



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**ANÁLISIS DEL CÓDIGO FACIAL PARA EL ESTUDIO
DE LA PARÁLISIS FACIAL EXPERIMENTAL EN RATÓN**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Diego Israel Villeda Arias

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez
Facultad De Estudios Superiores Iztacala

Dr. José Gerardo Rojas Piloni
Instituto De Neurobiología, UNAM
Dr. Víctor Hugo De Lafuente
Instituto De Neurobiología, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Estado De México (FES Iztacala), Octubre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por permitirme formar parte del programa de becas para la realización de estudios de posgrados CVU/Becario No: 1147119.

Al Dr. Isaac Obed Pérez Martínez, por dirigir el presente trabajo, por su apoyo, comprensión y guía en mi formación académica y profesional, pero sobre todo por mostrarme constantemente lo que significa ser un buen líder.

Al Dr. Víctor Hugo de Lafuente Flores y al Dr. José Gerardo Rojas Piloni, miembros de mi comité tutorial, por su atención y contribuciones al desarrollo de este proyecto y de mi formación académica.

A Daniela Montes Angeles, David Andrade y Elías Perrusquia por su asesoramiento constante, su implacable trabajo en equipo y su amistad que me inspira a seguir conociendo las maravillas del mundo de la ciencia.

A los integrantes del Laboratorio de Neurobiología de las Sensaciones y Movimientos Orales, así como del Laboratorio de Inmunidad Oral y Regulación Ósea, por las contribuciones a este trabajo, además del apoyo a mi crecimiento académico y personal.

A mis padres por su amor, temple y perseverancia lo que me permitió plantearme metas inimaginables y llegar a donde siempre quise estar.

A mis tíos por su apoyo incondicional que blindaba mi espíritu cuando más lo necesitaba.

A mi hermano y mi prima por creer en mi cuando yo mismo dudaba.

A mi novia por tu amor inconmensurable y tu inagotable apoyo en cada paso.

A quienes ya no están con nosotros por su cariño omnipresente que me motiva a ser mejor cada día.

A Iker por ser mi compañero incansable en esas noches de desvelo.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología de las Sensaciones y Movimientos Orales de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el financiamiento del programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto: **IN204023 *Contribución de la corteza premotora en las expresiones faciales y sus alteraciones por la parálisis facial.***

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	5
Summary	6
Introducción	7
Marco teórico	7
a) <i>Anatomía y fisiología del nervio facial</i>	7
b) <i>Movimientos faciales</i>	8
c) <i>Lesiones nerviosas periféricas</i>	9
d) <i>Regeneración axonal</i>	10
Antecedentes	11
Pregunta de investigación	13
Hipótesis	14
Justificación	15
Objetivos	16
a) <i>General</i>	16
b) <i>Específicos</i>	16
Material y Métodos	17
a) <i>Animales</i>	17
b) <i>Cirugías</i>	17
i.- <i>Cirugía de implantación del dispositivo para el sistema de cabeza fija</i>	17
ii.- <i>Cirugías de lesión del nervio facial</i>	17
c) <i>Sistema de cabeza fija - semirrestringido</i>	19
d) <i>Condicionamiento</i>	20
e) <i>Registro del movimiento de los bigotes</i>	20
f) <i>Registro de las expresiones faciales</i>	21
Análisis de datos	22
a) <i>Análisis del movimiento de los bigotes</i>	22
i.- <i>Amplitud del movimiento de los bigotes</i>	23
ii.- <i>Promedio de la línea base de la amplitud del movimiento de los bigotes</i>	23
iii.- <i>Espectro de potencia</i>	23
b) <i>Análisis de las expresiones faciales</i>	24
i.- <i>Histogramas Orientados a Gradientes (HOGS)</i>	24
ii.- <i>Prototipo funcional</i>	24
iii.- <i>Puntuación del movimiento</i>	25
Resultados	27
a) <i>Dinámica del movimiento de los bigotes como signo cardinal de la progresión de la parálisis facial.</i>	27
i.- <i>Amplitud del Movimiento de los bigotes</i>	27
ii.- <i>Comparación de la amplitud del movimiento con la línea base</i>	30
iii.- <i>Representación de la angulación y frecuencia del movimiento de los bigotes</i>	33
iv.- <i>Análisis de componentes principales del espectro de potencia</i>	35
b) <i>Registro del código facial en los distintos modelos de parálisis facial para su comparación a través del tiempo.</i>	36
i.- <i>Correlación con el prototipo funcional</i>	36
ii.- <i>Puntuación del movimiento</i>	38
Discusión:	41
a) <i>Dinámica del movimiento de los bigotes como signo cardinal de la progresión de la parálisis facial.</i>	41
b) <i>Registro del código facial en los distintos modelos de parálisis facial para su comparación a través del tiempo.</i>	43
Conclusiones	44
Glosario de términos	45
Literatura citada:	46

Resumen

El estudio de la parálisis facial cuenta de varias problemáticas como el elevado costo de los equipos especializados para su evaluación y la segmentación de las mediciones a realizar para determinar la integridad del nervio facial.

La tesis plantea nuevas herramientas para el estudio de la parálisis facial experimental en ratones utilizando la videograbación con pintura acrílica blanca para el registro del seguimiento de los bigotes y la visión artificial para el análisis del código facial permitiéndonos conocer por primera vez la historia natural de la parálisis facial en ratones a través del tiempo.

Se evaluaron 9 ratones de la cepa C57BL/6 que fueron divididos en tres grupos (transección, compresión y cirugía simulada), se grabaron los movimientos de los bigotes y las expresiones faciales mientras se encontraban sujetos en un sistema de cabeza fija semirestringido.

Por medio de las grabaciones se consiguieron las amplitudes del movimiento de los bigotes lo que nos permitió comparar las evaluaciones entre grupo encontrando diferencias significativas a los 30 minutos en los ratones con compresión (Mdn=901.4, $p<0.05$) y transección (Mdn=730.9, $p<0.05$) al compararse con el grupo de cirugía simulada. Al día 9 los ratones con compresión presentaban una amplitud similar al grupo de cirugía simulada mientras que los ratones con transección jamás dejaron de presentar diferencias significativas (Mdn=638.6, $p<0.05$).

Los HOGS nos permitieron analizar el código facial de los ratones gracias a la puntuación del movimiento, esta puntuación fue evaluada a través del tiempo presentando diferencias significativas a partir de los 30 minutos en los ratones con compresión ($p<0.05$) y transección ($p<0.05$). al compararse con su basal, teniendo una recuperación al día 10 en los ratones con compresión ($p>0.05$) y no mostrando una recuperación los ratones con transección ($p<0.05$).

Los resultados de las evaluaciones de las expresiones faciales mediante la puntuación del movimiento tienen un comportamiento similar a las evaluaciones del movimiento de los bigotes.

La visión artificial demostró poder caracterizar los cambios en el código facial de los ratones analizando los signos cardinales de la parálisis facial (movimiento de la oreja, cierre del ojo, movimiento de los bigotes) a través del tiempo.

Summary

The study of facial paralysis has several problems, such as the high cost of specialized equipment for its evaluation and the segmentation of the measurements to be carried out to determine the integrity of the facial nerve.

The thesis proposes new tools for the study of experimental facial paralysis in mice using video recording with white acrylic paint to record the tracking of whiskers and artificial vision for the analysis of the facial code, allowing us to know for the first time the natural history of facial paralysis in mice over time.

Nine mice from the C57BL/6 strain were evaluated and divided into three groups (transection, compression and sham surgery). Whisker movements and facial expressions were recorded while restrained in a semi-restrained fixed head system.

Through the recordings, the amplitudes of the whisker's movements were obtained. This allowed us to compare the evaluations between groups, finding significant differences at the lapse of 30 minutes in the compression group (Mdn=901.4, $p<0.05$) and the transection group (Mdn=730.9, $p<0.05$) When compared to the sham group.

At day 9, the compression group had an amplitude similar to the sham group, while the transected group never ceased to show significant differences (Mdn=638.6, $p<0.05$).

The HOGS allowed us to analyze the mice's facial code thanks to the movement score. This score was evaluated over time, presenting significant differences after 30 minutes in the compression group ($p<0.05$) and transection group ($p<0.05$) When compared with its baseline. While the compression group showed recovery on day 10 ($p<0.05$), the transection group didn't ($p<0.05$).

The evaluation results from the facial expressions using the movement score behave similarly to the whisker's movements evaluation.

Artificial vision characterized changes in the mice's facial code by analyzing the facial paralysis's cardinal signs (ear movement, eye closure, whisker movement) over time.

Introducción

El estudio de la parálisis facial en los distintos modelos de estudio presenta un reto en su evaluación debido a la extensión de las evaluaciones, los signos a evaluar y los instrumentos a utilizar. Las investigaciones se han enfocado en utilizar días específicos de evaluación y en signos clínicos independientes; lo anterior debido a la dificultad del seguimiento de datos y al alto costo de los instrumentos utilizados para evaluar cada signo. La aplicación de sistemas de análisis de inteligencia artificial puede ayudar a superar estas limitantes técnicas.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el código facial usando visión artificial. Para lograrlo, usamos dos modelos de lesión del nervio facial, uno reversible y otro irreversible en ratones C57BL/6. En un sistema de registro videográfico semi restringido detectamos las expresiones faciales diariamente durante 20 días posteriores a la lesión del nervio facial e integramos de forma simultánea el movimiento de los bigotes. Lo anterior arrojó datos contundentes de la progresión de la lesión del nervio facial a través del tiempo por medio de la aplicación de algoritmos de inteligencia artificial como una nueva herramienta para estudiar este modelo de lesión nerviosa.

Marco teórico

a) Anatomía y fisiología del nervio facial

El nervio facial, también conocido como el séptimo par craneal o nervio VII, es un nervio mixto lo que significa que cuenta con fibras motoras y sensitivas (Gould, 2014).

El nervio facial se origina en el tronco cerebral, específicamente en el área del núcleo motor del nervio facial en el puente del tallo cerebral. Desde su origen en el tronco cerebral, el nervio facial atraviesa el hueso temporal, pasando a través del conducto auditivo interno (CAI). Dentro del CAI, las fibras del nervio facial se organizan en diferentes fascículos.

Una vez que el nervio facial sale del CAI, entra en la cavidad craneal media y luego se dirige hacia el conducto facial o canal de Falopio. A medida que el nervio avanza por el conducto facial, eventualmente sale del cráneo a través del agujero estilomastoideo y se extiende hacia la región del cuello (Kochhar, 2016).

Saliendo del hueso temporal, el nervio facial divide su tronco principal en dos, el tronco superior que conforma las ramas temporal, cigomática y bucal y el tronco inferior que termina en las ramas marginal mandibular y cervical (Kochhar, 2016).

La inervación del nervio facial ha demostrado ser similar en humanos, roedores y lagomorfos por lo que las ratas, ratones y conejos son los principales modelos de estudio de la función y regeneración del nervio facial (Heaton, 2008).

El nervio facial inerva a los músculos faciales encargados de las expresiones faciales, igualmente es responsable de la inervación parasimpática de las glándulas de la cavidad oral y las glándulas lagrimales y de la inervación sensorial de los dos tercios anteriores de la lengua.

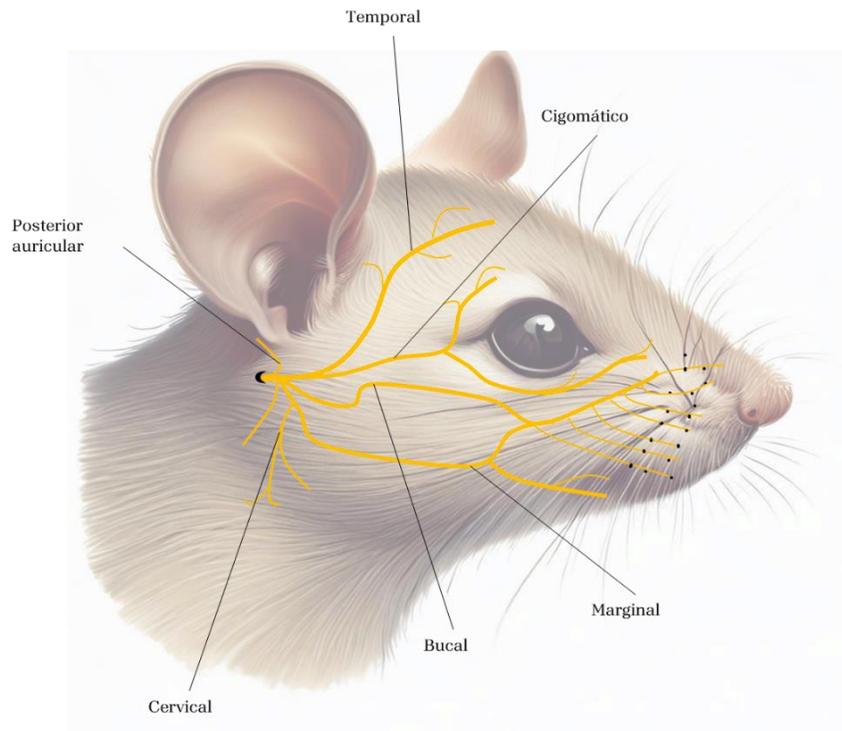


Figura 1.- Esquema anatómico del nervio facial en ratón.

