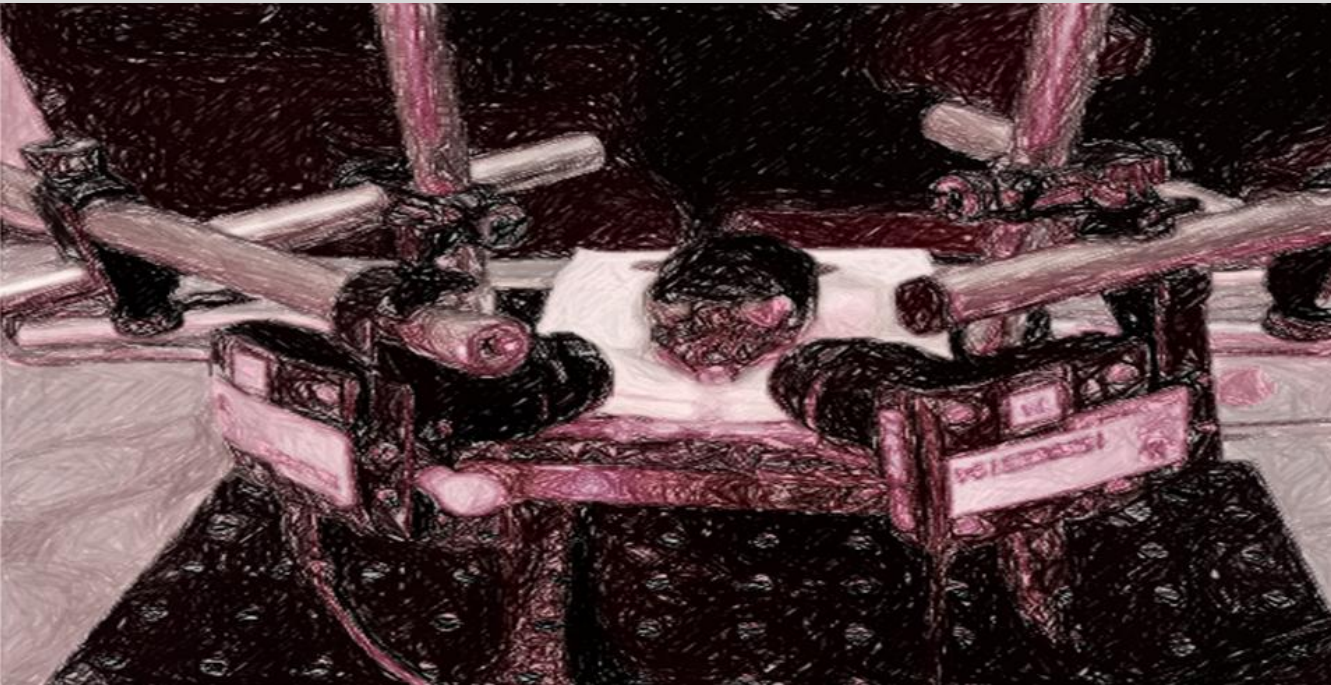


**SISTEMA INTEGRADO DE REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA
RESPUESTA PUPILAR EN ROEDORES
APLICACIÓN AL ESTUDIO DEL DOLOR Y DEL LOCUS COERULEUS**

TESIS DOCTORAL
ALEJANDRO LARA DOÑA



Directores: Daniel Sánchez Morillo y Sonia Torres Sánchez

2025



Departamento de Ingeniería en Automática, Electrónica, Arquitectura y
Redes de Computadores. Grupo de Investigación de Bioingeniería,
Automática y Robótica. Escuela Superior de Ingeniería.

TESIS DOCTORAL

Sistema integrado de registro y análisis de la respuesta pupilar en roedores

Aplicación al estudio del dolor y el locus coeruleus

Autor

Alejandro Lara Doña

Directores

Dr. Daniel Sánchez Morillo

Dra. Sonia Torres Sánchez

Programa de Doctorado: Fabricación, Materiales e Ingeniería Ambiental
Línea de Investigación: Bioingeniería, Automática, Robótica y Diseño Electrónico

FINANCIACIÓN

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda del contrato predoctoral fpuUCA 2019, financiado por la Universidad de Cádiz en la convocatoria 2019-010/PU/EPIF-FPU-CT/CP, en la modalidad de contratos predoctorales de formación de profesorado universitario.

Además, ha contado con el soporte de los siguientes proyectos, en los que el autor ha colaborado como parte del equipo de trabajo:

- “Diferencias sexuales en la comorbilidad dolor crónico y ansiedad: Foco en el Locus Coeruleus”. Proyecto de I+D+i RTI2018-099778-B-I00 financiado por el “Fondo Europeo de Desarrollo Regional” (FEDER)-UE “Una manera de hacer Europa” del Ministerio de Economía y Competitividad.
- “Respuesta de dilatación de la pupila como un nuevo biomarcador de dolor: Desarrollo técnico y validación preclínica”. Proyecto de I+D+i PDC2022-133987-100 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por “Unión Europea NextGenerationEU” /PRTR.

AGRADECIMIENTOS

A Daniel, por todo tu trabajo y dedicación durante estos años, enseñándome que lo perfecto no siempre es lo mejor, aunque todavía me cueste asumirlo del todo. Recuerdo gratamente aquella oportunidad que me permitió reengancharme a la Universidad tras terminar mis estudios de grado, en un momento en el que no sabía qué camino profesional tomar. Sin esa experiencia, quizá nunca hubiera descubierto mi vocación por enseñar y motivar a los futuros ingenieros que deberán enfrentarse a los retos del mañana.

A Sonia, por todo tu trabajo y dedicación en este tiempo. Sé que no siempre ha sido fácil entenderme, pero como alguien que disfruta buscando soluciones, me has enseñado a pensar de manera diferente y a comprender que lo más técnico no siempre es lo más acertado. Gracias por abrirme las puertas al fascinante mundo de la biología y recordarme el enorme valor de los equipos multidisciplinares.

A mis padres, por permitirme equivocarme y darme la oportunidad de volver a empezar desde cero, incluso cuando ni yo confiaba en mí mismo. Por haber fomentado mi curiosidad desde pequeño y apoyarme incondicionalmente en cada proyecto que emprendo. Siempre habéis sido un pilar fundamental en mi vida, y os agradezco profundamente todo lo que habéis hecho por mí.

A mi hermana, por estar siempre a mi lado en los peores momentos y, sin decirlo, enseñarme que lo más importante en la vida son la familia y los amigos. Gracias por conseguir que saliera de casa cuando más lo necesitaba y por recordarme, con tu apoyo incondicional, lo que realmente importa.

A mi familia, gracias por el apoyo que siempre me habéis mostrado. Siempre he sentido la presión de ser el mayor y tenía miedo a equivocarme, pero eso es lo que finalmente ha definido quien soy hoy en día. Siempre estaremos ahí y seremos “casita”.

A mi pareja, sé no ha sido fácil esta época (muchos cambios, poco tiempo y todo muy nuevo), pero sigues ahí y estoy agradecido de que seas un gran apoyo y una persona que me cuida cuando lo necesito.

A los scouts, a aquellos que conocí cuando era un lobato y que ahora llamo amigos (aunque en su momento fuisteis mis responsables). A mis compañeros, esos amigos que aún conservo, con quienes compartí tanto tiempo haciendo felices a los demás. Y a los que me llevaron a dejar la Selva para volver a ser uno más entre los niños perdidos. Estoy seguro de que no estaría donde estoy hoy sin todo lo que aprendí en el Grupo.

Y a mis compañeros de laboratorio del Grupo ATARI. Es un verdadero placer formar parte de un ambiente en el que siempre hay tiempo para un café y donde el apoyo y los ánimos nunca faltan, especialmente en los momentos difíciles o importantes.

“El objetivo principal de la educación en las escuelas debe ser la creación de hombres y mujeres capaces de hacer cosas nuevas, no simplemente repetir lo que otras generaciones han hecho; hombres y mujeres creativos, inventivos y descubridores, que puedan ser críticos y verificar y no aceptar, todo lo que se les ofrece.”

Jean William Fritz Piaget

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Departamento de Ingeniería en Automática, Electrónica y Arquitectura y
Redes de Computadores. Grupo de Investigación de Bioingeniería,
Automática y Robótica. Escuela Superior de Ingeniería.

