mov     ax,1
                                ;Lazo de espera que controla la
                                ;duración del prepulso
01A9 F7 EB          117:   imul   ax
01AB E2 FC          loop   117
                                ;Generación del pulso
01AD BA 05          mov     al,[di]
01AF 8B 0F          mov     cx,[bx]
01B1 BA 0301          mov     dx,301h
01B4 EE              out     dx,al
01B5 8B 0001          mov     ax,1
                                ;Lazo de espera que controla la
                                ;duración del pulso
01B8 F7 EB          118:   imul   ax
01BA E2 FC          loop   118
                                ;Obtención de los argumentos D1,C0 y
                                ;SHF
01BC 8B 7E 14          mov     di,[bp]+20
01BF 8B 3D          mov     di,[di]
01C1 8B 76 12          mov     si,[bp]+18
01C4 8B 0C          mov     cx,[si]
01C6 2E: 8B 0E 0000 R   mov     cx,var
01CB 8B 5E 10          mov     bx,[bp]+16
01CE BA 27          mov     ah,[bx]
                                ;Finalización de la generación del
                                ;pulso y adquisición de 492 puntos
01D0 EB 002E R        call   subrt3
01D3 5D              pop     bp
01D4 CA 0010          ret     16
01D7                subrt3 endp

                                ;REPRESENTACION EN PANTALLA DEL OSCILOSCOPIO
                                ;DE 1 O 2 SEÑALES
01D7                subrtd  proc   far
                                ;Obtención de los argumentos:C1,C2,D1,
                                ;XD,D,CAN
01D7 55              push   bp
01D8 8B EC          mov     bp,sp
01DA 8B 5E 0C          mov     bx,[bp]+12
01DD 8B 07          mov     ax,[bx]
01DF 8B 76 0A          mov     si,[bp]+10
01E2 8B 14          mov     dx,[si]
01E4 8B 7E 06          mov     di,[bp]+6
01E7 8B 3D          mov     di,[di]

```

```

01E9 2E: 89 3E 0002 R      mov     var1,di
01EE BB 5E 08             mov     bx,[bp]+8
01F1 BB 1F                 mov     bx,[bx]
01F3 2E: 89 1E 0004 R      mov     var2,bx
01F8 BB 5E 12             mov     bx,[bp]+18
01FB BB 1F                 mov     bx,[bx]
01FD 2E: 89 1E 0006 R      mov     var3,bx
0202 BB 5E 10             mov     bx,[bp]+16
0205 BB 1F                 mov     bx,[bx]
0207 2E: 89 1E 0008 R      mov     var4,bx
                                ;Transferencia a los registros DI,BX Y
                                ;SI de los argumentos D1,XD y D respect

020C 2E: BB 3E 0002 R      151:   mov     di,var1
0211 2E: BB 1E 0004 R      mov     bx,var2
0216 2E: BB 36 0006 R      mov     si,var3
021B B9 01F4             mov     cx,500
021E 2E: B9 16 000A R      mov     var5,dx
0223 2E: A3 000C R        mov     var6,ax
0227                               152   :
                                ;Transferencia de un punto de la
                                ;señal a las PA de las interfases
                                ;(canal I)
0227 BA 0304             mov     dx,304h
022A BA 05             mov     al,byte ptr[di]
022C EE                 out     dx,al
022D 47                 inc     di
022E BA 05             mov     al,byte ptr[di]
0230 BA 0318             mov     dx,318h
0233 EE                 out     dx,al
0234 47                 inc     di
                                ;Se pregunta por el número de señales
                                ;a representar
0235 2E: 83 3E 0008 R 01   cmp     var4,1
023B 74 0E                 je      150
                                ;Transferencia de un punto de la señal
                                ;a las PC de las interfases (canal II)
023D BA 0306             mov     dx,306h
0240 BA 04             mov     al,byte ptr[si]
0242 EE                 out     dx,al
0243 46                 inc     si
0244 BA 031A             mov     dx,31ah
0247 BA 04             mov     al,byte ptr[si]
0249 EE                 out     dx,al
024A 46                 inc     si
                                ;Transferencia de un punto de la
                                ;señal de barrido horizontal a las
                                ;PB de las interfases
024B BA 0305             150:   mov     dx,305h
024E BA 07             mov     al,byte ptr[bx]
0250 EE                 out     dx,al
0251 43                 inc     bx
0252 BA 07             mov     al,byte ptr[bx]

```