En los ratones las expresiones faciales se realizan por medio de varios músculos que cumplen las siguientes funciones (Domínguez-Oliva, 2022):

- Posición de la oreja: Interescutular, Auricular anterior y posterior
- Cierre del ojo: Elevador del párpado superior, frontal y orbicular del ojo
- Movimiento nasal: Orbicular de la boca, depresor del tabique nasal, elevador del labio superior.
- Posición de los bigotes: Elevador naso labial, músculos intrínsecos y extrínsecos de los bigotes.

b) Movimientos faciales

La generación de expresiones faciales en ratones comienza por una neurona motora superior (NMS) o de primer orden, localizada en el área motora primaria que se encuentra en el giro precentral de la corteza motora. Sus axones viajan del área premotora y motora de manera ipsilateral hasta el tracto bulboespinal, en donde la mayoría cruza al lado contralateral antes de hacer sinapsis con la neurona motora inferior en donde se considera el núcleo motor principal del par craneal VII (Seneviratne, 2023).

Este núcleo se dividirá en 4 sub-núcleos; dorsal, intermedio, lateral y medial; que se encargan de inervar la musculatura de la cara (Seneviratne, 2023).

c) Lesiones nerviosas periféricas

La lesión de un nervio periférico (LNP) es la pérdida parcial o completa de la continuidad de su estructura o de sus funciones motoras, sensoriales, autonómicas y dolor neuropático (Vijayavenkataraman, 2020).

Ésto es debido a accidentes, traumatismos, quemaduras, fracturas, isquemia, tracción y compresión (Modrak, 2019).

Dentro de las clasificaciones de LNP más utilizadas, que son de Seddon y Sunderland, se identifican las siguientes:

- Neuropraxia: el nervio está intacto, pero se afectan los impulsos.
- Axonotmesis: el axón se ve dañado y Sunderland lo subclasifica en 3 grados según su extensión a las capas de tejido conectivo circundante siendo la endoneuro, el perineuro y finalmente el epineuro.
- Neurotmesis: cuando existe tanto una pérdida del tronco como el tejido conectivo del nervio (Vijayavenkataraman, 2020).

La axotomía que consiste en la transección o ruptura del axón en el nervio facial es un procedimiento mínimo invasivo y bien tolerado, lo que nos permite investigar motoneuronas, respuestas del microambiente glial central y periférico, el sistema inmunitario y la musculatura diana. El modelo de lesión de nervio facial es una herramienta para estudiar la lesión y la regeneración nerviosa (Olmstead, 2015).

En los modelos de roedores los mecanismos de lesión quirúrgica más utilizados para la lesión del nervio facial son la transección, compresión, aplastamiento, resección y avulsión cada uno es utilizado dependiendo del sitio e intereses que se deseen estudiar (Chacón, 2019).

En nuestro trabajo utilizamos los mecanismos de lesión por transección y compresión que nos permiten observar la pérdida completa de la función a través del tiempo. La transección se considera una lesión de neurotmesis por la pérdida de continuidad del tronco y los tejidos conectivos. Por otro lado, la compresión del nervio nos permite observar la regeneración nerviosa debido a que presenta una recuperación de la función del movimiento de los bigotes clasificándose en una lesión de axonotmesis por el daño en el axón producido por la compresión.

d) Regeneración axonal

La regeneración nerviosa comienza con el proceso inicial llamado degeneración Walleriana, en donde los extremos del axón y la vaina de mielina de la sección del nervio liberan desechos de mielina. Estos desechos impiden la regeneración axonal, por lo que las células de Schwann y macrófagos se activan y para fagocitarlos (Sulaiman, 2013; Lee, 2023). Posteriormente, las células de Schwann producen factores de crecimiento y matriz extracelular que promueven la regeneración nerviosa.

Además de los factores de crecimiento y matriz extracelular que producen las células de Schwann se han estudiado otros compuestos importantes en la regeneración nerviosa entre ellas Hizay demostró que el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) estimula la regeneración de axones *in vivo* y mantiene el calibre de los axones posterior a una lesión del nervio facial (Hizay, 2016).

Guntinas-Lichius menciona que el trasplante de mucosa olfativa promueve la recuperación del nervio facial en ratas (Guntinas-Lichius, 2002).

La regeneración nerviosa ha demostrado producirse incluso en el mecanismo más grave de lesión (neurotmesis) avanzando 1-3mm/día.

Antecedentes

La parálisis facial (PF) tiene una incidencia de 20-30 casos por cada 100,000 habitantes (Fujiwara, 2017). La PF representa una debilidad en los músculos faciales por un daño temporal o permanente en el nervio facial (Facial Palsy UK, 2021), que genera la incapacidad de mover los músculos inervados por este nervio.

El estudio de las bases fisiológicas de la actividad de nervios periféricos, del daño neuronal, y del uso de tratamientos para inducir la regeneración axonal ha sido el enfoque de muchos trabajos de investigación (Chacon, 2019). Para entender estos procesos se han utilizado diferentes modelos animales de compresión, constricción y transección nerviosa en nervios orofaciales (Wood, 2011).

Sin embargo, aún existen limitantes en la evaluación de estos procesos en los nervios craneales en comparación con nervios periféricos. Se ha propuesto que la progresión de la lesión, la inducción de su recuperación, y la evaluación de signos clínicos es mucho más compleja en pares craneales que en los nervios periféricos (Aguayo, 1991).

En este sentido, el estudio de la progresión de la lesión del nervio facial ha sido muy limitada. Diferentes experimentos toman como referencia la lesión del nervio ciático para entender la progresión de una lesión neuronal periférica y sus efectos motores o sensitivos. No obstante, se plantea que una lesión del par craneal podría ser diferente a una lesión en otros nervios periféricos (Socolovsky, 2011; Echternacht, 2021).

Dichas dificultades metodológicas demandan mediciones especializadas de la parálisis facial para poder analizar de manera confiable las repercusiones de la lesión y su recuperación, en el modelo de los roedores Chacon menciona que los signos más utilizados para el estudio de la función y la regeneración en el nervio facial son el movimiento de los bigotes y el cierre del ojo, además de reportar que recientemente se ha utilizado el movimiento de la oreja (Leckenby, 2019). Estas funciones son relevantes en el estudio de la parálisis facial porque los músculos encargados de su correcto funcionamiento son inervados por el nervio facial.

Los modelos para el estudio de la PF han aportado ventajas y desventajas; y cada uno se enfoca en diferentes signos clínicos (Chacon, 2019). Dentro de los signos cardinales comunes tenemos los movimientos de los bigotes, el cierre del ojo y el movimiento de la oreja. Estos se utilizan para establecer la relación entre la progresión de la PF y las sincinesias que consisten en la contracción muscular involuntaria en consecuencia a otra contracción voluntaria debido a una regeneración aberrante (Chacon 2019; Salles 2015).

Una de las ventajas más recientes de evaluar el movimiento de los bigotes es la capacidad de analizar estos movimientos de forma automática cuando se aplican algoritmos para el análisis de los fotogramas de los videos, lo anterior ha sido una importante aportación ya que reduce el tiempo de trabajo de los evaluadores y aumenta el volumen de datos por cada evaluación (n) en donde los fotogramas sustituyen al número de ratones (Dorschner, 2016).

Por otro lado, entre las limitantes de las evaluaciones convencionales podemos destacar: la difícil evaluación derivada del libre movimiento de los animales, el análisis manual complejo para la medición del movimiento de los animales (Banker, 2010; Langford et al., 2010; Mogil, 2009), la evaluación aislada y no integrada de estos signos cardinales, es decir, no simultánea; y el alto costo de los instrumentos de evaluación. Lo anterior, es la base para considerar que un modelo ideal de evaluación de la PF debería considerar animales en un sistema semi restringido, en el que sea posible evaluar el movimiento facial, sin impedir el movimiento del roedor para evitar estrés o ansiedad.

Dolensek propuso como herramienta la manipulación de fotogramas para la obtención de prototipos de emociones a partir de las expresiones faciales. Una herramienta que se enfoca en el movimiento de varias regiones de la cara simultáneamente lo que abre la posibilidad de evaluar integralmente las distintas afecciones que pueden llegar a presentarse en los roedores por la lesión del nervio facial. (Dolensek, 2020).

La codificación facial es clave para el análisis de las expresiones faciales, consiste en la combinación de algoritmos de reconocimiento de imágenes para detectar las características faciales principales en las personas o animales y que utiliza como herramienta los descriptores de imagen HOGS (Histogramas Orientados a Gradientes) (Elbel, 2016).

En este proyecto proponemos utilizar videografía para la obtención de fotogramas que registren la condición facial en tiempos cortos, con el propósito de evaluar la progresión de la PF en ratones. Por medio de la aplicación de la visión artificial, obtener el código facial, es decir, la evaluación de los signos cardinales de la PF de forma simultánea para caracterizar la progresión de la lesión en dos modelos de lesión nerviosa, uno irreversible y otro reversible.

Pregunta de investigación

¿La visión artificial puede detectar la dinámica del movimiento de los bigotes y el código facial en los ratones con cirugía simulada, transección y compresión a través del tiempo? ¿Cuáles serán las diferencias en la dinámica del movimiento de los bigotes y los códigos faciales en ratones con cirugía simulada, transección y compresión?

Hipótesis

La visión artificial será capaz de detectar la dinámica del movimiento del bigote en los ratones con cirugía simulada, transección y compresión.

La visión artificial nos permitirá identificar los distintos códigos faciales en los ratones con cirugía simulada, transección y compresión a través del tiempo.

Justificación

La evaluación de la parálisis facial por medio de los histogramas orientados a gradientes nos permitirá medir de manera integral la pérdida de la función y recuperación del nervio, haciendo accesible, sencillo y económico su seguimiento.

También nos permitirá tener en perspectiva experimentos en los que se aplique alguna alternativa terapéutica, así como el estudio de cambios en los subcircuitos de la corteza motora y premotora inducidos por la lesión del nervio facial en ratones.

Objetivos

a) General

Caracterizar el código facial en ratones con lesión del nervio facial por compresión y transección usando visión artificial.

b) Específicos

En ratones con transección y compresión del nervio facial:

1. Evaluar los signos cardinales de la parálisis facial a través del tiempo.
2. Determinar el prototipo funcional para la evaluación de la parálisis facial experimental.
3. Describir la progresión de los cambios en el código facial posteriores a la lesión nerviosa.
4. Determinar los momentos más relevantes de la historia natural de la parálisis facial.

Material y Métodos

a) Animales

Se utilizaron 9 ratones de la cepa C57BL/6 machos de 2-6 meses de edad. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del comité de ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (Oficio: CE/FESI/092020/1370). Todos los sujetos de estudio fueron alojados en cajas de policarbonato. El cuarto de alojamiento contó con temperatura de 25° C, bajo un ciclo de luz- oscuridad de 12-12 horas (que inicia a las 8:00 am). Los sujetos fueron provistos de comida y agua *ad libitum*.

b) Cirugías

i.-Cirugía de implantación del dispositivo para el sistema de cabeza fija

Bajo anestesia general con Isoflurano (con una dosis de inducción del 3-5%/1-3 litros/min de isoflurano/oxígeno, y de 1-3%/0.5-1 litros/min de isoflurano/oxígeno como dosis de mantenimiento) se realizó una incisión en la extensión de la cabeza de los ratones, se removieron los tejidos hasta observar el cráneo. Se colocó un dispositivo (fabricado de ácido poliláctico) para el sistema de cabeza fija, en la parte posterior del cráneo, el cual se fijó con cianocrilato. Se dieron 7 días de recuperación para los sujetos de estudio.

ii.- Cirugías de lesión del nervio facial

Los ratones fueron asignados al azar en 3 grupos:

1) Grupo de Compresión: Tres ratones fueron lesionados por compresión del nervio facial a los que se les realizó una incisión en la parte posterior de la oreja del lado de derecho de los ratones disecando los tejidos, hasta observar el tronco del nervio facial. Se realizaron dos compresiones con pinzas de disección, cada compresión con una duración de 30 segundos, con 10 segundos de reposo entre cada una (Figura 2). Se reposicionaron los tejidos y se suturó la región.

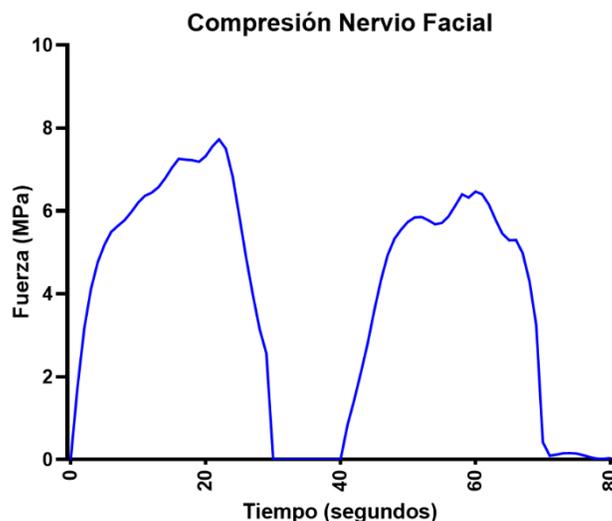


Figura 2.- Registro de la presión utilizada para la compresión del nervio facial.

2) Grupo de Transección: Tres ratones fueron lesionados por transección del nervio facial a los que se les realizó una incisión en la parte posterior de la oreja del lado derecho de los ratones disecando los tejidos, hasta observar el tronco del nervio facial (Figura 3), se pinzó hasta obtener un corte completo del nervio junto con un corte de los extremos del nervio (Hadlock, 2010).

3) Grupo de Cirugía simulada: Tres ratones fueron operados por cirugía simulada a los que se les realizó una incisión en la parte posterior de la oreja del lado derecho de los ratones disecando los tejidos, hasta observar el tronco del nervio facial sin tocarlo, posteriormente se suturó la región.