Tesis Doctoral

Sistema integrado de registro y análisis de la respuesta pupilar en roedores. Aplicación al estudio del dolor y el locus coeruleus.

por Alejandro Lara Doña

Resumen

Las teorías actuales sugieren que el dolor crónico puede inducir cambios funcionales responsables del desarrollo de alteraciones afectivas y cognitivas, como ansiedad, depresión, y déficits en la memoria de trabajo y toma de decisiones. Se postula que tanto el dolor crónico como la depresión y la ansiedad podrían compartir mecanismos neurobiológicos comunes, siendo el dolor crónico un factor de riesgo para la aparición de los trastornos afectivos. El Locus Coeruleus (LC), la principal fuente de síntesis cerebral de noradrenalina emerge como una región clave para estudiar los circuitos cerebrales implicados en esta comorbilidad.

Sin embargo, el rol del sistema noradrenérgico-LC en el dolor crónico aún no está completamente definido. El LC está relacionado con el comportamiento ansioso y depresivo en modelos de dolor neuropático, lo que refuerza su propuesta como núcleo crítico en la comorbilidad entre dolor crónico y trastornos afectivos. Debido a las dificultades de acceso al LC en humanos, se precisa del uso de técnicas no invasivas para su estudio. Existen evidencias en humanos, primates y roedores que indican que las variaciones en el tamaño de la pupila no inducidas por cambios en el nivel de iluminación están correlacionadas con el nivel de alerta, atención y procesamiento cognitivo. En roedores y primates, se ha demostrado que los cambios en el diámetro de la pupila pueden reflejar cambios en la actividad neuronal del LC. Además, los estímulos nociceptivos evocan la dilatación pupilar junto con la activación del LC. Por ello el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el de abordar el estudio de la pupilometría como técnica no invasiva, fiable y fácilmente accesible para evaluar los cambios en la actividad del sistema noradrenérgico-LC, dada su implicación en la fisiopatología del dolor crónico y en la comorbilidad dolor

crónico-trastornos afectivos como la ansiedad o la depresión. Para lograrlo, se ha desarrollado un nuevo sistema experimental para su uso en modelos animales. Este sistema engloba un diseño mecánico, técnicas de inteligencia artificial y de procesamiento de imágenes para la medición automática y binocular del diámetro pupilar. Además, integra tecnologías de optogenética comerciales para la manipulación selectiva de la actividad del LC y de registro de señales electrofisiológicas (potenciales de campo local). De forma complementaria, se han desarrollado herramientas de análisis que parametrizan el entorno experimental, permitiendo la caracterización precisa y dinámica de la respuesta pupilar mediante nuevas métricas que capturan la magnitud y velocidad de la dilatación pupilar. Todos estos desarrollos se han evaluado con diferentes paradigmas experimentales, incluyendo experimentos en animales sanos y con dolor a largo plazo, para analizar la relación entre la actividad del LC, el tamaño pupilar y la respuesta nociceptiva.

Los resultados obtenidos corroboran que la fotoactivación mediante el uso de técnicas de optogenética de las neuronas noradrenérgicas del LC es capaz de producir una respuesta de dilatación pupilar en animales sanos, y se han evidenciado diferencias sexuales en la respuesta pupilar. Además, estas diferencias en la respuesta pupilar entre sexos se produjeron tanto en animales sanos como en modelos con dolor neuropático a largo plazo, y la respuesta pupilar correlacionó con los cambios en la actividad del LC en respuesta a estímulos nociceptivos, lo que respalda su uso como biomarcador no invasivo. La integración de la medida de la actividad electrofisiológica permitió registrar de manera sincronizada la actividad neuronal del LC y la dilatación pupilar, proporcionando una visión más completa de los mecanismos subyacentes.

En conclusión, este trabajo establece una metodología robusta para el estudio, vía un biomarcador indirecto como la respuesta pupilar, de la actividad del LC y su relación con el dolor. La pupilometría se presenta como una herramienta prometedora, con gran potencial de traslacionalidad clínica. Este enfoque multidisciplinar, que combina neurociencia, ingeniería biomédica, de sistemas y automática e inteligencia artificial, aspira a contribuir significativamente a la comprensión de los mecanismos neurobiológicos subyacentes, lo que podría contribuir al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Department of Automation, Electronics and Computer Architecture and Network Engineering. Research Group on Bioengineering, Automation and Robotics. School of Engineering.

Doctor of Philosophy

Integrated system for recording and analyzing pupillary response in rodents. Application to the study of pain and locus coeruleus.

by Alejandro Lara Doña

Abstract

Current theories suggest that chronic pain may induce functional changes responsible for the development of affective and cognitive alterations, such as anxiety, depression, and deficits in working memory and decision-making. It is hypothesized that both chronic pain and depression and anxiety may share common neurobiological mechanisms, with chronic pain serving as a risk factor for the onset of affective disorders. The Locus Coeruleus (LC), the primary source of brain norepinephrine synthesis, emerges as a key region for studying the brain circuits involved in this comorbidity.

However, the role of the noradrenergic-LC system in chronic pain remains not fully defined. The LC is associated with anxious and depressive behaviors in neuropathic pain models, further supporting its role as a critical nucleus in the comorbidity between chronic pain and affective disorders. Due to the difficulties in accessing the LC in humans, the use of non-invasive techniques is necessary for its study. Evidence in humans, primates, and rodents indicates that variations in pupil size, not induced by changes in lighting, are correlated with alertness, attention, and cognitive processing. In rodents and primates, changes in pupil diameter have been shown to reflect changes in LC neuronal activity. Moreover, nociceptive stimuli evoke pupil dilation alongside LC activation. Therefore, the main objective of this doctoral thesis is to address the study of pupillometry as a reliable, non-invasive, and easily accessible technique to evaluate changes in the activity of the noradrenergic-LC system, given its involvement in the pathophysiology of chronic pain and in the comorbidity of chronic pain with affective disorders such as anxiety or depression.

To achieve this, a new experimental system was developed for use in animal models. This system includes mechanical design, artificial intelligence techniques, and image processing for automatic, binocular measurement of pupil diameter. Additionally, it integrates commercial optogenetic technologies for the selective manipulation of LC activity and the recording of electrophysiological signals (local field potentials). Complementary analysis tools were developed to parametrize the experimental environment, allowing precise and dynamic characterization of the pupillary response through new metrics that capture the magnitude and speed of pupil dilation. All these developments were evaluated with different experimental paradigms, including experiments in healthy animals and those with long term neuropathic pain, to analyze the relationship between LC activity, pupil size, and nociceptive response.

The results confirm that photoactivation using optogenetic techniques of the noradrenergic neurons in the LC can induce a pupillary dilation response in healthy animals, and sexual differences in the pupillary response were observed. Furthermore, these sexual differences in the pupillary response occurred in both healthy animals and neuropathic pain models, and the pupillary response correlated with changes in LC activity in response to nociceptive stimuli, supporting its use as a non-invasive biomarker. The integration of electrophysiological activity measurement allowed for the synchronized recording of LC neuronal activity and pupil dilation, providing a more comprehensive view of the underlying mechanisms.

In conclusion, this work establishes a robust methodology for studying LC activity and its relationship with pain through an indirect biomarker such as the pupillary response. Pupillometry emerges as a promising tool with significant potential for clinical translatability. This multidisciplinary approach, combining neuroscience, biomedical engineering, systems and automation engineering, and artificial intelligence, aims to contribute substantially to understanding the underlying neurobiological mechanisms, which could support the development of new therapeutic approaches.