```

0254 BA 0319      mov     dx,319h
0257 EE          out     dx,al
0258 43          inc     bx
                ;Se activa la señal "latch enable"
0259 BA 031F      mov     dx,31fh
025C EE          out     dx,al
                ;Si procede, se define el cursor 1
025D 2E: 3B 0E 000C R  cmp     cx,var6
0262 74 0A          je      153
                ;Si procede, se define el cursor 2
0264 2E: 3B 0E 000A R  cmp     cx,var5
0269 74 03          je      153
026B EB 0B 90      jmp     155
026E 51          153:  push   cx
                ;Lazo de espera para definición de
                ;cursores
026F B9 01F4      mov     cx,500
0272 E2 FE          154:  loop   154
0274 59          pop     cx
                ;Se continúa con la transmisión de la/s
                ;señal/es si el registro CX<>0
0275 E2 B0          155:  loop   152
                ;Finalización de la transmisión de los
                ;500 puntos
                ;Se investiga si ha sido introducido
                ;un carácter desde teclado
0277 B4 06      mov     ah,6
0279 B2 FF      mov     dl,11111111b
027B CD 21      int     21h
027D 8A C8      mov     cl,al
                ;Se transfiere a los registros AX y DX
                ;las posiciones de los cursores 1 y 2
                ;respectivamente
027F 2E: A1 000C R  mov     ax,var6
0283 2E: 8B 16 000A R  mov     dx,var5
                ;Se repite el display de los 500
                ;puntos si no ha sido introducido
                ;ningún carácter
0288 74 82          jz      151
                ;Identificación del carácter introdu-
                ;cido
028A 80 F9 61      cmp     cl,"a"
028D 74 57          je      159
028F 80 F9 62      cmp     cl,"b"
0292 74 5A          je      160
0294 80 F9 63      cmp     cl,"c"
0297 74 5D          je      161
0299 80 F9 64      cmp     cl,"d"
029C 74 60          je      162
029E 80 F9 6B      cmp     cl,"k"
02A1 74 63          je      163
02A3 80 F9 73      cmp     cl,"s"
02A6 74 20          je      156

```

```

02A8 80 F9 20          cmp     cl," "
02AB 74 25             je      157
02AD 80 F9 69          cmp     cl,"i"
02B0 74 2A             je      158
02B2 80 F9 65          cmp     cl,"e"
02B5 74 63             je      164
02B7 80 F9 66          cmp     cl,"f"
02BA 74 68             je      165
02BC 80 F9 70          cmp     cl,"p"
02BF 74 77             je      166
02C1 EB 7F 90          jmp     1109
02C4 5D                lf1:   pop     bp
02C5 CA 000E           ret     14

;Ejecución de la operación asociada al
;carácter pulsado
;Almacenamiento en disco desde Basic
;de la señal registrada, así como los
;parámetros generales del experimento y
;los característicos del protocolo
02CB 8B 7E 0E          156 : mov     di,[bp]+14
02CC C7 05 0073        mov     word ptr[di],115
02CF E9 03BA R          jmp     lf

;Ejecución de un proceso de estimula-
;ción y adquisición idéntico al
;anterior
02D2 8B 7E 0E          157 : mov     di,[bp]+14
02D5 C7 05 0020        mov     word ptr[di],32
02D9 E9 03BA R          jmp     lf

;Ejecución del proceso de estimula-
;ción y adquisición idéntico al
;anterior, pero con la variación de
;alguna característica del protocolo
02DC 8B 7E 0E          158 : mov     di,[bp]+14
02DF C7 05 0069        mov     word ptr[di],105
02E3 E9 03BA R          jmp     lf

;Desplazamiento desde el teclado del
;cursor 1 hacia la derecha
02E6 2E: 03 06 0000 R  159: add     ax,var
02EB E9 020C R          jmp     151

;Desplazamiento desde el teclado del
;cursor 1 hacia la izquierda
02EE 2E: 2B 06 0000 R  160: sub     ax,var
02F3 E9 020C R          jmp     151

;Desplazamiento desde el teclado del
;cursor 2 hacia la derecha
02F6 2E: 03 16 0000 R  161: add     dx,var
02FB E9 020C R          jmp     151

;Desplazamiento desde el teclado del
;cursor 2 hacia la izquierda
02FE 2E: 2B 16 0000 R  162: sub     dx,var
0303 E9 020C R          jmp     151