Figura 3.- Visualización del nervio facial para la producción de la lesión nerviosa.

c) Sistema de cabeza fija - semirrestringido

El sistema está conformado por una esfera de poliestireno sujeta a dos pilares y forrada en el centro por una superficie rugosa, una barra metálica que se encuentra arriba de la pelota para la sujeción de los ratones y dos extensiones metálicas para la colocación de videocámaras (Xiaomi Redmi Note 8) que nos permiten realizar una grabación simultánea, la primera está situada en el costado derecho del ratón con una rotación de 45° a 5 cm de distancia para el registro de las expresiones facial y la segunda está situada en la parte superior a 20 cm de distancia para el registro del movimiento de los bigotes (Figura 4).

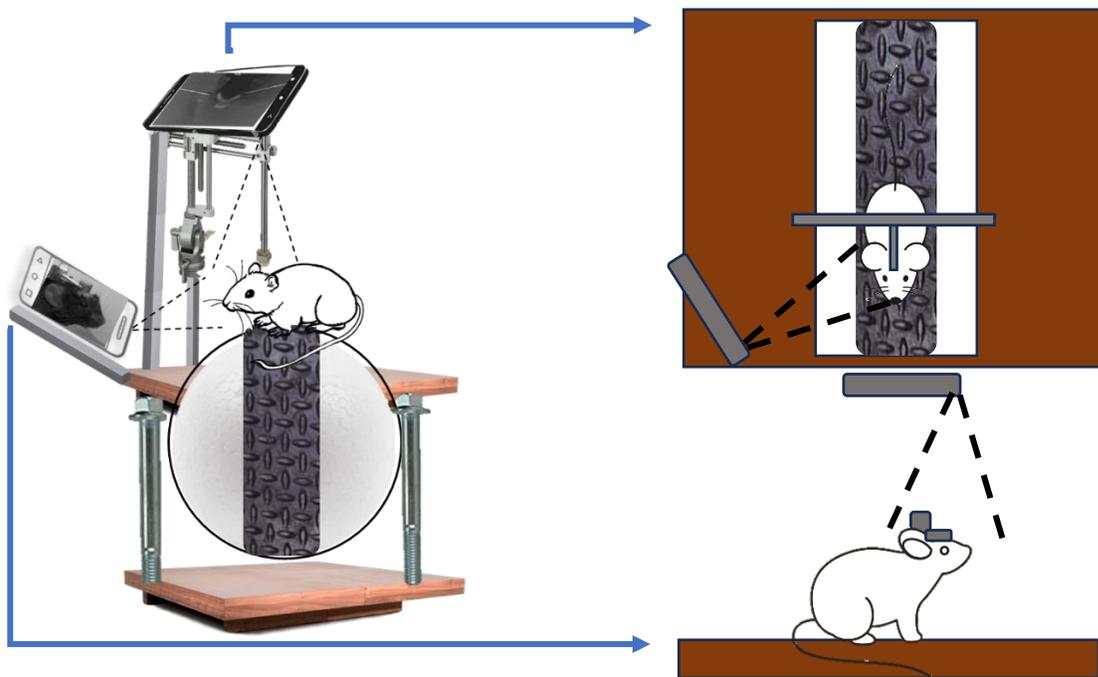


Figura 4.- Esquema del sistema de cabeza fija-semirrestringido

d) Condicionamiento

Los ratones iniciaron el proceso de condicionamiento 10 días antes de ser lesionados del nervio facial y consistió en la permanencia progresiva sobre el sistema anteriormente descrito.

El tiempo de permanencia en el sistema aumentó de la siguiente manera:

- Día 1: 5 minutos
- Día 3: 15 minutos
- Día 5: 30 minutos
- Día 10: 30 – 45 minutos

Cuando los ratones fueron capaces de mantener la posición y el equilibrio en el sistema de cabeza fija-semirrestringido durante 30 minutos, iniciaron las evaluaciones para el registro del movimiento de los bigotes y las expresiones faciales.

e) Registro del movimiento de los bigotes

Los 9 ratones fueron evaluados un día antes (línea base) de la cirugía de la lesión del nervio facial, seguidos de una evaluación a los 30 minutos y a las 6 horas después de la cirugía. Posteriormente se realizó una evaluación al día siguiente, junto con una evaluación diaria hasta el día 20 posterior a la cirugía (Figura 5).



Figura 5.- Diseño experimental del registro del movimiento de los bigotes

Antes de cada evaluación para el registro del movimiento de los bigotes, el ratón es anestesiado con isoflurano (con una dosis de inducción del 3-5%/1-3 litros/min de isoflurano/oxígeno, y de 1-3%/0.5-1 litros/min de isoflurano/oxígeno como dosis de mantenimiento) para poder pintar uno de sus bigotes con pintura acrílica color blanco (Politec) y se colocó un fondo negro en la superficie inferior del sistema de cabeza fija para detectar fácilmente el bigote.

El registro del movimiento de los bigotes se realizó por medio de la videocámara situada en la parte superior del sistema (Figura 6), cada evaluación consistía en la videograbación del ratón montado en el sistema de cabeza fija semirrestringido con el bigote pintado durante 2 minutos sin ningún tipo de estimulación, dichas videograbaciones contaban con una tasa de imagen de 100 fotogramas/segundo, obteniendo así 12,000 fotogramas por cada evaluación.



Figura 6.- Vista del ratón con la cámara superior.

f) Registro de las expresiones faciales

Los 9 ratones fueron evaluados simultáneamente de las expresiones faciales como del movimiento de los bigotes por lo cual ambas evaluaciones siguieron la misma cronología de registro (Figura 7).

Evaluación 2



Durante 2 minutos se realiza el seguimiento de las expresiones faciales por medio de videograbación



Figura 7.- Diseño experimental de la evaluación de las expresiones faciales.

El registro de las expresiones faciales se realizó por medio de la videocámara situada en la parte lateral del sistema (Figura 8), cada evaluación consistía en la videograbación del ratón montado en el sistema de cabeza fija semirrestringido durante 2 minutos sin ningún tipo de estimulación, dichas videograbaciones contaban con una tasa de imagen de 30 fotogramas/segundo aproximadamente, obteniendo así 3,600 fotogramas por cada evaluación.

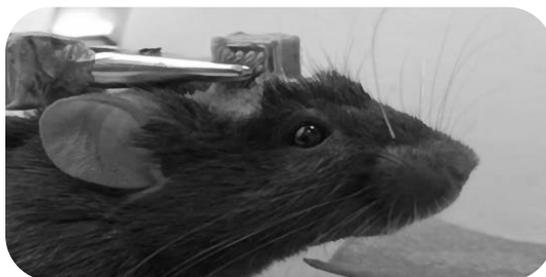


Figura 8.- Vista del ratón con la cámara lateral.

Análisis de datos

a) Análisis del movimiento de los bigotes

Para el análisis del movimiento de los bigotes fue necesario extraer los fotogramas de las videograbaciones, a estos fotogramas se les realizó un recorte para ubicar el lado del bigote operado, se aplicó un filtro de escala de grises para realizar la binarización de la imagen y así identificar fácilmente el bigote, por último, utilizamos la función “region props” para registrar la posición del bigote con respecto a la línea vertical de cada fotograma (Figura 9).

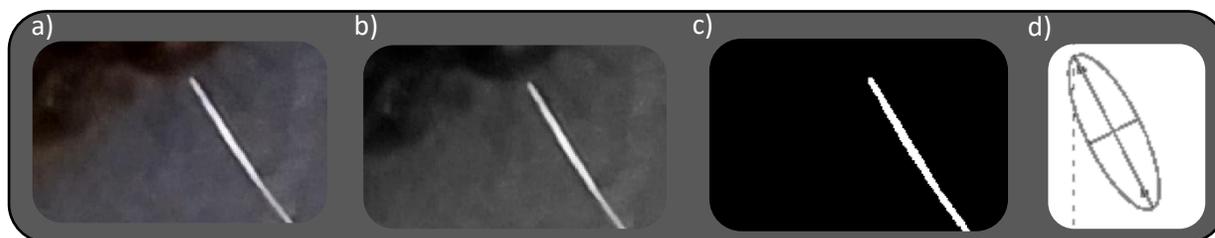


Figura 9.- Procesamiento del fotograma:

a) Recorte de la imagen b) Filtro escalada de grises c) Binarización d) Función “Region props”

i.- Amplitud del movimiento de los bigotes

La amplitud del movimiento de los bigotes es la distancia entre el punto de mayor proyección y retracción del movimiento del bigote del ratón.

El análisis de la amplitud del movimiento de los bigotes se realizó tomando la angulación del bigote mediante el sistema de cómputo numérico MatLab durante 100 fotogramas que equivalen a 1 segundo en el que el ratón se encontraba moviendo los bigotes.

La amplitud del movimiento del bigote se analizó por medio de una comparación a través de los días con la prueba de Kruskal-Wallis y se utilizó la prueba post hoc comparación múltiple de Dunn, para conocer las diferencias entre los grupos diariamente.

ii.- Promedio de la línea base de la amplitud del movimiento de los bigotes

Se extrajo la amplitud del movimiento de los 9 ratones en su línea base y fueron promediadas.

El promedio de la línea base se comparó con las amplitudes obtenidas a través del tiempo en cada grupo (transección, compresión, simulada) y se analizó por medio de la prueba post hoc comparación múltiple de Dunn.

ii.- Espectro de potencia

Para caracterizar el espectro de potencia determinamos el poder espectral de la señal que se define como una función matemática que da a conocer la distribución de la potencia de dicha señal sobre las distintas frecuencias en donde está formada (Bland, 1996).

El espectro de potencia se define como la transformada de Fourier de la función de autocorrelación y permite determinar la distribución de la potencia de una señal a lo largo de un intervalo de frecuencias (Echeverry-Correa, 2007).

Para el análisis del espectro de potencia en el estudio utilizamos la señal del bigote en movimiento durante 100 fotogramas, posteriormente se le aplicó la transformada rápida de Fourier para así obtener su espectro de potencia.

Obtuvimos los espectros de potencia de los ratones, lo cuales dividimos por grupo y por evaluación, los espectros de potencia por grupo (simulada, transección, compresión) fueron promediados, consiguiendo una representación del espectro de potencia por grupo en cada evaluación. Estos promedios fueron analizados por medio del programa MatLab con el análisis de componentes principales (PCA).

El PCA convierte un conjunto de variables correlacionadas en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas (Almenara, 1998). El objetivo de este análisis es reducir la dimensionalidad en la cual se expresa el conjunto original de variables (Peña, 2002; Restrepo, 2012).

b) Análisis de las expresiones faciales

i.-Histogramas Orientados a Gradientes (HOGS)

Los Histogramas Orientados a Gradientes se definen como descriptores de imagen invariantes a la rotación 2D (Déniz, 2011).

En 2020 Dolensek propuso el uso de la visión artificial para la adquisición, procesamiento y análisis de las expresiones faciales de los ratones con el fin de obtener sus HOGS y analizar el código facial de los ratones lo que permite conocer su estado intrínseco (disgusto, placer, dolor, malestar, escape, miedo activo, miedo pasivo), la visión artificial es una herramienta de suma importancia para conocer el código facial de los ratones con lesión del nervio facial.

Para poder analizar el código facial en los ratones con parálisis facial es necesario obtener los HOGS del ratón, para esto realizamos el recorte de la imagen obtenida de la videocámara que se sitúa lateralmente al ratón, enfocándonos en los signos cardinales que deseamos analizar (movimiento de la oreja, cierre del ojo, movimiento de los bigotes) (Figura 10) y aplicamos un filtro en escala de grises.

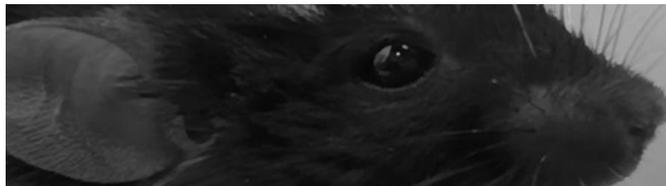


Figura 10.- Expresión facial del ratón para obtener sus HOGS

Con la imagen recortada procedemos a extraer sus HOGS utilizando el programa MatLab y estableciendo sus características (Tamaño de celda: 32x32 Tamaño de bloque: 1x1 Número de contenedores: 8).

ii.-Prototipo funcional

Para el análisis del código facial de igual manera es necesaria la creación de un prototipo funcional para la parálisis facial para esto realizamos un promedio de 250 histogramas (HOGS) de acuerdo con la metodología descrita por Dolensek.

El prototipo funcional es obtenido de cada ratón mientras se mueve en la evaluación de la línea base, como todo prototipo reúne las características principales de los HOGS, permitiendo hacer una correlación del ratón durante su evaluación.

La correlación con el prototipo funcional nos muestra momentos en que el ratón está en movimiento y en los que no, pensando en el estudio de la parálisis facial decidimos enfocarnos en los momentos en que el ratón presentaba mayor movimiento.

Para obtener dichos momentos se promedió la amplitud de la correlación con el prototipo funcional de los momentos en el que el ratón no se movía y lo utilizamos como umbral para identificar los momentos en que el ratón estaba presentando cambios en la correlación con el prototipo debido al movimiento.

De la señal de correlación con el prototipo funcional en los momentos en que había mayor movimiento se analizó:

- Suma de los valores de pico a pico: la magnitud entre un pico y el valle en la señal de correlación con el prototipo representa el cambio entre un fotograma y el siguiente, la suma de todos los valores de pico a pico demuestra el cambio en la expresión facial, un mayor número de picos en la sesión representa una mayor rapidez para producir estos cambios.
- Desviación estándar: La dispersión de los valores en la señal de correlación con el prototipo nos refiere un mayor cambio en la expresión facial.

iii.- Puntuación del movimiento

El código facial es la información obtenida por medio de HOGS que describen las características faciales principales de los ratones (Elbel, 2016).