Índice

Declaración de autoría	vii
Financiación	ix
Agradecimientos	xi
Resumen	xvii
Abstract	xix
Índice	xxi
Índice de figuras	xxv
Índice de tablas	xxxv

CAPÍTULO 1 **1**

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Antecedentes	3
1.1.1. <i>El locus coeruleus y el dolor agudo</i>	5
1.1.2. <i>LC en el dolor crónico y la comorbilidad ansioso-depresiva</i>	7
1.1.2.1. Síntomas sensoriales	7
1.1.2.2. Estudios de los circuitos neuronales involucrados en los síntomas sensoriales	8
1.1.2.3. Activación exógena del LC	9
1.1.2.4. Ansiedad, depresión y síntomas cognitivos	9
1.1.2.5. Circuitos neuronales del LC implicados en ansiedad, depresión y síntomas cognitivos	10
1.1.3. <i>Relación entre el diámetro de la pupila y la actividad en el LC</i>	12
1.2. Motivación	13

CAPÍTULO 2 **15**

2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos generales	17
2.2. Objetivos específicos	17

CAPÍTULO 3 **19**

3. SISTEMA DE REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA PUPILAR EN ROEDORES	21
3.1. Introducción	21
3.1.1. <i>Trabajos recientes</i>	23
3.2. Materiales y métodos	25
3.2.1. <i>Plataforma de pupilometría</i>	25
3.2.2. <i>Software de control del sistema de pupilometría</i>	30
3.2.2.1. Módulo de adquisición de video	31
3.2.2.2. Módulo de análisis de video	32

3.2.3. Método basado en aprendizaje profundo para la segmentación pupilar	32
3.2.3.1. Aprendizaje de transferencia y aumento de datos	34
3.2.3.2. Comparación con otras arquitecturas de referencia	34
3.2.3.3. Validación, pruebas y métricas de evaluación	35
3.2.3.4. Configuración del sistema y detalles de entrenamiento	37
3.2.3.5. Análisis estadístico	37
3.2.3.6. Animales	38
3.2.3.7. Protocolo de estimulación.....	38
3.2.3.8. Conjunto de datos.....	38
3.3. Resultados y Discusión.....	39
3.3.1. <i>Plataforma de pupilometría</i>	39
3.3.2. <i>Software de control</i>	39
3.3.2.2. Adquisición de video	39
3.3.2.3. Análisis de video	41
3.3.3. <i>Evaluación de la segmentación</i>	42
3.3.4. <i>Análisis estadístico</i>	45

CAPÍTULO 4

51

4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PUPILAR ANTE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA DEL LC	53
4.1. Introducción.....	53
4.1.1. <i>Optogenética</i>	53
4.1.1.1. Opsinas en mamíferos	54
4.1.2. <i>Hardware optogenético</i>	56
4.1.2.1. Protocolos optogenéticos usados para la activación de las neuronas noradrenérgicas del LC	57
4.2. Materiales y métodos	60
4.2.1. <i>Animales</i>	60
4.2.2. <i>Vectores virales</i>	60
4.2.2.1. Administración de vectores virales y fibras de optogenética	61
4.2.2.2. Anestesia y condiciones de experimentación	61
4.2.3. <i>Registro y estimulación optogenética</i>	62
4.2.3.1. Pupilómetro	62
4.2.3.2. Subsistema de registro de optogenética.....	62
4.2.3.3. Estimulador de optogenética.....	64
4.2.4. <i>Conjunto de datos</i>	66
4.2.4.1. Estimación del pupilograma	66
4.2.4.2. Procesado del pupilograma	67
4.2.4.3. Segmentación y etiquetado	71
4.2.5. <i>Caracterización de la dinámica del pupilograma</i>	71

4.2.6. <i>Análisis estadístico</i>	74
4.3. Resultados	76
4.3.1. <i>Sincronización optogenética cámaras</i>	77
4.3.2. <i>Registros experimentales</i>	78
4.3.3. <i>Comparación entre ojos y sexo</i>	79
4.3.3.1. <i>Comparativa entre ojos en machos</i>	79
4.3.3.2. <i>Comparativa entre ojos en hembras</i>	83
4.3.4. <i>Comparación entre estimulaciones y sexo</i>	86
4.3.4.1. <i>Comparativa entre estímulos en machos</i>	86
4.3.4.2. <i>Comparativa entre estímulos en hembras</i>	88
4.4. <i>Discusión</i>	90

CAPÍTULO 5

95

5. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA PUPILAR ANTE ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS Y

EVALUACIÓN EN DOLOR CRÓNICO A LARGO PLAZO	97
5.1. <i>Introducción</i>	97
5.2. <i>Materiales y métodos</i>	101
5.2.1. <i>Animales y grupos de estudio</i>	101
5.2.2. <i>Modelo de dolor crónico</i>	101
5.2.2.1. <i>Anestesia y condiciones de experimentación</i>	102
5.2.3. <i>Registro y estimulación</i>	102
5.2.3.1. <i>Pupilómetro</i>	102
5.2.3.2. <i>Protocolo de estimulación</i>	102
5.2.4. <i>Estimación del pupilograma</i>	103
5.2.4.1. <i>Procesado de las series temporales</i>	103
5.2.5. <i>Caracterización de la dinámica del pupilograma</i>	104
5.2.6. <i>Análisis estadístico</i>	104
5.3. <i>Resultados</i>	106
5.3.1. <i>Animales naïve</i>	106
5.3.1.1. <i>Comparativa entre ojos y sexo</i>	106
5.3.1.2. <i>Comparativa entre estimulaciones y sexo</i>	114
5.3.2. <i>Animales con dolor crónico</i>	121
5.3.2.1. <i>Comparativa entre ojos y sexo</i>	121
5.3.2.2. <i>Comparativa entre estimulaciones y sexo</i>	128
5.3.3. <i>Comparativa entre animales naïve y con dolor crónico</i>	134
5.3.3.1. <i>Comparativa entre machos naïve y con dolor crónico</i>	134
5.3.3.2. <i>Comparativa entre hembras naïve y con dolor crónico</i>	137
5.4. <i>Discusión</i>	140
5.4.1. <i>Machos naïve</i>	140
5.4.2. <i>Hembras naïve</i>	142
5.4.3. <i>Machos con dolor crónico</i>	142

5.4.4. Hembras con dolor crónico	143
CAPÍTULO 6	147
<hr/>	
6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL LC Y LA RESPUESTA PUPILAR ANTE ESTÍMULOS	
NOCICEPTIVOS.....	149
6.1. Introducción.....	149
6.1.1. <i>Potenciales de campo locales</i>	150
6.2. Materiales y métodos	152
6.2.1. <i>Animales</i>	152
6.2.2. <i>Anestesia y condiciones de experimentación</i>	153
6.2.3. <i>Electrodo de registro de LFP</i>	153
6.2.4. <i>Registro de LFP en el LC</i>	154
6.2.4.1. <i>Pupilómetro</i>	155
6.2.5. <i>Sincronización entre señales</i>	155
6.2.6. <i>Protocolo de registro simultáneo de los LFP y el diámetro pupilar ante estimulaciones nociceptivas</i>	156
6.2.7. <i>Estimación del pupilograma</i>	156
6.2.7.1. <i>Procesado de las series temporales</i>	156
6.2.8. <i>Procesado y análisis de los LFP</i>	156
6.2.9. <i>Software</i>	158
6.3. Resultados y discusión	158
CAPÍTULO 7	173
<hr/>	
7. DISCUSIÓN	175
CAPÍTULO 8	181
<hr/>	
8. CONCLUSIONES	183
REFERENCIAS	185
<hr/>	
Referencias	187
ANEXOS	207
<hr/>	
Anexo I. Verificación histológica de la técnica de optogenética.....	209
Anexo II. Evaluación conductual	213
Anexo III. Verificación histológica del registro de LFP en el LC.....	217

Índice de figuras

Figura 1. Principales proyecciones de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus [17].	5
Figura 2. Plataforma desarrollada para la monitorización de los cambios en la pupila de pequeños roedores.	30
Figura 3. Flujo de trabajo del sistema.	31
Figura 4. Modelo de la arquitectura de aprendizaje profundo.	33
Figura 5. Estrategia de entrenamiento, validación y prueba. FPN: Red Piramidal de Características. (Cx, Cy): coordenadas del centroide del área segmentada.	36
Figura 6. Imágenes del montaje experimental durante una sesión de laboratorio.	40
Figura 7. Interfaz de usuario de la aplicación de registro.	41
Figura 8. Interfaz de usuario de la aplicación de análisis de video.	42
Figura 9. Comparación entre segmentación pupilar automática y manual. El color rojo muestra el resultado de la segmentación manual (referencia) y el color azul muestra el resultado de la arquitectura propuesta basada en aprendizaje profundo. La intersección de ambas regiones se muestra en color verde. Se indica para cada caso los valores de la intersección sobre unión (IoU) para la región segmentada predicha y el error absoluto medio porcentual (MAPE) para la estimación del diámetro pupilar.	44
Figura 10. Series temporales del diámetro de la pupila (pupilograma) y la circularidad a lo largo de una sesión de grabación de la pupila. Los tiempos $t = PC$, señalan el inicio de eventos consecutivos de compresión de la pata trasera (PC).	45
Figura 11. Diagrama de dispersión de la intersección sobre la unión (IoU) frente al error porcentual relativo medio (MAPE) de los diámetros de pupila estimados en los conjuntos de validación (a) y prueba (b).	46
Figura 12. Diagrama de dispersión de la intersección sobre la unión (IoU) frente al error porcentual relativo medio (MAPE) de la circularidad de pupila estimada en los conjuntos de validación (a) y prueba (b).	47
Figura 13. Diagrama de dispersión del diámetro real de la pupila frente al estimado por el enfoque propuesto.	48
Figura 14. Diagrama de Bland-Altman del diámetro real de la pupila del terreno frente a las estimaciones del enfoque propuesto.	49