;Determinación, desde Basic, de las
;posiciones de ambos cursores

```

```

0306 BB 7E 0C          163:  mov     di,[bp]+12
0309 B9 05             mov     [di],ax
030B BB 7E 0A          mov     di,[bp]+10
030E B9 15             mov     [di],dx
0310 BB 7E 0E          mov     di,[bp]+14
0313 C7 05 006B        mov     word ptr [di],107
0317 E9 03BA R        jmp     lf
                        ;Finalización de la subrutina

031A                  164:
031A BB 5E 0E          mov     bx,[bp]+14
031D C7 07 0065        mov     word ptr [bx],101
0321 E9 03BA R        jmp     lf
                        ;Obtención, desde Basic, de la amplitud
                        ;de los puntos sobre los que están
                        ;posicionados los cursores

0324 BB 7E 0C          165:  mov     di,[bp]+12
0327 B9 05             mov     [di],ax
0329 BB 7E 0A          mov     di,[bp]+10
032C B9 15             mov     [di],dx
032E BB 5E 0E          mov     bx,[bp]+14
0331 C7 07 0066        mov     word ptr [bx],102
0335 E9 03BA R        jmp     lf
                        ;Obtención, desde Basic, de los
                        ;parámetros generales del experimento,
                        ;así como las características del
                        ;protocolo

0338 BB 7E 0E          166:  mov     di,[bp]+14
033B C7 05 0070        mov     word ptr [di],112
033F EB 79 90          jmp     lf
                        ;Identificación del carácter introdu-
                        ;cido

0342 B0 F9 3A          1109: cmp     cl,":"
0345 74 1C             je     1110
0347 B0 F9 3B          cmp     cl,";"
034A 74 21             je     1111
034C B0 F9 2E          cmp     cl, "."
034F 74 26             je     1112
0351 B0 F9 74          cmp     cl,"t"
0354 74 2B             je     1113
0356 B0 F9 75          cmp     cl,"u"
0359 74 3A             je     1114
035B B0 F9 7B          cmp     cl,"x"
035E 74 49             je     1115
0360 E9 020C R        jmp     151
                        ;Ejecución de la operación asociada con el
                        ;carácter introducido desde el teclado
                        ;El desplazamiento de los cursores se
                        ;llevará a cabo con el salto de una
                        ;posición

0363 2E: C7 06 0000 R 0001 1110: mov     var,1
036A E9 020C R        jmp     151
                        ;El desplazamiento de los cursores se
                        ;llevará a cabo con el salto de cuatro

```

```

036D 2E: C7 06 0000 R 0004 1111:  mov     var,4
0374 E9 020C R                jmp     151
                                ;Definición, desde Basic, de la línea
                                ;de base
0377 BB 7E 0E                1112:  mov     di,[bp]+14
037A C7 05 002E                mov     word ptr[di],46
037E EB 3A 90                jmp     lf
                                ;Determinación, desde Basic, del
                                ;intervalo de tiempo entre ambos
                                ;cursores
0381 BB 7E 0C                1113:  mov     di,[bp]+12
0384 89 05                    mov     [di],ax
0386 BB 7E 0A                mov     di,[bp]+10
0389 89 15                    mov     [di],dx
038B BB 7E 0E                mov     di,[bp]+14
038E C7 05 0074                mov     word ptr[di],116
0392 EB 26 90                jmp     lf
                                ;Cálculo, desde Basic, del área
                                ;encerrada por el tramo de señal
                                ;determinada por los cursores y la
                                ;línea de base
                                ;cursores
0395 BB 7E 0C                1114:  mov     di,[bp]+12
0398 89 05                    mov     [di],ax
039A BB 7E 0A                mov     di,[bp]+10
039D 89 15                    mov     [di],dx
039F BB 7E 0E                mov     di,[bp]+14
03A2 C7 05 0075                mov     word ptr[di],117
03A6 EB 12 90                jmp     lf
                                ;Ajuste exponencial del tramo de
                                ;señal indicado por los cursores
03A9 BB 7E 0C                1115:  mov     di,[bp]+12
03AC 89 05                    mov     [di],ax
03AE BB 7E 0A                mov     di,[bp]+10
03B1 89 15                    mov     [di],dx
03B3 BB 7E 0E                mov     di,[bp]+14
03B6 C7 05 0078                mov     word ptr[di],120
03BA 5D                    lf:    pop     bp
03BB CA 000E                ret     14
03BE                        subrt  endp