Para el análisis del código facial a través del tiempo utilizamos la suma de los valores de pico a pico y la desviación estándar obtenida de la correlación con el prototipo funcional para elaborar una puntuación que nombramos “puntuación del movimiento” con la que podemos conocer cuantitativamente los cambios en la expresión facial de los ratones.

Para la elaboración de la puntuación del movimiento utilizamos el número índice que es una medida estadística que nos permite estudiar las variaciones de una magnitud en relación con el tiempo (López, 1996).

Se obtuvo el número índice de la suma de los valores de pico a pico y de la desviación estándar, tomando como valor de inicio, el valor de la evaluación basal. Por último, para obtener la puntuación del movimiento realizamos un promedio aritmético de ambos números índice (Figura 11).

Para el análisis del código facial a través del tiempo utilizamos la prueba post hoc de la comparación múltiple de Tukey para evaluar a cada grupo.

La evaluación de la puntuación del movimiento se realizó en 2 ratones por cada grupo debido a que uno de los ratones del grupo con transección se movió bruscamente dentro del sistema durante una evaluación logrando crear pequeños movimientos con la barra de sujeción lo que alteraba los datos por un movimiento no propio de la expresión facial.

$$\text{Número Índice Valor de pico a pico} = \frac{\sum \text{Pico a pico (t)}}{\sum \text{Pico a pico(basal)}} \times 100$$

$$\text{Número Índice Desviación estándar} = \frac{\text{Desviación estándar (t)}}{\text{Desviación estándar (basal)}} \times 100$$

$$\text{Puntuación del movimiento} = \frac{\text{Número Índice Posición} + \text{Número Índice DE}}{2}$$

Figura 11.- Representación matemática de la obtención del número índice y la puntuación del movimiento.

Resultados

a) Dinámica del movimiento de los bigotes como signo cardinal de la progresión de la parálisis facial.

i.- Amplitud del Movimiento de los bigotes

El registro de la posición del bigote a través de toda la sesión nos permitió reconocer momentos en donde el ratón no se mueve y en donde está en movimiento, con el objetivo de evaluar la función del movimiento del bigote a través de los días se seleccionó aleatoriamente 1 segundo del ratón en movimiento (Figura 12).

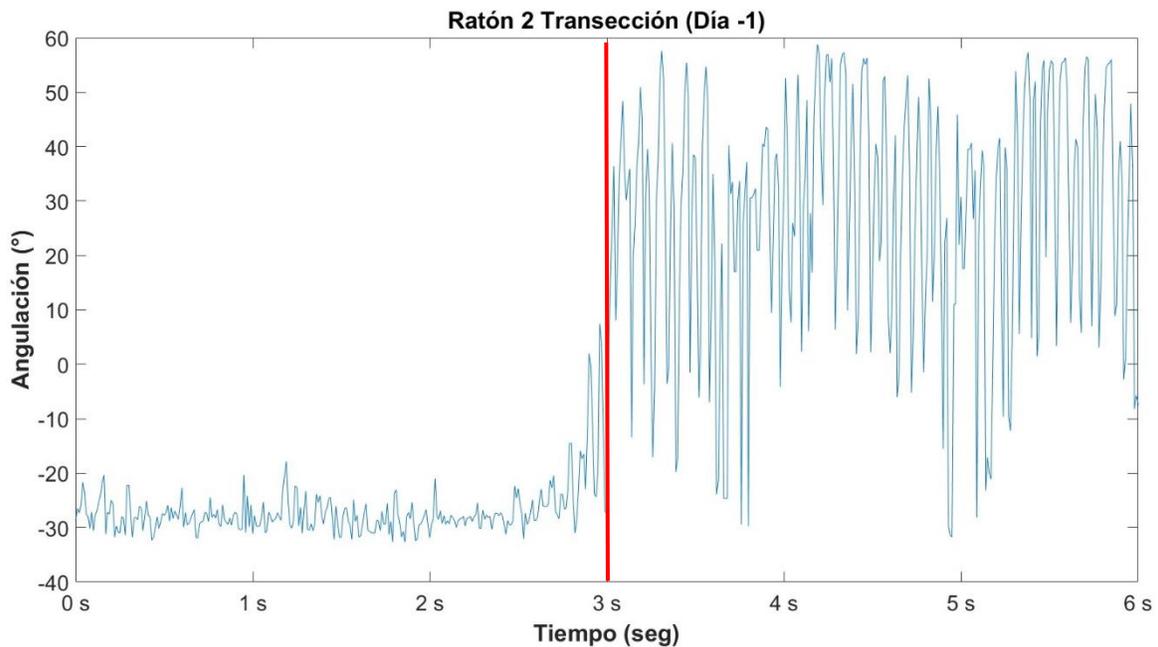


Figura 12.- Ángulos del bigote cuando no se mueve (izquierda) y cuando está en movimiento (derecha).

Tras el seguimiento de 1 segundo se logró graficar los movimientos de protracción y retracción del bigote, con esta señal nos interesó medir la amplitud que se forma de la combinación de dichos movimientos (Figura 13).

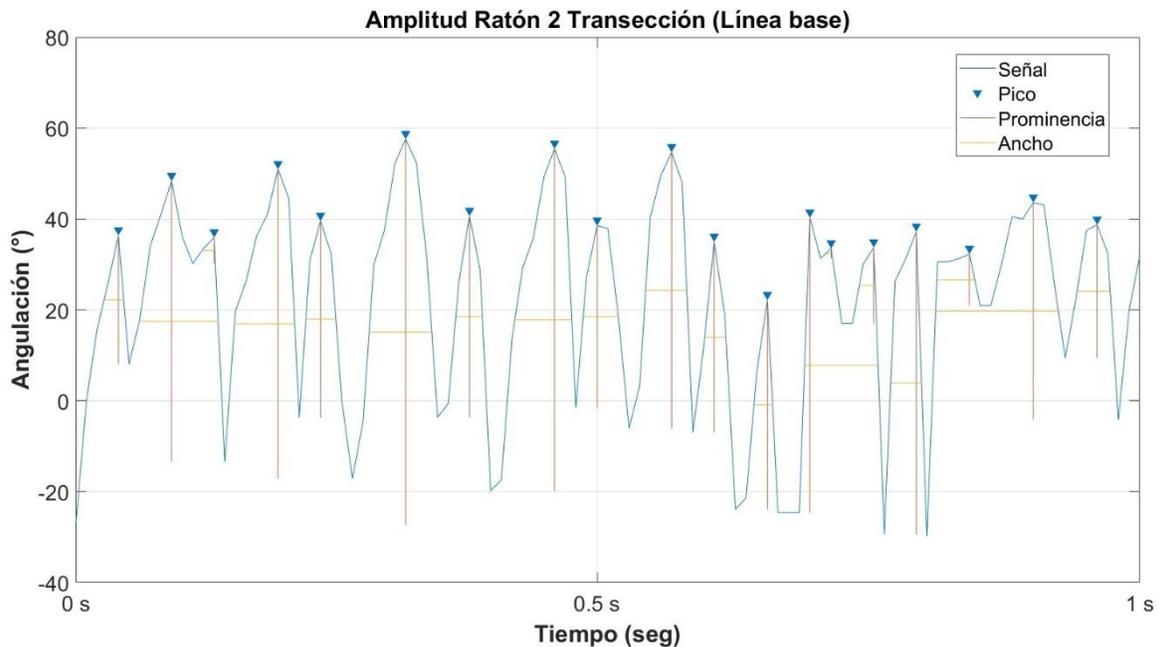


Figura 13.- Ángulos del bigote cuando el ratón está en movimiento (100 fotografías).

Los resultados de la prueba Kruskal-Wallis identificaron que hay un efecto de la lesión producida sobre el desempeño del movimiento de los bigotes en cuanto a la amplitud ($H(69)=1162$, $p<0.05$). Los análisis post hoc llevados a cabo mediante la comparación múltiple de Dunn mostraron que el grupo de cirugía simulada presenta una mayor amplitud desde los 30 minutos de la lesión que los ratones con cirugía por transección ($Mdn=730.9$, $p<0.05$) y con cirugía de compresión ($Mdn=901.4$, $p<0.05$).

Esta diferencia en la amplitud del movimiento de los bigotes en el grupo de cirugía simulada se mantuvo hasta el día 20 en los ratones con cirugía por transección (Mdn=638.6,p<0.05) y hasta el día 8 en los ratones con cirugía por compresión (Mdn=876.1,p<0.05) (Figura 14).

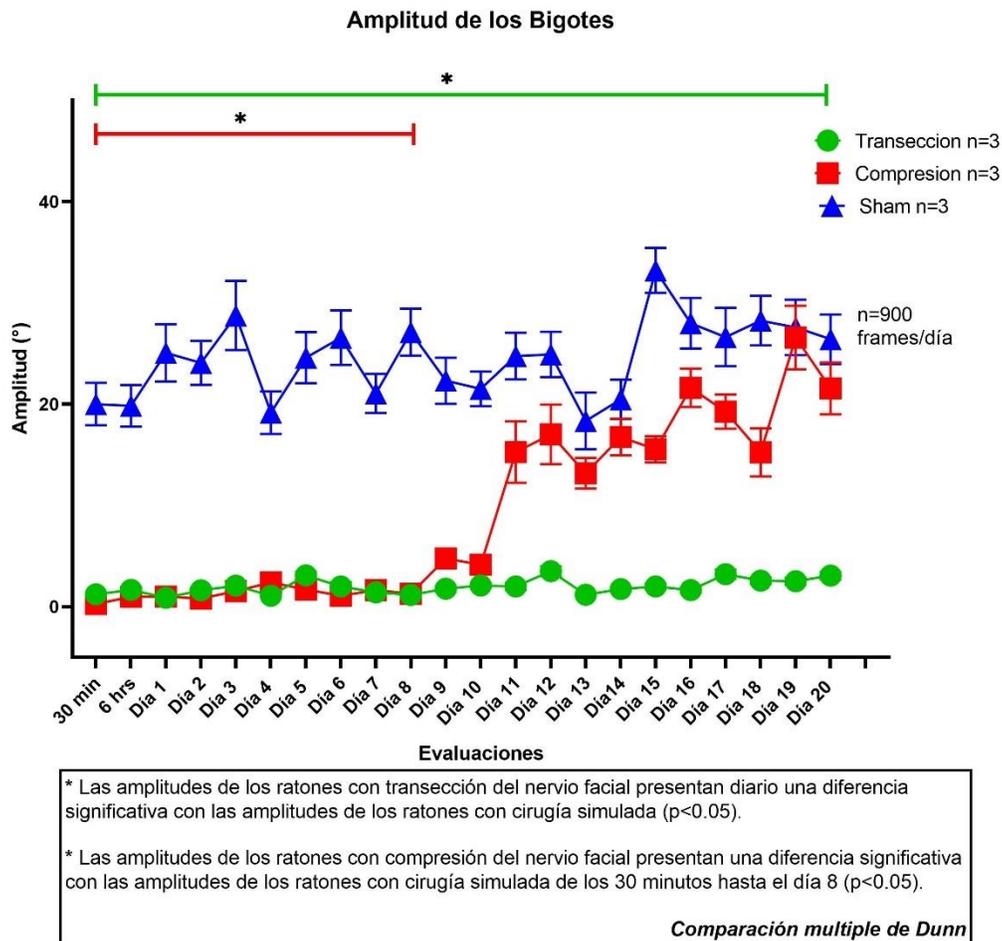
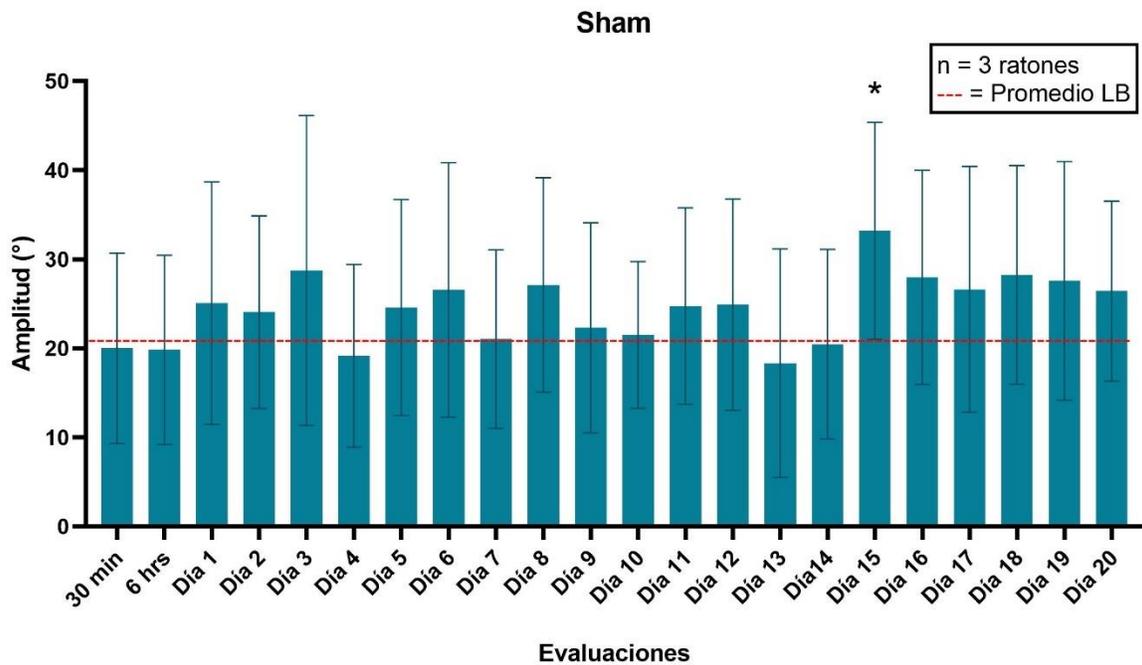


Figura 14.- Gráfica de las amplitudes del movimiento de los bigotes.

ii.-Comparación de la amplitud del movimiento con la línea base

1.- Grupo cirugía simulada

Los análisis post hoc realizados con la comparación múltiple de Dunn mostraron que el grupo de cirugía simulada presentó amplitudes similares del movimiento de los bigotes durante todas las evaluaciones comparado con el promedio de la línea base excepto en el día 15 donde hubo un aumento en la amplitud del movimiento (Mdn=177.7, $p < 0.05$) (Figura 15).