Figura 15. Implantación de opsinas en las membranas celulares de neuronas en ratones. Los receptores se activan mediante la utilización de haces de luz de longitudes de onda específicas para cada uno de ellos. En el caso de canales, estos se abren desencadenando el envío de señales excitatorias o inhibitorias regulando la excitabilidad de dicha neurona. ChR2: Canalrodopsinas, una variante de opsina excitatoria con respuesta a la luz azul. NpHR: Halorodopsinas, tipo de opsina inhibitoria con respuesta a la luz amarilla. Arch: Arqueodopsinas, tipo de opsina inhibitoria con respuesta a la luz verde. Figura adaptada de Suarez-Pereira et al., 2022 [143]...... 55

Figura 16. Sistema de coordenadas estereotáxicas de referencia en ratones [26]. 61

Figura 17. Montaje experimental para el registro bilateral de pupila con control de la estimulación optogenética. 63

Figura 18. Descripción de los parámetros que definen una estimulación. 63

Figura 19. Protocolo de estimulación optogenética utilizado. 64

Figura 20. Comparativa del espectro de emisión del Optogenetics-LED-Blue y las opsinas ChR2. Cortesía de Prizmatix [28]. 65

Figura 21. Interfaz desarrollada para el control de la estimulación optogenética en la aplicación de registro de pupilometría. 66

Figura 22. Interfaz desarrollada para la visualización y tratamiento de los datos de pupilometría extraídos de los videos registrados durante las sesiones experimentales. 67

Figura 23. Ruido debido a los movimientos respiratorios del ratón. 69

Figura 24. Discontinuidades debidas a errores en el modelo en la detección del diámetro de la pupila. 69

Figura 25. Artefactos presentes en el pupilograma causados por las medidas de pupila con coordenadas centrales fuera de rango, a causa de los movimientos respiratorios del animal. 70

Figura 26. Comparativa de la respuesta tras el filtrado adicional mediante el filtro de Savitzky-Golay. 70

Figura 27. Ilustración de los índices seleccionados para la caracterización de la respuesta temporal del pupilograma. Se ilustra un comportamiento típico en el pupilograma del ojo izquierdo (verde) y derecho (azul), en respuesta a un estímulo optogenético. 74

Figura 28. Detalle del montaje de la resistencia dependiente de la luz (LDR) para la detección de la aparición de etiquetas en el video. 77

Figura 29. Dispersión del desfase entre la activación optogenética y la aparición de la etiqueta en el video. 78

Figura 30. Pupilograma del registro completo durante una sesión experimental. OD: ojo derecho (trazo verde); OI: ojo izquierdo (trazo morado). 79

- Figura 31.** Respuesta pupilar del grupo de machos tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogenética del locus coeruleus izquierdo. (a) respuesta al primer tren de estímulos (On1) de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos; (b) respuesta al segundo tren de estímulos (On2); (c) respuesta al tercer tren de estímulos (On3). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 80
- Figura 32.** Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de machos tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogenética del LC izquierdo. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos. 81
- Figura 33.** (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en machos para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$ 82
- Figura 34.** Respuesta pupilar del grupo de hembras tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogenética del LC izquierdo. (a) respuesta al primer tren de estímulos (On1) de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos; (b) respuesta al segundo tren de estímulos (On2); (c) respuesta al tercer tren de estímulos (On3). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo..... 83
- Figura 35.** Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de hembras tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogenética del locus coeruleus izquierdo. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos..... 84
- Figura 36.** (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en hembras para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$ 85

Figura 37. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos, para el ojo derecho (a) y el ojo izquierdo (c). Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en machos para el ojo derecho (b) y el ojo izquierdo (d). 86

Figura 38. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras, para el ojo derecho (a) y el ojo izquierdo (c). Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en hembras para el ojo derecho (b) y el ojo izquierdo (d). 89

Figura 39. Vista esquemática del escenario experimental empleado. 103

Figura 40. Respuesta pupilar del grupo de machos naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 107

Figura 41. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de machos naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 108

Figura 42. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en machos naïve para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$ 109

Figura 43. Respuesta pupilar del grupo de hembras naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 111

Figura 44. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de hembras naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 112

- Figura 45.** (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en hembras naïve para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en hembras. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$ 113
- Figura 46.** (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos naïve. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en machos. 117
- Figura 47.** (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras naïve. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en hembras. 120
- Figura 48.** Respuesta pupilar del grupo de machos CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 122
- Figura 49.** Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de machos CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 123
- Figura 50.** (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en machos CCI para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. 124
- Figura 51.** Respuesta pupilar del grupo de hembras CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 125

Figura 52. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de hembras CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 126

Figura 53. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en hembras CCI para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en hembras. 127

Figura 54. (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos CCI. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en machos. 129

Figura 55. (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras CCI. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en hembras. 133

Figura 56. Respuesta pupilar de los grupos de machos tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (c) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (d) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (e) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (f) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (g) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2); (h) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). 135

Figura 57. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. 136

Figura 58. Respuesta pupilar de los grupos de hembras tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (c) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (d) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (e) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (f) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (g) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2); (h) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). 138

Figura 59. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.....	139
Figura 60. Electrodo de registro de bajo coste para registrar el potencial de campo local del cerebro de una rata en movimiento libre [203].....	151
Figura 61. Montaje de sistema de pupilometría integrado al sistema de estereotaxia para el posicionamiento del electrodo de registro de las señales LFP en las coordenadas de cada LC.	153
Figura 62. Representación gráfica del electrodo de registro de LFP consistente en una micropipeta de vidrio rellena de una solución conductora de color azul (2 % de Pontamina Sky Blue disuelta en 0.5 % de acetato sódico) en el cual se inserta un cable de plata conectado al sistema de registro electrofisiológico para la amplificación y filtrado de las señales electrofisiológicas y adquisición de LFP.	154
Figura 63. Interfaz de registro de pupilometría (izquierda) y pantalla mostrando el registro electrofisiológico a través del software Spike2 (Cambridge Electronic Design) en el equipo secundario (derecha).	155
Figura 64. Interfaz en MATLAB desarrollada para el procesado de las señales de potenciales de campo locales registradas en las sesiones experimentales.	159
Figura 65. Representación temporal de las señales ante la estimulación D_1 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.....	160
Figura 66. Representación temporal de las señales ante la estimulación D_2 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.....	161
Figura 67. Representación temporal de las señales ante la estimulación I_1 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.....	162

- Figura 68.** Representación temporal de las señales ante la estimulación I_2 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos. 163
- Figura 69.** Representación temporal de las señales ante la estimulación D_1 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos. 164
- Figura 70.** Representación temporal de las señales ante la estimulación D_2 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos. 165
- Figura 71.** Representación temporal de las señales ante la estimulación I_1 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos. 166
- Figura 72.** Representación temporal de las señales ante la estimulación I_2 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos. 167

- Figura 73.** Densidad espectral de potencia estimada en la señal LFP (potenciales de campo locales) registrada en el LC izquierdo en los 10 segundos posteriores al estímulo nociceptivo referida a los 10 segundos anteriores. Se ilustra la ratio para cada estímulo y banda espectral. D₁: primera estimulación nociceptiva en la pata derecha; D₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata derecha. I₁: primera estimulación nociceptiva en la pata izquierda; I₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata izquierda. 168
- Figura 74.** Relación entre la densidad espectral de potencia estimada en la señal LFP (potenciales de campo locales) registrada en el LC derecho en los 10 segundos posteriores al estímulo nociceptivo respecto de los 10 segundos anteriores. Se ilustra la ratio para cada estímulo y banda espectral. D₁: primera estimulación nociceptiva en la pata derecha; D₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata derecha. I₁: primera estimulación nociceptiva en la pata izquierda; I₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata izquierda. 169
- Figura 75.** Expresión del vector viral de optogenética en el LC. Imagen representativa de la expresión del gen reportero (fluorescencia verde) del vector viral para optogenética en las células del LC izquierdo de un animal. 4V, cuarto ventrículo; LC, locus coeruleus. 211
- Figura 76.** Evaluación nociceptiva y de la conducta de tipo depresiva en machos y hembras. Umbral nociceptivo de las patas derecha e izquierda de los grupos CCI machos (a) y CCI hembras (c) en la prueba de von Frey; tiempo de inmovilidad en la prueba TST para los grupos naïve y CCI machos (b) y naïve y CCI hembras (d). *p<0.05, ***p<0.001 T-test no pareado. 216
- Figura 77.** Verificación histológica del registro electrofisiológico en el LC. Imagen representativa de la correcta localización del electrodo de registro en el LC derecho e izquierdo, observándose en un corte coronal el rastro y lesión que dejaron los electrodos durante el registro en el LC derecho (LCd) e izquierdo (LCi) de un animal. 4V, cuarto ventrículo. 219