                                ;SUMA DE DOS SEÑALES ALMACENADAS EN MEMORIA RAM
03BE                        subrts proc     far
03BE 55                        push    bp
03BF BB EC                    mov     bp,sp
                                ;Otención de los argumentos asociados
                                ;a las direcciones de almacenamiento
                                ;de los operandos y del resultado
03C1 BB 76 06                mov     si,[bp]+6
03C4 BB 34                    mov     si,[si]
03C6 BB 7E 08                mov     di,[bp]+8

```

```

03C9 8B 3D          mov     di,[di]
03CB 8B 5E 0A       mov     bx,[bp]+10
03CE 8B 1F          mov     bx,[bx]
03D0 B9 01F4         mov     cx,500
                                ;Comienza la suma de los 500 puntos
03D3 8B 14          181 : mov     dx,[si]
03D5 86 F2         xchg   dh,dl
03D7 8B 05         mov     ax,[di]
03D9 86 E0         xchg   ah,al
03DB 13 C2         adc     ax,dx
03DD 86 E0         xchg   ah,al
03DF 89 07         mov     [bx],ax
03E1 83 C6 02       add     si,2
03E4 83 C7 02       add     di,2
03E7 83 C3 02       add     bx,2
03EA E2 E7         loop   181
                                ;Finaliza la suma de los 500 puntos
03EC 5D          pop     bp
03ED CA 0006       ret     6
03F0                subrts  endp
                                ;
                                ;SUBROUTINA DE ADQUISICION Y ALMACENAMIENTO
                                ;EN MEMORIA RAM.: FRECUENCIA DE MUESTREO
                                ;VARIABLE
                                ;El contenido del registro SI determi-
                                ;na la frecuencia de muestreo
                                ;El registro DI proporciona la
                                ;dirección de almacenamiento de la
                                ;señal en memoria RAM
                                ;El registro CX contiene el número de
                                ;puntos a adquirir
                                ;
03F0                subrtal proc near
                                ;Desactivación de interrupciones
03F0 FA          cli
03F1 BA 0310       mov     dx,310h
                                ;Se transfiere al registro AL el
                                ;contenido de la FA. Esta operación
                                ;inicia otro proceso de muestreo -
                                ;adquisición
03F4 EC          185: in     al,dx
                                ;El contenido del registro AL se
                                ;transfiere a memoria RAM
03F5 8B 05         mov     byte ptr[di],al
03F7 42          inc     dx
                                ;El contenido de la FB se almacena en
                                ;el registro AL
03F8 EC          in     al,dx
03F9 47          inc     di
                                ;El contenido del registro AL se
                                ;transfiere a memoria RAM
03FA 8B 05         mov     byte ptr[di],al
03FC 47          inc     di

```

```

03FD 4A          dec     dx
03FE 51          push   cx
03FF 8B 0C       mov     cx,[si]
                ;Tiempo de espera que controla la
                ;frecuencia de muestreo
0401 90          nop
0402 90          nop
0403 90          nop
0404 90          nop
0405 90          nop
0406 E2 FE       186:   loop   186
                ;Finaliza el lazo de espera
0408 59          pop     cx
                ;Repetimos el proceso de muestreo-
                ;adquisición si CX<>0
0409 E2 E9       loop   185
040B FB          sti
040C C3          ret
040D             subrtal endp

```

```

;SUBROUTINA DE ADQUISICION Y ALMACENAMIENTO
;EN MEMORIA RAM.:FRECUENCIA DE MUESTREO = 50 Kz
                ;El registro DI proporciona la
                ;dirección de almacenamiento de la
                ;señal en memoria RAM
                ;El registro CX contiene el número de
                ;puntos a adquirir

```

```

040D             subrta proc   near
040D FA          cli
040E BA 0310     mov     dx,310h
0411 EC          190:   in     al,dx
0412 8B 05       mov     byte ptr[di],al
0414 42          inc     dx
0415 EC          in     al,dx
0416 47          inc     di
0417 8B 05       mov     byte ptr[di],al
0419 47          inc     di
041A 4A          dec     dx
                ;Tiempo de espera que controla la
                ;frecuencia de muestreo
041B 90          nop
041C 90          nop
                ;Finaliza el tiempo de espera para
                ;control de la frecuencia de muestreo
041D E2 F2       loop   190
041F FB          sti
0420 C3          ret
0421             subrta endp

```