* Diferencia significativa con la línea base de los ratones (9 ratones) ($p < 0.05$)
Comparación múltiple de Dunn

Figura 15.- Gráfica de las amplitudes del movimiento de los bigotes del grupo con cirugía simulada.

2.-Grupo Transección

Los ratones con lesión del nervio facial por transección en el análisis post hoc de la comparación múltiple de Dunn mostraron una disminución en la amplitud del movimiento de los bigotes comparados con el promedio de la línea base a partir de los 30 minutos (Mdn=289.3, $p<0.05$) hasta el día 20 (Mdn=126.2, $p<0.05$). Excepto en el día 17 donde la amplitud del movimiento fue brusca y repentina probablemente asociada a fasciculaciones involuntarias características de los modelos de transección del nervio facial. (Vajtay, 2019) (Figura 16).

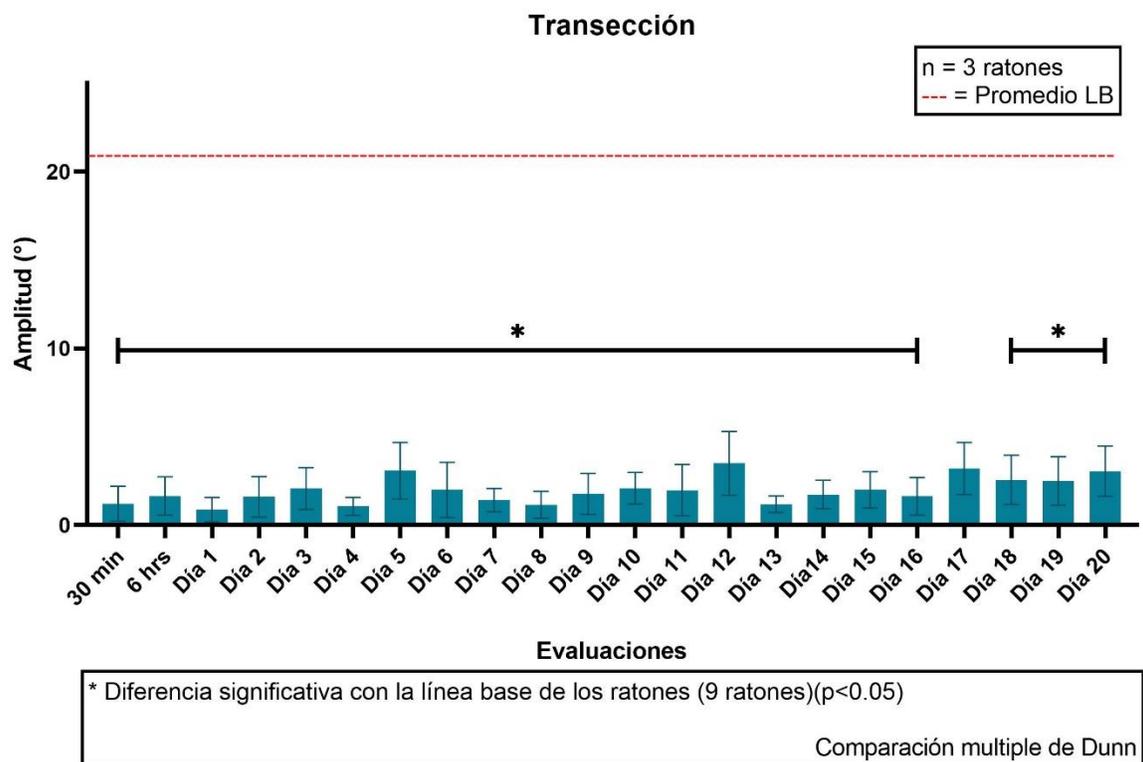
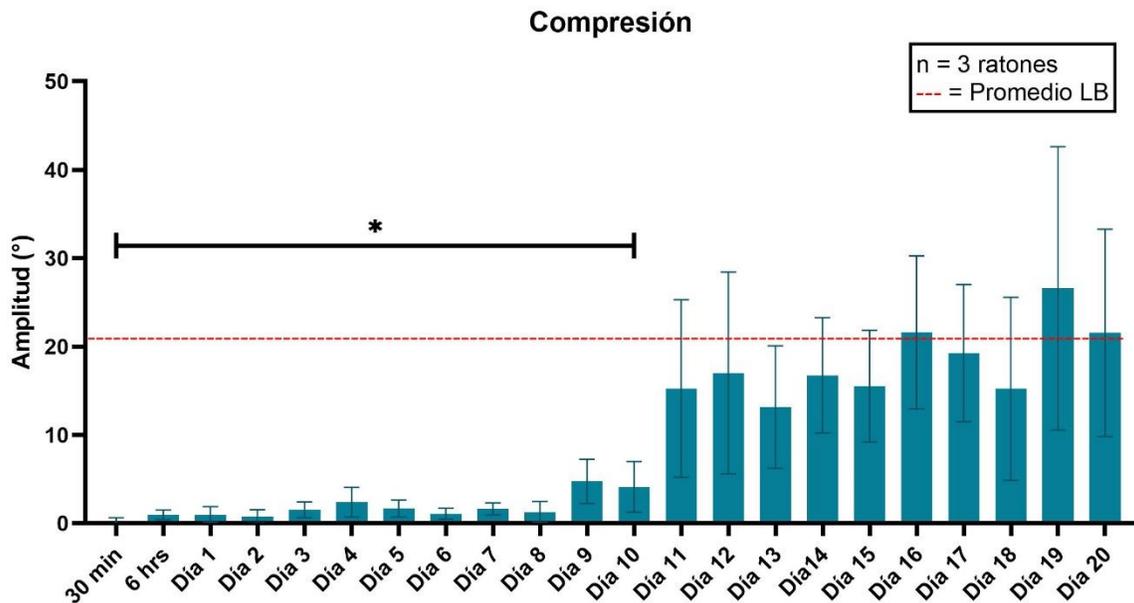


Figura 16.- Gráfica de las amplitudes del movimiento de los bigotes del grupo transección.

3.- Grupo Compresión

Los ratones con lesión del nervio facial por compresión también fueron analizados por la comparación múltiple de Dunn en la que se observó una disminución de la amplitud del movimiento desde los 30 min (Mdn=332.2, $p<0.05$) hasta el día 10 (Mdn=184.6, $p<0.05$). Sin embargo, a partir del día 11 la amplitud fue similar al promedio de la línea base y esta condición se mantuvo hasta el día 20 (Figura 17).



Evaluaciones

* Diferencia significativa con la línea base de los ratones (9 ratones)($p<0.05$)

Comparación múltiple de Dunn

Figura 17.- Gráfica de las amplitudes del movimiento de los bigotes del grupo compresión.

iii.-Representación de la angulación y frecuencia del movimiento de los bigotes

Jowett en su tesis doctoral presenta gráficamente la dinámica del movimiento del bigote de una rata, donde podemos observar la disminución en su angulación y espectro de potencia del movimiento del bigote una vez que la rata es lesionada del nervio facial por compresión (Jowett, 2020).

Con base en los mismos criterios, evaluamos los grados de movimiento del bigote y su espectro de potencia a través del tiempo en los ratones con lesión del nervio facial por transección, compresión y simulada.

La angulación en el movimiento de los bigotes se evaluó en la línea base, día 1, día 10 y día 20 posterior a la cirugía.

Los ratones con cirugía simulada presentaron movimientos del bigote amplios y rápidos durante todas las evaluaciones. En el caso de los ratones con transección del nervio, los movimientos se mostraron claramente disminuidos a partir del día 1. Y en los ratones con compresión del nervio, se observó una disminución en los grados de movimiento el día 1 con un ligero aumento para el día 10 y una evidente recuperación de la angulación para el día 20 (Figura 18).

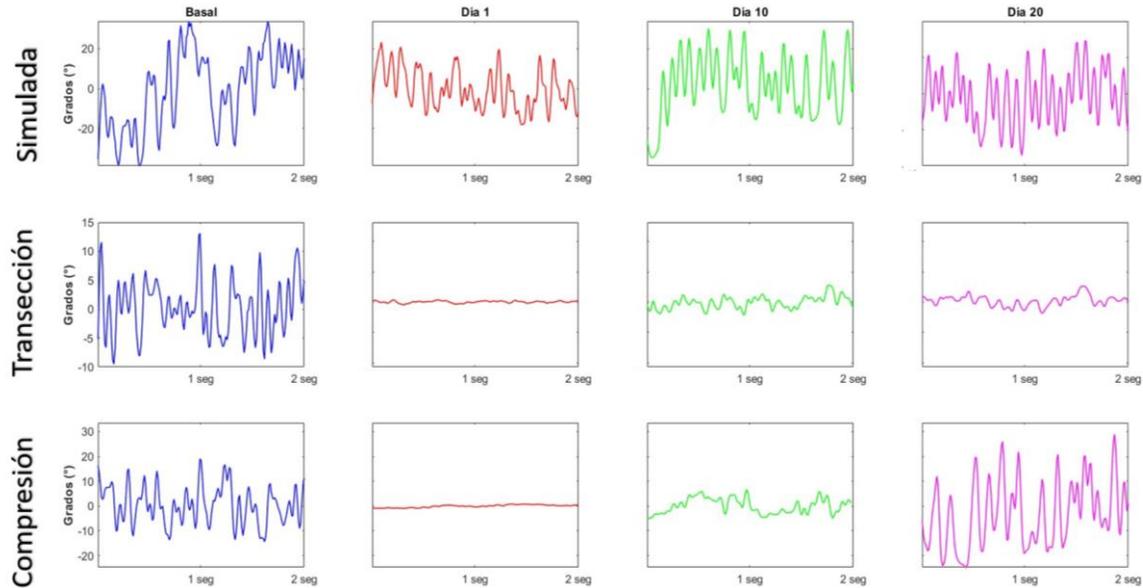


Figura 18.- Grados de angulación del movimiento de los bigotes en ratones con cirugía simulada, transección y compresión a través de los días.

El espectro de potencia de los ratones fue representado durante las mismas evaluaciones, mostrando que los ratones presentan mayores magnitudes de poder espectral en las frecuencias de 0 – 20 Hz.

Los ratones con cirugía simulada mantuvieron las características de la señal similares durante todas las evaluaciones. Los ratones con transección del nervio disminuyeron el poder espectral notoriamente a partir del día 1. Los ratones con compresión del nervio presentaron una disminución importante del poder espectral el día 1 con una ligera recuperación el día 10 y en el día 20 las características de la señal fueron similares a la evaluación basal (Figura 19).

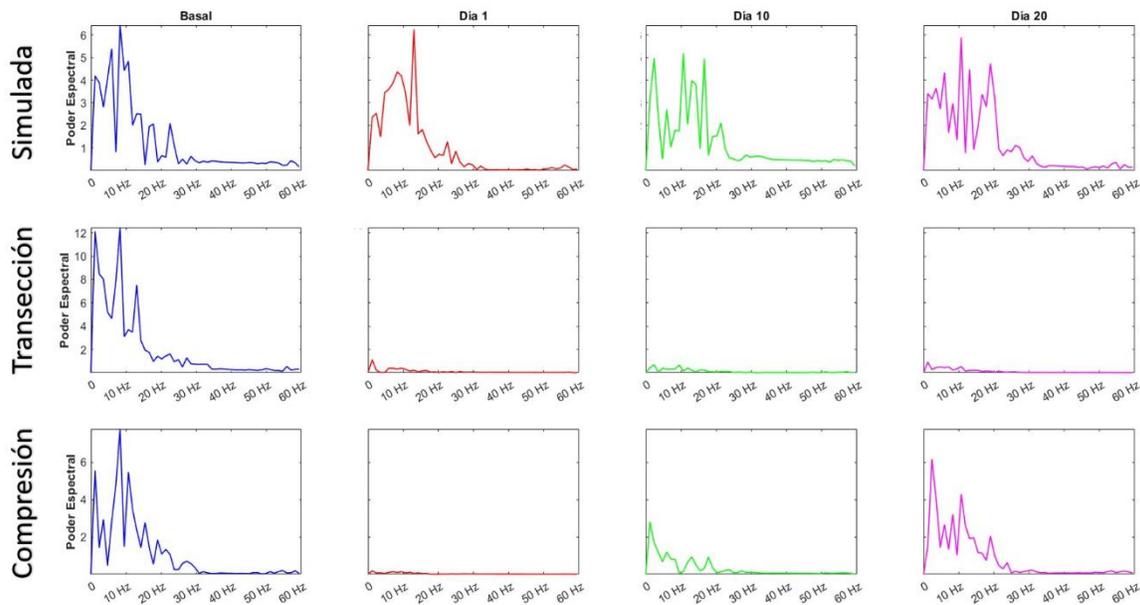


Figura 19.- Espectro de potencia del movimiento de los bigotes en ratones con cirugía simulada, transección y compresión a través de los días.

iv.- Análisis de componentes principales del espectro de potencia

El análisis de componente principales nos muestra que en las evaluaciones basales los grupos se posicionan de manera dispersa, comportamiento que se mantiene a través de los días en los ratones con cirugía simulada, por otro lado, los ratones con transección a partir de los 30 minutos hasta el día 20 se mantienen agrupadas.