Índice de tablas

Tabla 1. Aspectos generales de los estudios recientes realizados para evaluar la función del locus coeruleus usando registros de pupilometría. LC-NA: locus coeruleus sistema noradrenérgico.....	26
Tabla 2. Hardware, métodos y resultados en los estudios recientes realizados para evaluar la función del locus coeruleus (LC) usando registros de pupilometría (I).	27
Tabla 3. Parámetros de configuración utilizados para la adquisición de imágenes durante las sesiones experimentales.	31
Tabla 4. Comparativa del rendimiento de la arquitectura propuesta y las referencias en los conjuntos de validación y prueba. IoU: Intersección sobre la Unión. MAPE PD: Error absoluto medio porcentual del diámetro pupilar. MAPE PC: Error absoluto medio porcentual de la circularidad de la pupila. MAPE Cx: Error absoluto medio porcentual de la coordenada X del centroide. MAPE Cy: Error absoluto medio porcentual de la coordenada Y del centroide.....	43
Tabla 5. Parámetros de filtrado del pupilograma.	68
Tabla 6. Desfase entre la activación de la señal cuadrada enviada por el generador de estímulos y el cambio en pantalla medido por la resistencia dependiente de la luz (LDR).	78
Tabla 7. Promedios para cada ojo, estimados en machos, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a la estimulación optogenética del LC. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.....	80
Tabla 8. Promedios para cada ojo estimados en hembras para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a la estimulación optogenética del LC. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media. OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.....	85
Tabla 9. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.	87

Tabla 10. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). On _i : Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.	88
Tabla 11. Promedios para cada ojo, estimados en machos naïve, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). Ol: ojo izquierdo; Od: ojo derecho; D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.....	109
Tabla 12. Promedios para cada ojo, estimados en hembras naïve, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). Ol: ojo izquierdo; Od: ojo derecho; D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.....	113
Tabla 13. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos naïve. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.	116
Tabla 14. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras naïve. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.	119
Tabla 15. Promedios para cada ojo, estimados en machos CCI, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). Ol: ojo izquierdo; Od: ojo derecho; D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.....	124
Tabla 16. Promedios para cada ojo, estimados en hembras CCI, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). Ol: ojo izquierdo; Od: ojo derecho; D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.....	127
Tabla 17. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos CCI. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.	130
Tabla 18. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras CCI. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D _i : Estimulación pata derecha; l _i : estimulación pata izquierda.	132

Tabla 19. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre los grupos naïve y CCI por ojo en machos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda. 134

Tabla 20. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre los grupos naïve y CCI por ojo en hembras. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda. 137

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El dolor constituye una vivencia subjetiva adversa que incorpora un componente sensorial y emocional, actuando como una señal de alarma para el organismo sobre un riesgo real o potencial para la integridad de los tejidos [1].

Para cumplir su función, el dolor debe ser aversivo y generar estrés. De esta forma, si la respuesta al estrés tiene como objetivo principal movilizar recursos energéticos para afrontar las demandas específicas de una situación, en el caso del dolor, esta respuesta se orienta específicamente a proteger la zona dañada y prevenir un mayor daño. Sin embargo, cuando se vuelve crónico, el dolor supera el periodo normal de curación y deja de ser protector [2].

Se ha observado que el dolor crónico se relaciona con frecuencia a trastornos vinculados al estrés, lo cual es particularmente significativo considerando que se estima que afecta entre el 20% y el 30% de la población adulta en Europa y los Estados Unidos [3], [4]. Más de la mitad de estas personas sufren de depresión y ansiedad comórbidas [5]. En psiquiatría, las consultas asociadas con el dolor son notablemente diversas y se reportan en un 15% a 100% de los pacientes con depresión [6], y en un 50% a 90% de aquellos con trastornos de ansiedad [7], [8].

Se estima que aproximadamente un 30% de la población de la Unión Europea sufrirá algún tipo de trastorno mental en algún momento de su vida. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, el impacto económico de las enfermedades psiquiátricas sobrepasa al de la combinación de cáncer y enfermedades cardiovasculares, constituyendo además el principal factor de riesgo para el suicidio. Es complejo determinar si es el dolor el que da lugar a estados emocionales alterados o si, por el contrario, el trastorno afectivo predispone al desarrollo del dolor [9]. Sin embargo, esta interdependencia forma un círculo vicioso que intensifica los efectos adversos de cada uno por separado, muchas veces haciendo que el proceso de tratamiento sea más complejo y produciendo resultados indeseables [10].

Aunque esta comorbilidad está bien documentada clínicamente, los mecanismos que subyacen aún no se comprenden en su totalidad. Los modelos animales preclínicos tienen un alto valor traslacional en este contexto, ya que permiten controlar variables que son más complejas o inalcanzables en humanos. Estos modelos ofrecen significativas ventajas al permitir la investigación de los mecanismos subyacentes a estas patologías y al determinar dónde y cómo operan estos trastornos. Estudios anteriores han tenido éxito en demostrar modelos animales de dolor crónico que muestran fenotipos relacionados con la ansiedad y la depresión, imitando las condiciones experimentadas por los pacientes y proporcionando herramientas experimentales útiles para la investigación [11], [12], [13], [14].

Por ejemplo, animales con dolor neuropático persistente durante cuatro semanas, inducido por una lesión nerviosa (constricción crónica del nervio ciático, *Chronic Constriction Injury* o CCI en inglés), desarrollaron una incapacidad para enfrentar situaciones estresantes, lo que llevó a una conducta depresiva y ansiosa que fue incluso más intensa que la aversión asociada con el dolor [15].

Por otro lado, la evidencia experimental preclínica indica que el estrés crónico está relacionado con cambios en la sensibilidad al dolor en modelos animales, enfatizando el círculo vicioso entre ambas condiciones [11]. Por lo tanto, se hace necesario continuar con el trabajo de caracterización de estos modelos animales para representar de manera más adecuada la heterogeneidad de la enfermedad observada en seres humanos. Una vez caracterizados, estos modelos permitirán investigar con mayor precisión los mecanismos subyacentes.

La investigación del núcleo noradrenérgico locus coeruleus (LC) como centro crucial en la transmisión de estímulos nociceptivos y en la ansiedad causada por el dolor será el foco de esta tesis doctoral, que tiene en cuenta los hallazgos de investigaciones previas del Grupo de Investigación en Neuropsicofarmacología y Psicobiología (CTS-510) de la Universidad de Cádiz a través de modelos en roedores.

El objetivo es desarrollar herramientas que faciliten la búsqueda de biomarcadores no invasivos para la evaluación objetiva del dolor tanto de forma aguda como crónica asociada a la comorbilidad con sintomatología psiquiátrica. Así, se propone que la dilatación de la pupila podría ser un correlato no invasivo de la activación del LC y su acción analgésica.

1.1.1. El locus coeruleus y el dolor agudo

El dolor agudo presenta una duración breve y se resuelve gradualmente a medida que los tejidos dañados se recuperan, constituyendo así una herramienta de utilidad fisiológica para proteger nuestro organismo frente a lesiones tisulares reales o potenciales.

El locus coeruleus (LC, **Figura 1**) es una estructura que recibe entradas nociceptivas ascendentes periféricas desde la médula espinal (SC, del inglés *Spinal Cord*) a través del núcleo paragigantocelular [16], y proyecta hacia otras estructuras del sistema nervioso central, incluidos el tálamo, el hipocampo, la amígdala, y la corteza prefrontal (PFC, del inglés *Prefrontal Cortex*).

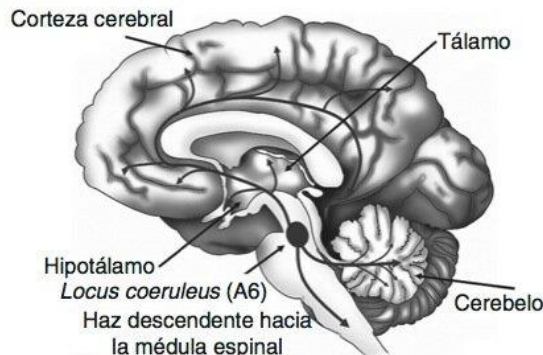


Figura 1. Principales proyecciones de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus [17].