```

;SUBROUTINA QUE GENERA LOS PULSOS DE SUSTRACCION
;Y ADQUIERE LAS RESPUESTAS CORRESPONDIENTES

```



```

0421          suslin  proc    far
0421 55          push   bp
0422 8B EC      mov     bp,sp
           ;Inicialización de la variable var4
0424 2E: C7 06 000B R 0000      mov     var4,0
           ;Obtención de los argumentos:TR,PI y PR
042B 8B 76 08      mov     si,[bp]+8
042E 8B 34          mov     si,[si]
0430 2E: 89 36 0002 R      mov     var1,si
0435 8B 76 16      mov     si,[bp]+22
0438 8B 34          mov     si,[si]
043A 2E: 89 36 0004 R      mov     var2,si
043F 8B 76 18      mov     si,[bp]+24
0442 8B 34          mov     si,[si]
0444 2E: 89 36 0006 R      mov     var3,si
0449 2E: FF 06 000B R      1100:  inc     var4
044E 2E: FF 06 000B R      inc     var4
0453 2E: 8B 36 000B R      mov     si,var4
           ;Se almacena en DI el argumento
           ;asociado a la dirección de almacena-
           ;miento de la respuesta (d2,d3,d4,d5),
           ;según el valor de var4
045B 8B 7A 08      mov     di,[bp+si+8]
045B 8B 3D          mov     di,[di]
           ;Se almacena en el registro ah el
           ;valor de la amplitud del pulso de
           ;sustracción
045D 8B 76 12      mov     si,[bp]+18
0460 8A 24          mov     ah,[si]
           ;Se obtiene el valor del argumento CO
           ;que determina la frecuencia de
           ;muestreo
0462 8B 76 06      mov     si,[bp]+6
0465 8B 0C          mov     cx,[si]
0467 2E: 89 0E 0000 R      mov     var,cx
           ;Se procede a la aplicación del
           ;estímulo y a la adquisición de la
           ;respuesta
046C EB 002E R      call  subrtp
046F B9 06D6      mov     cx,1750
0472 B0 80          mov     al,128
0474 BA 0301      mov     dx,301h
0477 EE          out     dx,al
0478 B8 0001      mov     ax,1
           ;Tiempo de espera antes de aplicar
           ;un nuevo pulso de sustracción
047B F7 EB          1102: imul   ax
047D E2 FC          loop   1102
           ;Se obtiene el argumento N que indica
           ;el número de pulsos de sustracción
047F 8B 5E 14      mov     bx,[bp]+20
0482 8B 1F          mov     bx,[bx]
0484 03 DB          add     bx,bx

```

```

0486 2E: 3B 1E 000B R          cmp     bx,var4
                                ;Según el valor de N, se repite el
                                ;proceso anterior o se retorna a Basic
048B 74 02                    je      1101
048D EB BA                    jmp     1100
048F 5D                        1101:  pop     bp
0490 CA 0014                  ret     20
0493                          suslin  endp