Los ratones con compresión al igual que los ratones con transección se mantienen agrupados desde los 30 minutos hasta el día 8, sin embargo, a partir del día 9 comienzan a separarse con una distribución similar a los ratones con cirugía simulada hasta el día 20 (Figura 20).

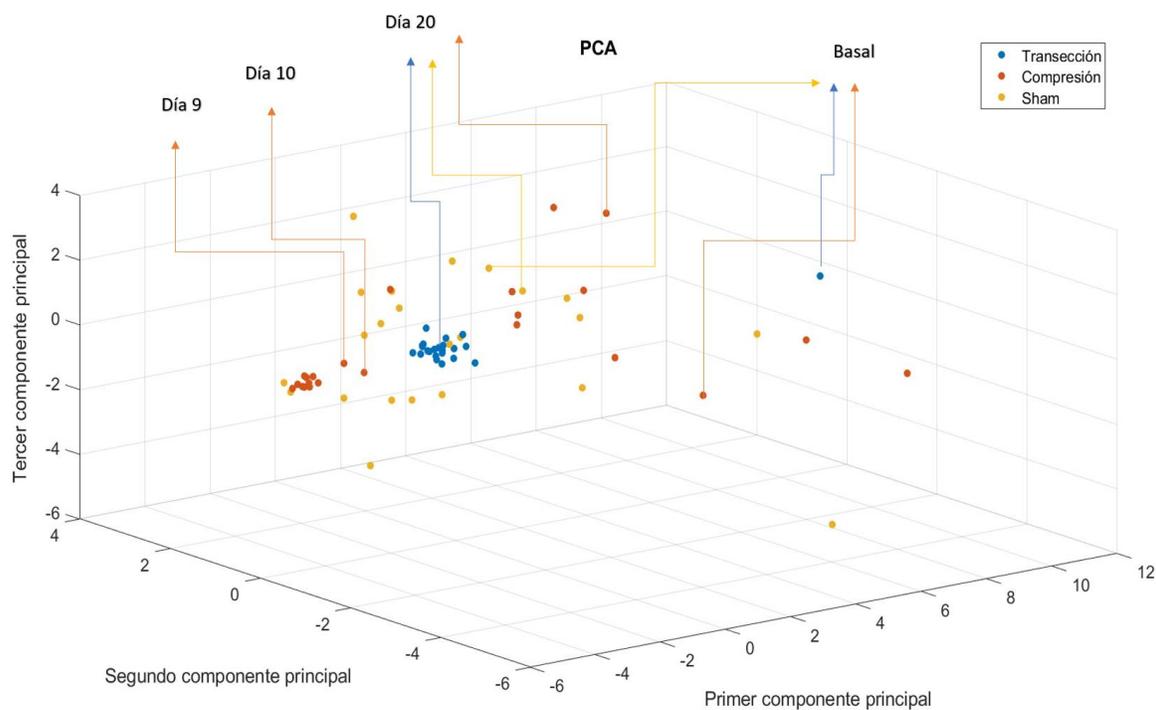


Figura 20.- Gráfica de análisis de componentes principales de la frecuencia del movimiento de los ratones a través de los días.

b) Registro del código facial en los distintos modelos de parálisis facial para su comparación a través del tiempo.

i.-Correlación con el prototipo funcional

El prototipo funcional se correlacionó por medio de una correlación de Pearson con los fotogramas obtenidos en la sesión, en específico 500 fotogramas en los que 250 fotogramas el ratón no se movía y 250 fotogramas en donde se movía (Figura 21).

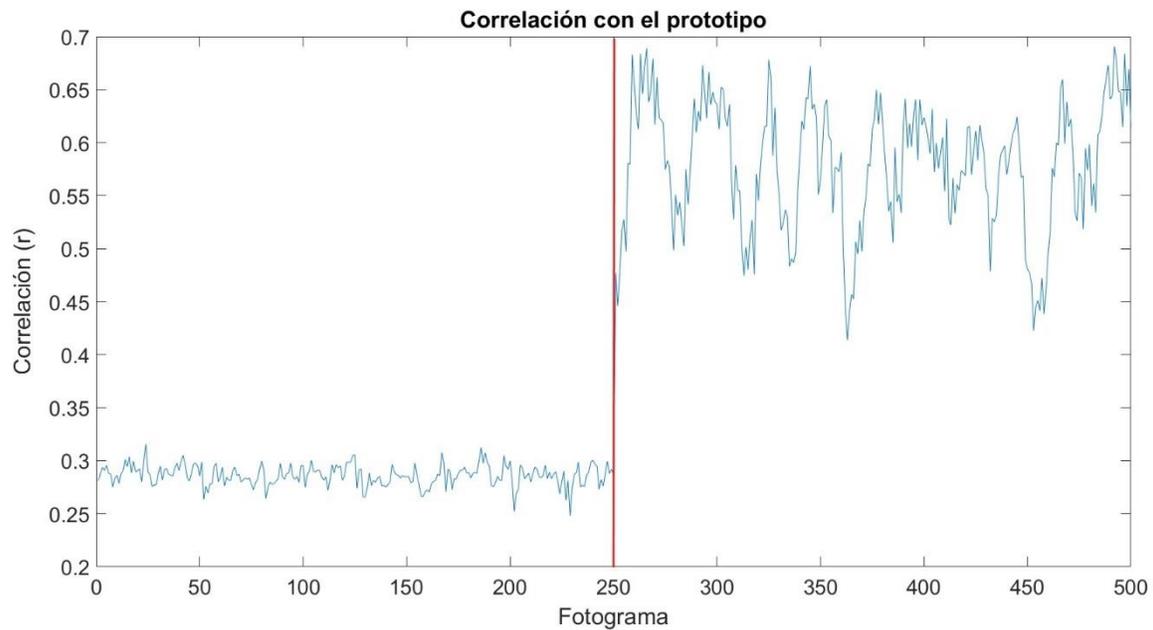


Figura 21.- Gráfica de correlación del prototipo con 250 fotogramas sin movimiento (izquierda) y 250 fotogramas en movimiento (derecha).

La señal de correlación con el prototipo nos permitió conseguir los momentos de mayor cambio como se explicó en los análisis de las expresiones faciales. (Figura 22).

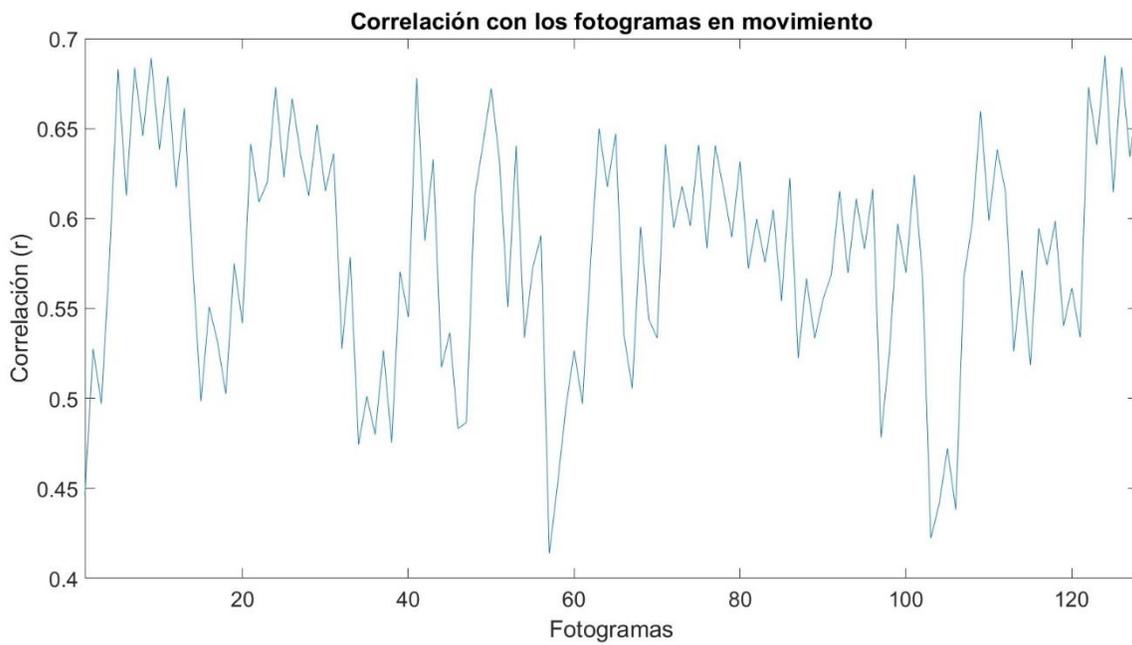


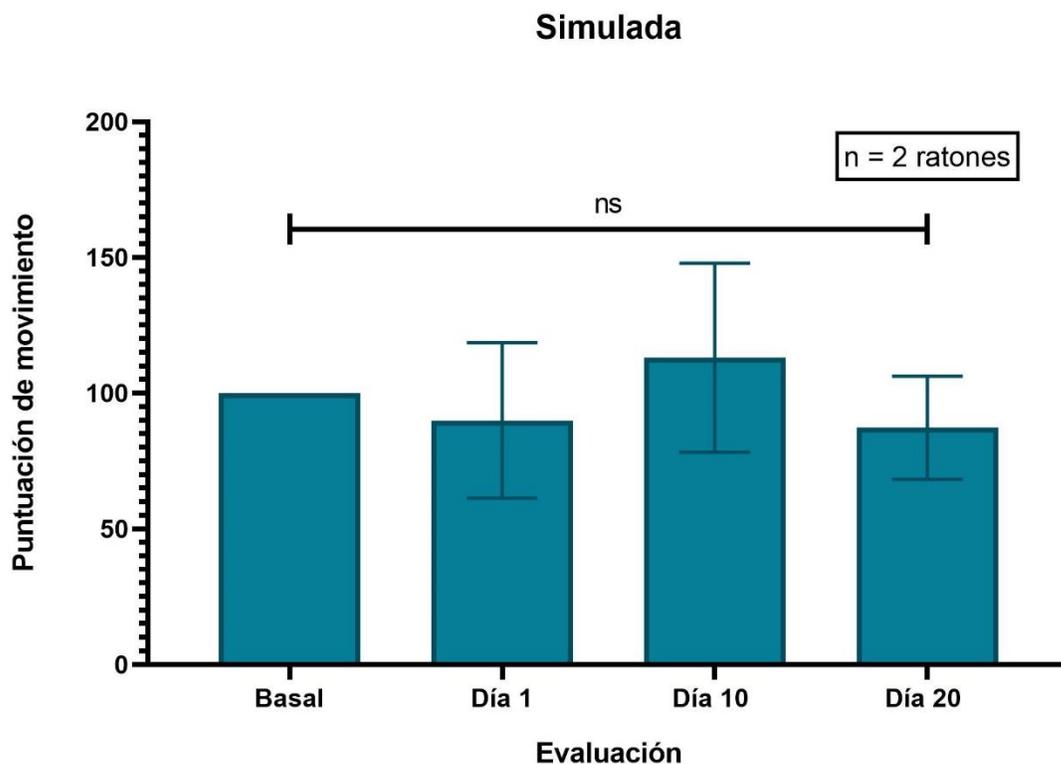
Figura 22.- Gráfica de correlación del prototipo con los frames que representan movimientos faciales superiores a los periodos sin movimiento.

ii.-Puntuación del movimiento

La puntuación del movimiento se obtuvo a través de la señal con mayor cambio en la correlación con el prototipo funcional como se explicó anteriormente. La puntuación nos permitió observar los cambios en la expresión facial de los ratones a través de los días en los distintos grupos.

1) Cirugía simulada del nervio facial

La puntuación del movimiento no se ve afectada por la cirugía simulada en los ratones. $F(3,4)=0.4580$, $p=0.7264$, $\eta^2=0.2557$. En cuanto a la comparación por días realizada con la prueba post hoc de Tukey demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la puntuación de movimiento en la evaluación basal con ningún día evaluado ($p>0.05$) (Figura 23).



ns No presenta diferencias significativas

Comparación múltiple de Tukey

Figura 23.- Gráfica del seguimiento de la puntuación de movimiento a través de los días.
(Simulada)

2) Cirugía de transección del nervio facial

La puntuación del movimiento se ve afectada por la lesión de transección del nervio en los ratones. $F(3,4)=25.02$, $p=0.0047$, $\eta^2 =0.9494$. La comparación por días realizada con la prueba post hoc de Tukey refiere que al comparar con la evaluación basal la puntuación del movimiento presenta diferencias estadísticamente significativas en todas las evaluaciones ($p<0.05$) (Figura 24).