Los axones descendentes del LC también se dirigen a la SC y al bulbo raquídeo, en conjunto con axones de las regiones A5 y A7 (subcoeruleus) [18], [19], de tal manera que la influencia del LC en el dolor es atribuible a su acción en diferentes niveles. Numerosas investigaciones sugieren que un proceso de retroalimentación, que involucra inflamación, daño nervioso y estímulos nocivos agudos, activa el LC e inhibe el dolor [20], [21], [22]. Por consiguiente, las lesiones y la inactivación farmacológica o quimiogénica del LC exacerbaban las respuestas al dolor en diversas condiciones de dolor a corto plazo, lo que indica mayor sensibilidad al dolor cuando se producen alteraciones en el circuito normal LC-noradrenérgico [23], [24], [25].

Esta actividad analgésica se atribuye principalmente al LC ipsilateral al sitio del estímulo doloroso [24], [25], [26], [27], y parece estar mediada por la activación de la vía descendente del LC hacia la SC, que incrementa la liberación de noradrenalina, contribuyendo así al bloqueo de las entradas nociceptivas ascendentes [24], [28].

La noradrenalina liberada desde las vías descendentes en el asta dorsal de la médula espinal suprime el dolor mediante la influencia inhibitoria de los adrenerreceptores α_2A sobre las terminales de los nociceptores aferentes primarios (inhibición presináptica), así como por la acción α_2 -adrenérgica directa sobre las neuronas de relevo del dolor (inhibición postsináptica) y la activación mediada por adrenerreceptores α_1 de interneuronas inhibitorias [29], [30]. El estímulo nociceptivo agudo activa el LC, lo que se evidencia mediante hiperexcitabilidad electrofisiológica y niveles incrementados de los marcadores de actividad celular *c-fos* o ERK1/2 fosforilada (quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares) [31], [32], [33]. Adicionalmente, puede observarse dilatación pupilar en humanos y roedores [34], fenómeno análogo a otras modalidades de estrés [35], [36].

La activación quimiogénica del LC induce un estado ansiógeno y de vigilancia similar a la respuesta natural al estrés [37], [38], mientras que la activación específica de la vía LC \rightarrow PFC resulta aversiva y ansiogénica [28]. De este modo, el dolor conlleva una dimensión afectiva-cognitiva que conduce al individuo afectado a la activación de un aprendizaje emocional adaptativo y dinámico.

Los experimentos cognitivos han contribuido a estudiar el impacto del dolor como estímulo incondicionado (descargas eléctricas) y de una señal sensorial (tono) como estímulo en el condicionamiento del miedo pavloviano. La inhibición optogénica global de las neuronas del LC evidenció que su activación aversiva tiene protagonismo en el aprendizaje del miedo condicionado, mientras que la actividad del LC durante el período del estímulo condicionado es relevante para la extinción del miedo [39]. Además, el registro electrofisiológico de neuronas del LC in vivo durante el aprendizaje del miedo y la extinción implica poblaciones diferenciadas de neuronas que reaccionan a señales sensoriales predictivas durante estos procesos (los grupos proyectantes hacia la amígdala basolateral y corteza prefrontal infralímbica, respectivamente). Esta disociación funcional del LC demuestra su participación diversa en modelos de aprendizaje y extinción del miedo, lo

que promueve una flexibilidad conductual. Se ha observado que ambas poblaciones neuronales del LC (neuronas de miedo y de extinción) exhiben una elevada actividad frente a estímulos dolorosos intensos [39], lo que parece indicar que el LC se activa de forma global ante estímulos aversivos intensos y codifica discretamente procesos cognitivos relacionados [40].

Otros estudios quimiogénéticos han evidenciado un incremento de las respuestas de inmovilización (*freezing*) ante señales condicionadas aversivas mediadas por la activación del LC, lo que indica que las proyecciones del LC hacia la amígdala central son esenciales para la expresión de respuestas defensivas inducidas por amenazas condicionadas [40].

En conclusión, el dolor agudo constituye un potente desencadenante de las respuestas al estrés mediadas por el LC, produciendo analgesia endógena a través de la médula espinal, mientras que la información ascendente propicia la aversión, la vigilancia y la detección de amenazas.

1.1.2. LC en el dolor crónico y la comorbilidad ansioso-depresiva

El dolor crónico se define como aquel que persiste más allá del tiempo normal de curación [41]. En estos casos, el dolor deja de ser un síntoma para convertirse en un trastorno complejo, caracterizado por síntomas sensoriales, cognitivos y afectivos que, en muchos casos, coinciden con trastornos ansioso-depresivos. Un tipo común de dolor crónico es el dolor neuropático, causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial, como la neuralgia posherpética, la neuralgia del trigémino, la radiculopatía dolorosa, la neuropatía diabética, infecciones por VIH, lepra, amputación, lesión del nervio periférico o accidente cerebrovascular. Además de actuar sobre otras estructuras, muchos de los fármacos utilizados para tratar el dolor neuropático tienen acción a nivel del LC (p. ej., duloxetina, venlafaxina, pregabalina) [42], [43].

1.1.2.1. Síntomas sensoriales

La transición del dolor agudo al crónico implica la activación y desactivación dinámica de mediadores proalgésicos y analgésicos. A diferencia del dolor agudo, las alteraciones del LC en el dolor crónico son más difíciles de definir; por ello, se han propuesto diferentes roles para el LC, incluyendo funciones analgésicas, proalgésicas o falta de función en el dolor crónico [44]. Estas discrepancias pueden deberse a las dinámicas

temporales de la neuroplasticidad, que varían entre los modelos animales de dolor, y a las diferencias reportadas en las vías noradrenérgicas del dolor entre cepas [45], [46], [47]. La mayoría de las evidencias actuales sugieren que el LC no produce analgesia endógena y que, por el contrario, puede incluso actuar como un generador de dolor en condiciones crónicas. La destrucción selectiva de neuronas noradrenérgicas parece atenuar el dolor neuropático a largo plazo en ratas Sprague Dawley [48], [49]. En esta misma cepa, la administración de lidocaína en el LC contralateral a la lesión reduce el dolor evocado, mientras que su administración en el LC ipsilateral no modifica la hipersensibilidad sensorial [48]. Por otro lado, el bloqueo del LC (ipsi- o contralateral) mediante técnicas quimiogénicas basada en DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) o lidocaína no altera la hipersensibilidad sensorial en ratas Long-Evans [24], [25], lo que sugiere que existe una actividad pronociceptiva lateralizada del LC asociada al dolor crónico en ratas Sprague Dawley, pero no en ratas Long-Evans.

1.1.2.2. Estudios de los circuitos neuronales involucrados en los síntomas sensoriales

En la médula espinal se ha descrito una menor expresión de dopamina beta-hidroxilasa en ratas Long-Evans y Wistar con dolor crónico a largo plazo [24], [50], lo que sugiere una pérdida de inervación noradrenérgica. En consecuencia, la inhibición quimiogénica no modifica la actividad LC → SC en ratas Long-Evans con dolor crónico [24]. Sin embargo, otras proyecciones proalgésicas del LC parecen activarse, al menos en algunas cepas de ratas (Sprague Dawley y Wistar). Así, la expresión de CREB fosforilado (proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc) está aumentada en el núcleo reticular dorsal contralateral (DRt) de las ratas Sprague Dawley [25], una región facilitadora del dolor [51]. Asimismo, una atenuación persistente de las respuestas al dolor se observa cuando los niveles de noradrenalina en esta área son reducidos [52]. La inhibición mediada por DREADDs de las neuronas del LC que proyectan al DRt produce alivio del dolor [25], y la microinyección de un antagonista de los adrenorreceptores α_1 , pero no de un antagonista de los α_2 , reduce la hipersensibilidad inducida por lesión nerviosa [52]. Esto sugiere que el LC puede ejercer un efecto pronociceptivo indirecto a través de sus proyecciones al DRt actuando sobre los adrenorreceptores α_1 .