                                ;SUBROUTINA QUE LLEVA A CABO LA INVERSION
                                ;DEL MSB DE LA PALABRA ASOCIADA A CADA PUNTO

0493                          subrch  proc     far
0493 55                          push   bp
0494 BB EC                      mov     bp,sp
                                ;Obtención del argumento asociado a
                                ;la dirección de almacenamiento de
                                ;la señal
0496 8B 76 06                  mov     si,[bp]+6
0499 8B 34                      mov     si,[si]
049B B0 80                      mov     al,10000000b
049D B9 01F4                   mov     cx,500
04A0 BA 1C                      a10:   mov     bl,byte ptr[si]
04A2 32 DB                      xor     bl,al
04A4 8B 1C                      mov     byte ptr[si],bl
04A6 46                          inc     si
04A7 46                          inc     si
04A8 E2 F6                      loop   a10
04AA 5D                          pop     bp
04AB CA 0002                   ret     2
04AE                          subrch  endp
04AE                          cseg   ends
                                end

```

Segments and groups:

Name	Size	align	combine class
CSEG	04AE	PARA	NONE

Symbols:

Name	Type	Value	Attr
A10.	L NEAR	04A0	CSEG
L1	L NEAR	0059	CSEG
L100	L NEAR	0449	CSEG
L101	L NEAR	048F	CSEG
L102	L NEAR	047B	CSEG
L109	L NEAR	0342	CSEG
L110	L NEAR	0363	CSEG
L111	L NEAR	036D	CSEG
L112	L NEAR	0377	CSEG
L113	L NEAR	0381	CSEG
L114	L NEAR	0395	CSEG
L115	L NEAR	03A9	CSEG
L17.	L NEAR	01A9	CSEG
L18.	L NEAR	01B8	CSEG
L1A.	L NEAR	0089	CSEG
L1B.	L NEAR	00C1	CSEG
L1F.	L NEAR	00EC	CSEG
L2	L NEAR	0074	CSEG
L3	L NEAR	007C	CSEG
L5	L NEAR	0162	CSEG
L50.	L NEAR	024B	CSEG
L51.	L NEAR	020C	CSEG
L52.	L NEAR	0227	CSEG
L53.	L NEAR	026E	CSEG
L54.	L NEAR	0272	CSEG
L55.	L NEAR	0275	CSEG
L56.	L NEAR	02C8	CSEG
L57.	L NEAR	02D2	CSEG
L58.	L NEAR	02DC	CSEG
L59.	L NEAR	02E6	CSEG
L6	L NEAR	0174	CSEG
L60.	L NEAR	02EE	CSEG
L61.	L NEAR	02F6	CSEG
L62.	L NEAR	02FE	CSEG
L63.	L NEAR	0306	CSEG
L64.	L NEAR	031A	CSEG
L65.	L NEAR	0324	CSEG
L66.	L NEAR	0338	CSEG
LB1.	L NEAR	03D3	CSEG
LB5.	L NEAR	03F4	CSEG
LB6.	L NEAR	0406	CSEG
L90.	L NEAR	0411	CSEG

LF	L NEAR	03BA	CSEG	
LF1	L NEAR	02C4	CSEG	
SUBRCH	F PROC	0493	CSEG	Length =0018
SUBRT1	F PROC	00ED	CSEG	Length =0033
SUBRT2	F PROC	0120	CSEG	Length =0065
SUBRT3	F PROC	0185	CSEG	Length =0052
SUBRTA	N PROC	040D	CSEG	Length =0014
SUBRTAL	N PROC	03F0	CSEG	Length =001D
SUBRTD	F PROC	01D7	CSEG	Length =01E7
SUBRTI	F PROC	000E	CSEG	Length =0020
SUBRTP	N PROC	002E	CSEG	Length =00BF
SUBRTS	F PROC	03BE	CSEG	Length =0032
SUSLIN	F PROC	0421	CSEG	Length =0072
VAR	L WORD	0000	CSEG	
VAR1	L WORD	0002	CSEG	
VAR2	L WORD	0004	CSEG	
VAR3	L WORD	0006	CSEG	
VAR4	L WORD	0008	CSEG	
VAR5	L WORD	000A	CSEG	
VAR6	L WORD	000C	CSEG	

Warning Severe
 Errors Errors
 0 0

A P E N D I C E III

C>MASM
The IBM Personal Computer MACRO Assembler
Version 1.00 (C)Copyright IBM Corp 1981

Source filename [.ASM]: PRUEBAF
Object filename [PRUEBAF.OBJ]:
Source listing [NUL.LST]: PRUEBAF
Cross reference [NUL.CRF]:

Warning Severe
Errors Errors
0 0

C>LINK PRUEBAF,,,/H;

IBM Personal Computer Linker
Version 1.10 (C)Copyright IBM Corp 1982

Warning: No STACK segment
There was 1 error detected.

C>TYPE PRUEBAF.MAP
Loading High
Warning: No STACK segment

Start	Stop	Length	Name	Class
00000H	004ADH	04AEH	CSEG	

C>DEBUG BASICA.COM
-R
AX=0000 BX=0000 CX=6580 DX=0000 SP=FFFE BP=0000 SI=0000 DI=0000
DS=0C1D ES=0C1D SS=0C1D CS=0C1D IP=0100 NV UP DI PL NZ NA PO NC
0C1D:0100 E9725E JMP 5F75

-NPRUEBAF.EXE

-L

-R

AX=FF47 BX=0000 CX=0500 DX=0000 SP=0000 BP=0000 SI=0000 DI=0000

DS=0C1D ES=0C1D SS=3F54 CS=3F54 IP=0000 NV UP DI FL NZ NA PO NC

3F54:0000 0000 ADD [BX+SI],AL DS:0000=CD

-RSS

SS 3F54

:C1D

-RCS

CS 3F54

:C1D

-RIP

IP 0000

:100

-G