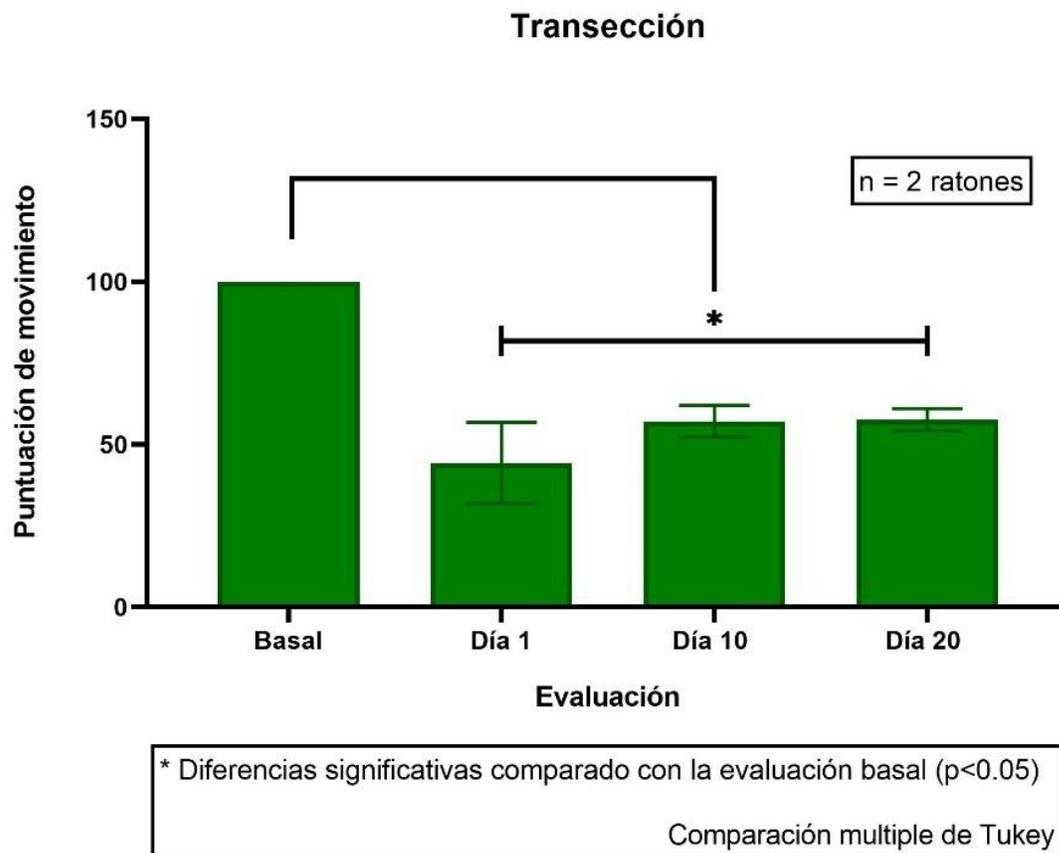
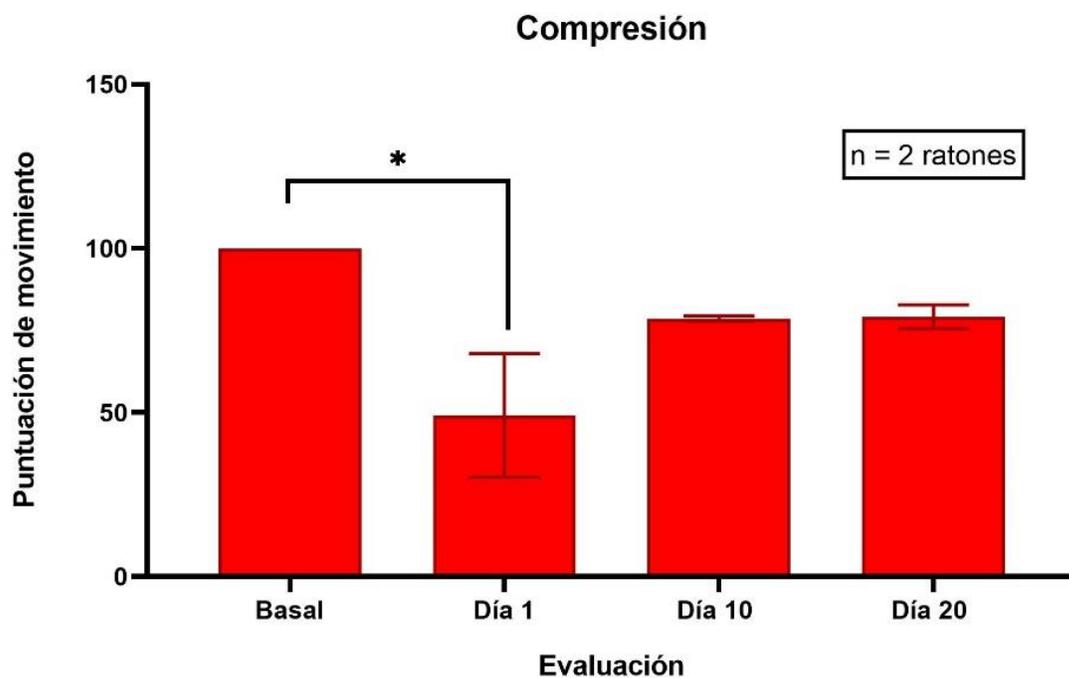


Figura 24.- Gráfica del seguimiento de la puntuación de movimiento a través de los días.
(Transección)

3) Cirugía de compresión del nervio facial

Por último, se observó que la puntuación del movimiento se ve afectada por la lesión de compresión del nervio en los ratones. $F(3,4)=9.452$, $p=0.0274$, $\eta^2=0.8764$. La comparación por días realizada con la prueba post hoc de Tukey refiere que al comparar con la evaluación basal la puntuación del movimiento, los ratones presentaron diferencias estadísticamente significativas el día 1 ($p<0.05$) sin embargo las evaluaciones posteriores no tenían diferencias significativas ($p>0.05$) (Figura 25).



* Diferencias significativas comparado con la evaluación basal ($p<0.05$)
Comparación múltiple de Tukey

Figura 25.- Gráfica del seguimiento de la puntuación de movimiento a través de los días.
(Compresión)

Discusión:

En el presente trabajo decidimos aplicar la visión artificial por un lado en los bigotes y por otro lado en las expresiones faciales de los ratones para evaluar los signos cardinales de la parálisis facial a través del tiempo caracterizando por primera vez la dinámica del movimiento de los bigotes en amplitud, frecuencias y grados. De igual manera presentamos los códigos faciales de los ratones con cirugía simulada, transección y compresión, así como sus cambios a través del tiempo por medio de la puntuación del movimiento.

a) Dinámica del movimiento de los bigotes como signo cardinal de la progresión de la parálisis facial.

En el estudio de la parálisis facial y la regeneración del nervio facial, el modelo murino es el más utilizado y las evaluaciones más utilizadas en este modelo son: el batido de los bigotes, el cierre del ojo, el movimiento del oído y la microscopía de fluorescencia (Chacón, 2019).

Cada evaluación presenta sus retos y limitaciones, en cuanto la evaluación del batido de los bigotes y el movimiento de la oreja por videograbación Chacón refiere la necesidad de realizar el análisis manualmente. En cuanto al cierre del ojo se tiene la limitación de que al evaluarse con una videograbación es necesario un soplo de aire lo que puede producir el movimiento de la cabeza, dificultando el análisis.

Tomando en cuenta estas limitaciones y con el objetivo de resolverlas realizamos 2 evaluaciones.

En la primera donde evaluamos el movimiento de los bigotes por medio de videograbación, se soluciona la limitación del análisis manual por la facilidad de identificar el bigote pintado permitiéndonos realizar un análisis automático de la amplitud del movimiento.

En cuanto a la segunda evaluación se realizó por medio de una videograbación lateral que nos permitió observar la posición de la oreja y el cierre del ojo del ratón, solucionando los inconvenientes del análisis manual, debido a que la expresión facial se analiza automáticamente con la puntuación del movimiento y el inconveniente del movimiento de la cabeza, debido a que no es necesario el soplo del aire para analizar el cierre del ojo.

Hadlock realizó la evaluación y medición de la amplitud del movimiento de los bigotes por medio de un micrómetro laser. Este método es costoso y aun así se logró reportar que el inicio de la recuperación de la función del movimiento por compresión fue a partir del día 11. Asimismo, se reporta que hay una mejora significativa en la recuperación de la amplitud del movimiento en un periodo de 3 días alrededor del día 14. Esto es congruente con nuestros datos ya que de igual manera observamos un periodo de recuperación de 3 días alrededor del día 11 cuando se compara con el promedio de la línea base ($p < 0.05$) por otro lado la recuperación de la función en nuestro estudio inicia a partir del día 9 al ser comparado con el grupo de cirugía simulada ($p < 0.05$) (Hadlock, 2010).

Miura buscando resolver la problemática de la necesidad de tener acceso a un presupuesto alto para la evaluación del movimiento de los bigotes propone utilizar un equipo celular (iPhone X) para la medición de las velocidades angulares en ratas. Sus resultados muestran una recuperación significativa entre el grupo de transección y sutura contra el grupo de compresión mostrando una diferencia significativa a partir de la segunda semana postoperatoria en el grupo con compresión. Lo cual es similar a nuestros resultados ya que de igual manera encontramos una diferencia en los grupos de transección y compresión comparados con el grupo de cirugía simulada a partir de la segunda semana de evaluación posterior a la lesión (Día 9), por otro lado, una de las limitantes presentadas en este estudio es la necesidad de contar con pintura y luz ultravioleta para la identificación del bigote, además de la necesidad de contar con un experimentador capaz de realizar 3 marcas en las ratas: en la base del bigote a evaluar, 1 cm de distancia de la base y en el punto medio del canto medial bilateral lo que representa una evaluación dependiente a las habilidades del examinador de identificar correctamente dichas marcas. Por último, en el estudio se hace uso de la velocidad angular para disminuir el efecto del movimiento de la cabeza del ratón debido a que no se encuentra en un sistema de cabeza fija, si no que es restringido del movimiento por medio de una chaqueta de sujeción (RTS 01–03, Lomir Biomedical, Inc., Quebec, Canadá) (Miura, 2023).

Nuestro trabajo presenta una evaluación del movimiento de los bigotes en ratones y esta dinámica solamente se había evaluado en ratas. Por primera vez logramos caracterizar la dinámica del movimiento en el modelo en ratones y disminuir considerablemente el costo de esta evaluación el cual es un aproximado de \$5,000-\$6,000 USD precio promedio de los micrómetros laser utilizados para la detección del movimiento de los bigotes en los roedores contra \$300-\$360 USD costo promedio de ambos celulares utilizados para el análisis del movimiento de los bigotes y las expresiones faciales en estos análisis. También proponemos un análisis automático producido por el seguimiento del bigote en un sistema de cabeza fija con movimiento semi-restringido lo que permite el correcto seguimiento del bigote y evita la producción de estrés en el ratón.

b) Registro del código facial en los distintos modelos de parálisis facial para su comparación a través del tiempo.

La segunda evaluación para observar las expresiones faciales del ratón se realizó por medio de la videograbación lateral, Chacón en su revisión de las mediciones de los resultados de la regeneración de la parálisis facial en los modelos murinos nos habla de los métodos más utilizados, sin embargo, refiere cada medición (cierre del ojo, batido del bigote y movimiento de la oreja) con un método diferente. Pocas veces, se evalúan más de una medición en el mismo animal, lo que incrementa el número de animales por experimento, hasta la fecha no existía una manera de evaluar de una manera integral estas tres mediciones.

Dolensek hace uso de la visión artificial para el análisis del estado intrínseco de los ratones por medio de prototipos que obtiene gracias al análisis de los histogramas orientados a gradientes, nosotros usamos la misma metodología que Dolensek para la obtención de un prototipo que nos permitiera observar cambios a través del tiempo (Dolensek, 2020).

Nuestros resultados respaldan que obtuvimos un modelo capaz de integrar las mediciones del movimiento del bigote, el cierre del ojo y el movimiento de la oreja simultáneamente. Nuestros datos demuestran dinámicas similares de pérdida de movimiento o recuperación a los modelos utilizados hasta la fecha.

La puntuación del movimiento nos muestra una similitud con la línea base a través del tiempo en el grupo de cirugía simulada ($p < 0.05$), el grupo de transección presenta una disminución en la puntuación del movimiento al compararse con su línea base ($p < 0.05$) y el grupo de compresión presenta una disminución en la puntuación del movimiento un día después de la lesión ($p < 0.05$) junto con una recuperación del movimiento en los días 10 y 20.

Conclusiones

La evaluación del movimiento y recuperación de los bigotes en los ratones es similar al modelo de rata con transección y compresión del nervio facial.

Los resultados de las evaluaciones de las expresiones faciales por medio de la puntuación del movimiento tienen un comportamiento similar a las evaluaciones del movimiento de los bigotes.

El prototipo funcional obtenido del ratón en movimiento nos permitió observar los cambios en el código facial del ratón a través del tiempo por medio de la puntuación del movimiento.

La amplitud del movimiento de los bigotes y la evaluación de las expresiones faciales presentan una disminución significativa en los ratones con transección y compresión del nervio facial a partir del día 1 de evaluación, sin embargo, los ratones con compresión tienen una recuperación de la amplitud y de la puntuación del movimiento el día 10.

La visión artificial nos permitió caracterizar los cambios en el código facial de los ratones analizando los signos cardinales de la parálisis facial (movimiento de la oreja, cierre del ojo, movimiento de los bigotes) a través del tiempo.

Glosario de términos

Sincinesias: Contracción muscular involuntaria provocado por otro movimiento voluntario y resulta de la regeneración aberrante de los nervios faciales (Salles, 2015).