1.1.2.3. Activación exógena del LC

También se ha reportado la activación exógena del LC mediante quimio/optogenética. La activación quimiogenética del LC completo o de su proyección hacia la SC consistentemente reduce la hipersensibilidad sensorial en cualquier punto temporal tras una lesión nerviosa [24]. En contraste, una activación similar de la proyección del LC hacia la PFC exagera el dolor espontáneo sin modificar el dolor evocado [28]. Estos estudios quimiogenéticos coinciden con datos farmacológicos previos obtenidos con el inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina reboxetina, cuya administración intratecal aguda suprime los comportamientos dolorosos (alivia el dolor evocado e induce preferencia de lugar condicionada). La administración sistémica aguda de reboxetina también alivia el dolor evocado, aunque resultó aversiva en el paradigma de preferencia de lugar condicionado [53]. Por lo tanto, es probable que el efecto beneficioso de la noradrenalina en la SC se vea contrarrestado por la activación de otras proyecciones supraespinales del LC. Esto podría explicar la eficacia limitada de los fármacos antineuropáticos y por qué los enfoques noradrenérgicos suelen combinarse con otros, como el uso de serotonina (duloxetina, venlafaxina) u opioides (tramadol, tapentadol), para tratar el dolor o la comorbilidad dolor-depresión [54], [55].

1.1.2.4. Ansiedad, depresión y síntomas cognitivos

La hipersensibilidad sensorial aparece inmediatamente después de una lesión nerviosa, mientras que los síntomas ansioso-depresivos y cognitivos surgen semanas después (entre 3 y 8 semanas, dependiendo de la especie y el modelo animal) [14], [56]. Por lo tanto, el principal fenotipo tras 1 o 2 semanas de dolor (dolor a corto plazo) es la hipersensibilidad sensorial, mientras que, a mayor tiempo, el dolor coexiste con síntomas emocionales y cognitivos (dolor a largo plazo). La relevancia de estos síntomas emocionales se evidencia en la prueba de evitación de plaza, en la que los animales deben elegir entre un área blanca ansiogénica donde reciben un estímulo nociceptivo en la pata sana o un área oscura no ansiógena, donde reciben un estímulo nociceptivo en el miembro con lesión nerviosa. Los animales con una semana de dolor pasan más tiempo en el área blanca ansiogénica, mientras que aquellos con 4 semanas de dolor la evitan. Dado que ambos grupos tienen umbrales de dolor similares, parece que la aversión asociada con la ansiedad cambia a medida que el dolor persiste [15].

En animales con dolor a largo plazo, las alteraciones en el desempeño cognitivo incluyen déficits de atención y memoria de trabajo, así como un aumento en el aprendizaje y la memoria emocional aversiva [57]. Estos animales muestran déficits en atención visual, aprendizaje y memoria de reconocimiento visoespacial en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos y en la prueba de separación de patrones de objetos [58]. Aunque los animales con dolor a largo plazo adquieren el condicionamiento del miedo de manera similar a los animales de control [59], presentan más frecuentemente conductas de inmovilización (*freezing*) en la fase de condicionamiento, desarrollando respuestas de miedo más intensas y tempranas frente a estímulos aversivos [58]. Además, estos animales siguen mostrando inmovilización en un contexto no condicionado, lo que sugiere una incapacidad para extinguir el miedo contextual [60]. Así, el dolor a largo plazo parece generar un sesgo cognitivo que afecta el procesamiento de estímulos aversivos más que neutros, probablemente manteniendo un estado de ansiedad similar al observado en los trastornos de ansiedad relacionados con la patología en humanos [61]. Esta comorbilidad también se ha observado en modelos de fibromialgia y dolor inflamatorio crónico [62], [63].

1.1.2.5. Circuitos neuronales del LC implicados en ansiedad, depresión y síntomas cognitivos

Una estructura que proyecta hacia el LC y está implicada en las emociones es la corteza cingulada anterior (ACC) [64]. En pacientes con depresión se ha registrado hiperactividad en la ACC [65], que también está relacionada con las consecuencias ansioso-depresivas inducidas por el dolor crónico [66]. Además, se ha asociado un aumento bilateral de noradrenalina en la PFC en dolor crónico a largo plazo [67], lo que sugiere una sobreactivación del sistema noradrenérgico. Una mayor expresión del marcador de actividad celular *c-fos* se encontró en las neuronas del LC que proyectan hacia la ACC, y el bloqueo de estas neuronas mediante DREADDs revierte completamente el comportamiento depresivo, como la desesperanza conductual en la prueba de natación forzada [24]. El bloqueo farmacológico específico en esta región indica que los adrenorreceptores α_1 y α_2 en la ACC son necesarios para este comportamiento [24]. Por otro lado, la microinyección de un antagonista de los adrenorreceptores α_1 en la PFC medial atenúa la hipersensibilidad sensorial en algunos modelos de dolor neuropático [49], aunque no en otros [24], sugiriendo posibles beneficios terapéuticos al dirigir estos receptores α_1 .

Al evaluar el efecto de la activación quimiogénica del LC, se observa una interrupción rápida de los comportamientos en curso (menor actividad motora y actividad exploratoria) y ansiedad, acompañado de un aumento de la conectividad funcional en redes salientes, incluyendo la ACC y la amígdala [37]. Esto sugiere que una mayor activación de estas dos vías podría subyacer a los síntomas de ansiedad asociados con el dolor. Consistentemente, la activación quimiogénica de la proyección del LC hacia la PFC (donde se encuentra la ACC) incrementa la ansiedad en ratas con lesiones nerviosas [28]. Tanto la ansiedad inducida por el dolor a largo plazo como el incremento del aprendizaje del miedo se eliminan al bloquear la vía LC → BLA (amígdala basolateral) o mediante la administración intra-BLA de un antagonista de los receptores β adrenérgicos [58]. Este efecto beneficioso también se encuentra al administrar bloqueantes β de forma sistémica, lo que podría abrir nuevas opciones de intervención para tratar la comorbilidad entre dolor y ansiedad. La activación quimiogénica de esta vía tiene efectos menores, lo que podría reflejar un nivel de activación ya elevado en el dolor a largo plazo [58]. Así, el dolor aumentaría la noradrenalina en la BLA, potenciando el aprendizaje de eventos negativos.

Los estudios anteriormente mencionados se han realizado en roedores machos. Dado que el LC es sexualmente dimórfico [68], [69], [70], sería importante considerar las diferencias de sexo. El LC en hembras es más grande, contiene más neuronas [70] y presenta una arborización dendrítica más extensa y compleja [68], [69], además de que se ha confirmado dimorfismo sexual en la expresión génica [71]. A pesar de los datos epidemiológicos que muestran una mayor incidencia de dolor y patologías afectivas en mujeres [72], [73], un estudio reciente encontró que, aunque los ratones macho y hembras con lesiones nerviosas desarrollaron hipersensibilidad sensorial, solo los machos mostraron comportamientos similares a la ansiedad en el largo plazo [74]. La inhibición quimiogénica sostenida de las proyecciones del LC hacia el giro dentado del hipocampo indujo comportamiento ansiógeno y redujo la neurogénesis hipocampal en ratones hembra [74], mientras que la activación sostenida de estas proyecciones previno la ansiedad e incrementó la neurogénesis hipocampal en machos neuropáticos. Por lo tanto, una disminución de la actividad del LC hacia el hipocampo podría desencadenar ansiedad inducida por el dolor en roedores machos.

1.1.3. Relación entre el diámetro de la pupila y la actividad en el LC

Pruebas sólidas de estudios realizados con humanos, primates no humanos y roedores indican que las variaciones del tamaño de las pupilas no inducidas por cambios en la iluminación están correlacionadas con el nivel de alerta, la atención y el procesamiento cognitivo [75], [76], [77], [78]. Evidencias recientes en primates y roedores han demostrado que los cambios en el diámetro de la pupila pueden reflejar la actividad neuronal en el LC [79], [80]. De hecho, la estimulación eléctrica, mediante técnicas de optogenética o quimiogenética del LC provoca una dilatación de la pupila [37], [80], [81] que muestra diferentes dinámicas (graduales o rápidas) dependiendo de si el modo de activación es tónico o fásico, respectivamente [79]. Asimismo, el estímulo nociceptivo evoca una respuesta de dilatación de la pupila [82] junto con la activación del LC [37].

Así pues, un pico de actividad noradrenérgica precede a la dilatación de la pupila [79], [80]. Estos efectos se observan en la actividad electrofisiológica espontánea y evocada (espigas o potenciales de acción) y en los potenciales de campo local (LFP, del inglés *Local Field Potentials*) del LC.