The IBM Personal Computer Basic
Version A2.00 Copyright IBM Corp. 1981, 1982, 1983
61301 Bytes free

Ok

DEF SEG=&H3F54

Ok

BSAVE"PRUEBAF",0,&H4AE

Ok

SYSTEM

Programa terminado normalmente

-Q

C>

A P E N D I C E IV

RELACION DE COMPONENTES.

La lista de componentes que a continuación se indica, está ordenada siguiendo la numeración de las figuras a las que corresponden.

Figura 6.

U1 : Transceptor de "bus"	74LS245
U2,U5 : Amplificador de "bus"	74LS244
U3 : Puerta AND (2 entradas)	1/4 74LS08
U4 : Inversor	1/6 74LS04
U6 : Puerta NOR (2 entradas)	1/4 74LS02
U7 : Puerta AND (4 entradas)	1/2 74LS21
U8 : Decodificador/demultiplexor	74LS154
4-16 líneas	
U9 : Interfase Periférica Programable	8255A
U10 : Convertidor Digital/Analógico	DAC0808
U11,U12 : A. Operacional	LF356
C1,C2,C3: Condensadores	0.047 μ F
C4,C6 : "	0.1 μ F
C5 : "	39 pF
C7 : "	33 pF
R1 : Resistencia	6.8 k Ω
R2 : "	2.2 k Ω

R3 :	Resistencia	9.59	k Ω
R4 :	"	6.39	k Ω
R5 :	"	4	k Ω
RV1:	Potenciómetro	10	k Ω
RV2:	"	25	k Ω

Figura 13.

S/H :	"Sample & Hold"	AD346	
CAD :	Convertidor Analógico/Digital	AD578	
IPP :	Interfase Periférica Programable	8255A	
M1, M2, M3, M4 :	Monostables	74121	
RV1, RV2 :	Potenciómetros	100	k Ω
RV3 :	Potenciómetro	5	k Ω
C1 :	Condensador	6.8	μ F

Figura 22.

CDA :	Convertidores Digitales/Analógicos	AD565AK	
IPP1, IPP2:	Interfases Periféricas Programables	8255A	
I1=I, :	Inversores	1/6 74LS04	
AO1, AO2, AO3:	A. Operacionales	LF356	
RV1, RV2, RV3, RV4, RV5, RV6 :	Potenciómetros	100	Ω
R1, R2, R3 :	Resistencias	2.4	k Ω
C1, C2, C3 :	Condensadores	10	pF
Decodificador/demultiplexor	4/16 líneas	SN74154	
"Latches" de 8 bits		SN74100	
"Latches" de 4 bits		74L75	

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Analog Devices (1984). Data Book. Integrated Circuits, Norwood, Analog Devices Inc.

Analog Devices (1980). Data Acquisition Components and Subsystems, Norwood, Analog Devices Inc.

Andreoli, T.E., Hoffman, J.F. y Fanestril, D.D. (1980). Membrane Physiology, Nueva York, Plenum Press.

Armstrong, C.M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.*, 61:644-683.

Armstrong, C.M. y Bezanilla, F. (1974). Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of Na channels. *J. Gen. Physiol.*, 63:533-552.

Barney, G.C.(1985). Intelligent instrumentation. Microprocessor applications in measurement and control, Exeter, Prentice/Hall Inc.

Bezanilla, F. y Armstrong, C.M. (1977). A low-cost signal averager and data-acquisition device. *Am. J. Physiol.* 232(3):C211-C215.

Bradley, D.J. (1984). Assembly language programming for the IBM Personal Computer, New Jersey, Prentice/Hall Inc.

Budak, A. (1974). Passive and active network analysis and synthesis. Boston, Houghton Mifflin.

- Cole, K.S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. Arch. Sci. Physiol., 3: 253-258.
- Cole, K.S. (1968). Membranes, Ions and Impulses: A Chapter of Classical Biophysics. University of California Press, Berkeley.
- Cherry, P.D. (1980). Word processing system design for high throughput, Computer Design, Agosto:95-118.
- Data Translation (1985). Microcomputer analog I/O systems, Massachusetts, Data Translation Inc.
- Datel Intersil (1981). Data acquisition and conversion handbook, Massachusetts, Datel Intersil Inc.
- Fleming, T. (1986). Analogic/digital and digital/analogic data converters, Electronic Design, Mayo: 102-116.
- Goldman, D.E. (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. J. Gen. Physiol., 27:37-60.
- Graeme, J.G., Tobey, G.E. y Huelsman, L.P. (1971). Operational amplifiers. Design and applications, Nueva York, McGraw-Hill.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann B. y Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch., 391:85-100.
- Hille, B. (1984). Ionic Channels of Excitable Membranes, Sunderland, Sinauer Associates Inc.