Visión artificial: Campo de la inteligencia artificial que permite que las computadoras y los sistemas obtengan información significativa de imágenes digitales, videos y otras entradas visuales, y tomen acciones o hagan recomendaciones basadas en esa información (IBM, 2022).

Histogramas orientados a gradientes: Descriptores de imagen invariantes a la rotación 2D que se han utilizado en distintas aplicaciones en la visión artificial, como la detección de peatones (Déniz, 2011). Como descriptores de imágenes tiene beneficios clave sobre otros descriptores. Dado que puede operar en células locales, es invariante a las transformaciones geométricas y fotométricas, a excepción de orientación a objetos (Surasak,2018).

Prototipo: Tipo o modelo ideal de algo (Real Academia Nacional de Medicina en España, 2023).

Amplitud: Medida de la variación máxima del desplazamiento de la señal que varía periódica o cuasi periódicamente en el tiempo (Gerig A., 2021).

Amplitud del movimiento de los bigotes: Distancia entre el punto de mayor protracción y retracción del movimiento del bigote del ratón.

Línea base: Evaluación realizada un día antes de realizar la cirugía de lesión del nervio (compresión, transección y simulada).

Número índice: Medida estadística que nos permite estudiar las variaciones de una magnitud en relación con el tiempo (López, 1996).

Código facial: Información obtenida por medio de los Histogramas Orientados a Gradientes (HOGS) que a través de la combinación de algoritmos de reconocimiento de imágenes pueden describir las características faciales principales de los ratones (Elbel, 2016).

Literatura citada:

- Aguayo, A. J., Rasminsky, M., Bray, G. M., Carbonetto, S., McKerracher, L., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Carter, D. A. (1991). Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 331(1261), 337–343. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0025>
- Ahmed A. (2005). When is facial paralysis Bell palsy? Current diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 72(5), 398–405. <https://doi.org/10.3949/ccjm.72.5.398>
- Almenara, J., González, J. L., García, C., & Peña, P. (1998). ¿Qué es el análisis de Componentes principales? *Jano*, 1268, 58–60.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1996). Measurement error. *BMJ (Clinical research ed.)*, 312(7047), 1654. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7047.1654>
- Cambridge University (2021), *Inteligencia artificial*, Cambridge dictionary, Cambridge University Press, <https://dictionary.cambridge.org/es/diccionario/ingles-espanol/artificial-intelligence>
- Chacon, M. A., Echternacht, S. R., & Leckenby, J. I. (2019). Outcome measures of facial nerve regeneration: A review of murine model systems. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 227, 151410. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.07.011>
- Déniz, O., Bueno, G., Salido, J., & De la Torre, F. (2011). Face recognition using Histograms of Oriented Gradients. *Pattern Recognition Letters*, 32(12), 1598–1603. <https://doi.org/10.1016/j.patrec.2011.01.004>
- Dolensek, N., Gehrlach, D. A., Klein, A. S., & Gogolla, N. (2020). Facial expressions of emotion states and their neuronal correlates in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6486), 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.aaz9468>
- Domínguez-Oliva, A., Mota-Rojas, D., Hernández-Avalos, I., Mora-Medina, P., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., Casas-Alvarado, A., & Whittaker, A. L. (2022). The neurobiology of pain and facial movements in rodents: Clinical applications and current research. *Frontiers in veterinary science*, 9, 1016720. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1016720>
- Dorschner, B., Süße, H., Ortmann, W., Irintchev, A., Denzler, J., & Guntinas-Lichius, O. (2016). An automated whisker tracking tool for the rat facial nerve injury paradigm. *Journal of neuroscience methods*, 271, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.015>
- Echeverry, J. D., Guarnizo Lemus, C., & Orozco G., Álvaro Ángel. (2007). Análisis de la densidad espectral de potencia en registros mer. *Scientia Et Technica*, 1(35). <https://doi.org/10.22517/23447214.5379>

- Echternacht, S. R., Chacon, M. A., & Leckenby, J. I. (2021). Central versus peripheral nervous system regeneration: is there an exception for cranial nerves?. *Regenerative medicine*, 16(6), 567–579. <https://doi.org/10.2217/rme-2020-0096>
- Elbel, G.-K. (2016, marzo 3). Facial Coding. Deloitte. <https://www2.deloitte.com/de/de/pages/life-sciences-and-healthcare/articles/facial-coding-neuroscience-institute.html>
- Facial Palsy UK. (2021, 15 mayo). What is Facial Palsy? Recuperado 15 de octubre de 2021, de <https://www.facialpalsy.org.uk>
- Fujiwara, T., Matsuda, S., Tanaka, J., & Hato, N. (2017). Facial paralysis induced by ear inoculation of herpes simplex virus in rat. *Auris, nasus, larynx*, 44(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2016.04.002>
- Gerig A. (2021). Introduction to Wave Physics, 4-6, ISBN 9798717849142 https://books.google.com.mx/books/about/Introduction_to_Wave_Physics.html?id=cppTzqEACAAJ&redir_esc=y
- Gilden D. H. (2004). Clinical practice. Bell's Palsy. *The New England journal of medicine*, 351(13), 1323–1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp041120>
- Gould, D. J. (2014). Neuroanatomía de bolsillo. LWW.
- Guntinas-Lichius, O., Wewetzer, K., Tomov, T. L., Azzolin, N., Kazemi, S., Streppel, M., Neiss, W. F., & Angelov, D. N. (2002). Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(16), 7121–7131. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-16-07121.2002>
- Hadlock, T. A., Kowaleski, J., Lo, D., Mackinnon, S. E., & Heaton, J. T. (2010). Rodent facial nerve recovery after selected lesions and repair techniques. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(1), 99–109. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181c2a5ea>
- Hadlock, T., Kowaleski, J., Lo, D., Bermejo, R., Zeigler, H. P., Mackinnon, S., & Heaton, J. T. (2008). Functional assessments of the rodent facial nerve: a synkinesis model. *The Laryngoscope*, 118(10), 1744–1749. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e31817f5255>
- Hare, B. D., Beierle, J. A., Toufexis, D. J., Hammack, S. E., & Falls, W. A. (2014). Exercise-associated changes in the corticosterone response to acute restraint stress: evidence for increased adrenal sensitivity and reduced corticosterone response duration. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(5), 1262–1269. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.329>
- Heaton, J. T., Kowaleski, J. M., Bermejo, R., Zeigler, H. P., Ahlgren, D. J., & Hadlock, T. A. (2008). A system for studying facial nerve function in rats through simultaneous bilateral monitoring of eyelid and whisker movements. *Journal of neuroscience methods*, 171(2), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.02.023>

- Heaton, J. T., Sheu, S. H., Hohman, M. H., Knox, C. J., Weinberg, J. S., Kleiss, I. J., & Hadlock, T. A. (2014). Rat whisker movement after facial nerve lesion: evidence for autonomic contraction of skeletal muscle. *Neuroscience*, 265, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.038>
- Henstrom, D., Hadlock, T., Lindsay, R., Knox, C. J., Malo, J., Vakharia, K. T., & Heaton, J. T. (2012). The convergence of facial nerve branches providing whisker pad motor supply in rats: implications for facial reanimation study. *Muscle & nerve*, 45(5), 692–697. <https://doi.org/10.1002/mus.23232>
- Hizay, A., Seitz, M., Grosheva, M., Sinis, N., Kaya, Y., Bendella, H., Sarikcioglu, L., Dunlop, S. A., & Angelov, D. N. (2016). FGF-2 is required to prevent astrogliosis in the facial nucleus after facial nerve injury and mechanical stimulation of denervated vibrissal muscles. *Journal of biomedical research*, 30(2), 142–148. <https://doi.org/10.7555/JBR.30.20140042>
- International Business Machines Corporation. (2022). *¿Qué es la visión artificial?*. IBM. IBM - Deutschland | IBM. <https://www.ibm.com/mx-es/topics/computer-vision>
- Jorquera Moya, M., Merino Menéndez, S., Porta Etessam, J., Escribano Vera, J., & Yus Fuertes, M. (2019). Cranial nerve disorders: clinical manifestations and topography. *Sintomatología derivada de los pares craneales: Clínica y topografía. Radiología*, 61(2), 99–123. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2018.09.005>
- Jowett, N. (2020). Design of a Neural Prosthesis for Facial Reanimation and Assessment in a Rat Model (Doctoral dissertation). Department of Biomedical Engineering, McGill University, Montréal, QC, Canadá. Recuperado de <https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/4j03d463t>
- Juczewski, K., Koussa, J. A., Kesner, A. J., Lee, J. O., & Lovinger, D. M. (2020). Stress and behavioral correlates in the head-fixed method: stress measurements, habituation dynamics, locomotion, and motor-skill learning in mice. *Scientific reports*, 10(1), 12245. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69132-6>
- Kochhar, A., Larian, B., & Azizzadeh, B. (2016). Facial Nerve and Parotid Gland Anatomy. *Otolaryngologic clinics of North America*, 49(2), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2015.10.002>
- Lee, J. M., Choi, Y. J., Yoo, M. C., & Yeo, S. G. (2023). Central Facial Nervous System Biomolecules Involved in Peripheral Facial Nerve Injury Responses and Potential Therapeutic Strategies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(5), 1036. <https://doi.org/10.3390/antiox12051036>
- Leckenby, J. I., Chacon, M. A., Rolfe, K., Lichtman, J. W., & Grobbelaar, A. O. (2019). Development of the interscutularis model as an outcome measure for facial nerve surgery. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 223, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.03.001>

- Lorch, M., & Teach, S. J. (2010). Facial nerve palsy: etiology and approach to diagnosis and treatment. *Pediatric emergency care*, 26(10), 763–773. <https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e3181f3bd4a>
- López Cachero, M. (1996). *Fundamentos y métodos de estadística* (Edición). Ediciones Pirámide.
- Mallick, S.(2016). Histogram of Oriented Gradients explained using OpenCV. United States of America : LearnOpenCV. <http://learnopencv.com/histogram-of-oriented-gradients/>
- Miura, T., Yamamoto, Y., Funayama, E., Ishikawa, K., & Maeda, T. (2023). Development of a simultaneous and noninvasive measuring method using high-frame rate videography and motion analysis software for the assessment of facial palsy recovery in a rat model. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 82, 211–218. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2023.04.026>
- Modrak, M., Talukder, M. A. H., Gurgenshvili, K., Noble, M., & Elfar, J. C. (2020). Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *Journal of neuroscience research*, 98(5), 780–795. <https://doi.org/10.1002/jnr.24538>
- Olmstead, D. N., Mesnard-Hoaglin, N. A., Batka, R. J., Haulcomb, M. M., Miller, W. M., & Jones, K. J. (2015). Facial nerve axotomy in mice: a model to study motoneuron response to injury. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (96), e52382. <https://doi.org/10.3791/52382>
- Peitersen E. (2002). Bell's palsy: the spontaneous course of 2,500 peripheral facial nerve palsies of different etiologies. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, (549), 4–30.
- Peña, D. (2002). *Análisis de datos multivariados*. Madrid: McGraw Hill.
- Rath, B., Gidudu, J. F., Anyoti, H., Bollweg, B., Caubel, P., Chen, Y. H., Cornblath, D., Fernandopulle, R., Fries, L., Galama, J., Gibbs, N., Grilli, G., Grogan, P., Hartmann, K., Heininger, U., Hudson, M. J., Izurieta, H. S., Jevaji, I., Johnson, W. M., Jones, J., ... Brighton Collaboration Bell's Palsy Working Group (2017). Facial nerve palsy including Bell's palsy: Case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine*, 35(15), 1972–1983. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.023>
- Real Academia Nacional de Medicina en España. (s.f.). Citación. En el *Diccionario de Términos Médicos Recuperado el 20 de junio, 2023*, en <https://dtme.ranm.es/index.aspx>
- Restrepo, L. F., Posada, S. L., & Noguera, R. R. (2012). Aplicación del análisis por componentes principales en la evaluación de tres variedades de pasto. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria*, 25(2), 258-266. ISSN 0120-0690.
- Seddon H. J. (1942). A Classification of Nerve Injuries. *British medical journal*, 2(4260), 237–239. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4260.237>

- Seneviratne, S. O., & Patel, B. C. (2023). Facial Nerve Anatomy and Clinical Applications. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Socolovsky, M., Di Masi, G., & Battaglia, D. (2011). Use of long autologous nerve grafts in brachial plexus reconstruction: factors that affect the outcome. *Acta neurochirurgica*, 153(11), 2231–2240. <https://doi.org/10.1007/s00701-011-1131-1>
- Sulaiman, W., & Gordon, T. (2013). Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *The Ochsner journal*, 13(1), 100–108.
- Surasak, I. Takahiro, C. -h. Cheng, C. -e. Wang and P. -y. Sheng, "Histogram of oriented gradients for human detection in video," 2018 5th International Conference on Business and Industrial Research (ICBIR), Bangkok, Thailand, 2018, pp. 172-176, [doi:10.1109/ICBIR.2018.8391187](https://doi.org/10.1109/ICBIR.2018.8391187)
- Vajtay, T. J., Bandi, A., Upadhyay, A., Swerdel, M. R., Hart, R. P., Lee, C. R., & Margolis, D. J. (2019). Optogenetic and transcriptomic interrogation of enhanced muscle function in the paralyzed mouse whisker pad. *Journal of neurophysiology*, 121(4), 1491–1500. <https://doi.org/10.1152/jn.00837.2018>
- Vijayavenkataraman S. (2020). Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta biomaterialia*, 106, 54–69. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.003>
- Wood, M. D., Kemp, S. W., Weber, C., Borschel, G. H., & Gordon, T. (2011). Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 193(4), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.04.008>