- Hodking, A.L. y Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol., 108:37-77.
- IBM (1983). Manual de Basic para IBM PC/XT, Barcelona, IBM.
- IBM (1983). Technical reference manual para IBM PC/XT, Barcelona, IBM.
- Jaeger, R.C. (1982). Analog to digital conversion. IEEE MICRO, Agosto: 46-56.
- Jaeger, R.C. (1982). Sample and holds, instrumentation amplifiers, and analog multiplexers, IEEE MICRO, Noviembre: 20-35.
- Jones, B.K. (1986). Electronics for experimentation and research, Exeter, Prentice/Hall Inc.
- Liu, Y. y Gibson, G.A. (1986). Microcomputer systems: the 8086/8088 family. Architecture, programming and design. New Jersey, Prentice/Hall.
- López-Barneo, J., Matteson, D.R. y Armstrong, C.M. (1981). Currents recorded through small areas of squid axon membrane with an internal virtual ground voltage clamp. Biophys. J., 36:811-816.

- Marmont, G. (1949). Studies on the axon membrane. I. A new method. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 34:351-382.
- Microsoft Corp. (1984). DOS: 2.10 Manual de referencia, Barcelona, IBM.
- Microsoft Corp. (1981). Macro-Assembler Manual, Barcelona, IBM.
- Miller, C. (1986). Ion channel reconstitution. Nueva York, Plenum Press.
- Mompin, J. (1980). Interconexión de periféricos a microprocesadores. Barcelona, Marcombo.
- Morgan, L. y Waite, M. (1984). Introducción al microprocesador 8086/8088. Mexico, Byte Books/McGraw-Hill
- NEC Microcomputers (1980). IC Master, California, NEC Microcomputers, Inc.
- Neher, E., Sakmann, B. y Steinbach, J.H. (1978). The extracellular patch-clamp: A method of resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch.*, 375:219-228.
- Nernst, W. (1888). Zur kinetik der Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z. Phys. Chem.*: 613- 637.
- Noda, M., Shimizu, S., Tamabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kaugawa, K., Matsuo, H., Raftery, M., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. y Numa, S. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312:121-127.
- Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M. y Numa, S. (1986). Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*, 322:826-828.
- Peatman, J.B. (1977). Microcomputer-Based Design. Nueva York, McGraw-Hill.
- Planck, M. (1890a). Veber die Erregung von Elektrizität und wärme in Elektrolyten. *Ann. Phys. Chem., Neue Folge*, 39:161-186.
- Planck, M. (1980b). Veber die Potential differenz zwischen zwie verdünnten Lösungen binärer Elektrolyte. *Ann. Phys. Chem., Neue Folge*, 40:561-576.
- Plouin, M. (1984). IBM-PC. Características, programación y manejo, Madrid, Paraninfo.
- Rector, Russell y Alexy, G. (1980). The 8086 book. Berkeley, George Osborne/McGraw-Hill.
- Sakmann, B. y Neher, E. (1983). Single channel recording . Nueva York, Plenum Press.

Sargent III, M. y Shoemaker, R. L. (1985). The IBM Personal Computer from the inside out. Arizona, Addison-Wesley Publishing.

Sigworth, F. (1983). Electronic design of the patch-clamp. Pág. 3-35 en "Single-Channel Recording", Sakmann, B. y Neher, E. (eds.), Nueva York, Plenum Press.

Stevens, C.F. (1986). Modifying channel function. Nature, 319:622.

Tabares, L. (1986). Electrofisiología de Células Adrenocorticales: Estudio Mediante el Registro Intracelular y la Técnica de "Patch-Clamp". Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.

Texas Instruments (1980). The TTL data book. Dallas, Texas Instruments.

Travis, B. (1984). Data converters. Electronic Design, Junio: 119-144.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. JUAN UREÑA LOPEZ
titulada SISTEMA PARA LA ADQUISICION, ALMACENAMIENTO
Y ANALISIS DE CORRIENTES IONICAS TRANSMEMBRANA
acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 4 de JULIO 19 87

El Vocál,

Bernat Sanz

El Presidente

Arce

El Vocál,

Benítez

El Secretario,

[Signature]

El Vocál,

Pérez

El Doctorado,

[Signature]