Por lo tanto, es probable que la pupila pueda utilizarse para seguir con sensibilidad la actividad en el sistema noradrenérgico-LC.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la activación simpática está correlacionada con la activación del LC y la dilatación de la pupila evocada [79]. Ello proporciona un vínculo teórico para estudiar una posible relación entre los cambios de actividad del LC descritos en el dolor crónico a largo plazo, cuando este coexiste con síntomas ansiodepresivos, y la respuesta de la pupila. En la bibliografía actualmente disponible no existe un consenso sobre la disposición de estos elementos, su forma o características [37], [80], [81], [82], [83], [84], [85].

En este contexto, esta tesis doctoral profundizará en la hipótesis de que la pupilometría puede ser una técnica no invasiva y de gran potencial traslacional útil para evaluar la actividad del LC en condiciones tanto normales como patológicas.

1.2. MOTIVACIÓN

La elección de este objetivo se fundamenta en varias razones sólidas que destacan su relevancia científica, su carácter multidisciplinar y su alineación estratégica con las prioridades de investigación actuales.

En primer lugar, desde un punto de vista científico, este tema aborda un ámbito de gran interés y pertinencia dentro del campo de la neurociencia aplicada. La comprensión y aplicación de principios neurocientíficos para mejorar diagnósticos, tratamientos y estrategias terapéuticas responde a necesidades urgentes en el ámbito de la salud.

Además, la multidisciplinariedad y la innovación son aspectos clave de este proyecto, que se caracteriza por la convergencia de diversas disciplinas. En este sentido, integra enfoques de la ciencia cognitiva, la neurofisiología, la bioingeniería y la ingeniería electrónica y de sistemas, aprovechando los avances en cada campo para ofrecer soluciones innovadoras.

Por otro lado, la colaboración interdisciplinar consolidada es un elemento esencial de esta investigación. El proyecto fomenta la sinergia entre investigadores del Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz (INiBICA). Por un lado, el Grupo de Investigación en Neuropsicofarmacología y Psicobiología (CTS-510) de la Universidad de Cádiz aporta su amplia experiencia en la investigación del dolor y del sistema noradrenérgico-locus coeruleus, centrándose en las bases biológicas y neuroquímicas del proyecto. Por otro lado, el Grupo de Investigación en Bioingeniería, Automática y Robótica (ATARI) de la Universidad de Cádiz, al que pertenece el autor de esta Tesis Doctoral, contribuye con su experiencia en bioingeniería, inteligencia artificial aplicada a la salud y análisis avanzado de señales e imágenes biomédicas.

Asimismo, este trabajo tiene un impacto clínico y social significativo, ya que aborda un área de gran vigencia dentro de la neurociencia aplicada con el potencial de generar avances relevantes en el diagnóstico y tratamiento de pacientes. Además, busca adquirir conocimiento sobre las bases biológicas implicadas, lo que podría derivar en el desarrollo de enfoques terapéuticos novedosos y más efectivos.

Finalmente, esta investigación se encuentra alineada estratégicamente con las prioridades establecidas por la estrategia internacional, nacional, y autonómica de I+D+i, al centrarse en un área de interés fundamental para la salud pública.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Al comienzo de esta Tesis Doctoral, se establecieron dos objetivos generales y varios objetivos específicos para abordar la hipótesis general de establecer si la pupilometría, como técnica no invasiva, podría suponer un biomarcador fidedigno y fácilmente accesible de los cambios en la actividad del sistema noradrenérgico-LC, con gran potencial de traslacionalidad clínica, dada su implicación en la fisiopatología del dolor crónico y en la comorbilidad dolor crónico-trastornos afectivos como la ansiedad o la depresión.

2.1. OBJETIVOS GENERALES

1. Diseñar e implementar un sistema de uso en roedores para el registro sincronizado y el análisis de información fisiológica diversa incluyendo el diámetro de la pupila en ambos ojos y la actividad electrofisiológica, todo ello acoplado a un sistema de estimulación optogenética, que permite la manipulación selectiva de la actividad de áreas cerebrales de interés.
2. Evaluar la relación entre la actividad del LC y el diámetro pupilar mediante técnicas de optogenética y electrofisiología acopladas al registro de pupilometría.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar estos objetivos generales, amplios y ambiciosos, se propuso el siguiente conjunto de objetivos específicos:

1. Desarrollar herramientas para la experimentación y registro de datos en laboratorio:
 - a) Diseñar y desarrollar un sistema de registro de imágenes de pupila y de estimación del diámetro de esta mediante técnicas de tratamiento digital de la señal, inteligencia artificial, e instrumentación virtual.
 - b) Completar el sistema desarrollado en a) con un subsistema de estimulación optogenética (por fibra óptica implantada en el LC) y un subsistema de adquisición de señales electrofisiológicas para registrar los potenciales de campo local (LFP) en el LC.
2. Comprobar si la fotoactivación de las neuronas noradrenérgicas del LC, mediante el uso un subsistema optogenético es capaz de producir una

respuesta de dilatación pupilar en animales sanos. Evaluar las posibles diferencias sexuales en la respuesta pupilar.

3. Estudiar la correlación del tamaño de la pupila con la actividad del LC, evaluando los cambios en la pupila tras la activación del LC en respuesta a estímulos nociceptivos en animales sanos y en animales con dolor neuropático a largo plazo, y analizando posibles diferencias entre sexos.
4. Estudiar la correlación del tamaño de la pupila con la actividad del LC y la estimulación nociceptiva, evaluando la respuesta pupilar ante la estimulación nociceptiva y realizando el registro simultáneo de la actividad electrofisiológica (LFP) en animales sanos.

CAPÍTULO 3

SISTEMA DE REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA PUPILAR EN ROEDORES

3. SISTEMA DE REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA PUPILAR EN ROEDORES

3.1. INTRODUCCIÓN

Evidencias sólidas de estudios en humanos, primates y roedores indican que las variaciones en el tamaño pupilar, no inducidas por cambios en la iluminación, están correlacionadas con la excitación, la atención y el procesamiento cognitivo [75], [76], [77], [78], [85]. Más específicamente, estudios recientes en primates y roedores han demostrado que los cambios en el diámetro pupilar pueden reflejar la actividad neuronal del LC [80], [81], [86], [87].

El núcleo noradrenérgico LC es una estructura del tronco encefálico y la principal fuente de norepinefrina/noradrenalina que participa en la modulación de la excitación, la atención, la formación de la memoria, y la respuesta al estrés o el dolor, entre otros procesos cerebrales [18], [88], [89], [90]. Los cambios en la funcionalidad del LC se han asociado con varios trastornos neurodegenerativos y neuropsiquiátricos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el dolor crónico [11], [15], [18], [91], [92]. En el campo del dolor, se ha puesto relieve la implicación, en modelos animales, del LC en los mecanismos subyacentes a la comorbilidad entre el dolor crónico y los trastornos del estado de ánimo. Ello ha estimulado la necesidad de estudiar el papel del LC como un centro crítico para los trastornos ansio depresivos inducidos por el dolor crónico [13], [18], [58]. En cuanto a las patologías neurodegenerativas, el LC es una de las primeras estructuras cerebrales en sufrir degeneración. Por lo tanto, la evaluación de la actividad del LC es de gran interés como posible biomarcador temprano de enfermedades neurodegenerativas, incluidas las enfermedades de Alzheimer y Parkinson [92], [93].

En este contexto, el estudio del LC utilizando modelos de roedores es un tema de gran interés. No obstante, la dificultad de registrar señales electrofisiológicas de un núcleo tan pequeño (1500 neuronas por hemisferio en roedores) ubicado en la región pontina del cerebro, hace que la realización de estudios sea un desafío, tanto en animales como en humanos [82], [89], [94]. En este sentido, la monitorización del diámetro pupilar podría ser una evaluación adecuada de la función del LC, ya que se ha descrito como cambios en la actividad del LC medidos por imagen por

resonancia magnética funcional se correlacionan con las fluctuaciones del tamaño pupilar [87]. La relación causa-efecto entre la activación del LC y el tamaño pupilar ha sido evidenciada recientemente por hallazgos que indican que la estimulación del LC, mediante impulsos eléctricos, técnicas optogenéticas o herramientas quimiogenéticas basadas en receptores diseñados activados exclusivamente por drogas diseñadas (DREADDs), provoca la dilatación pupilar [37], [79], [80], [81], [82]. Además, se ha demostrado que un estímulo nocivo evoca la dilatación pupilar, junto con la activación del LC [79], lo que sugiere una posible utilidad clínica para pacientes que sufren dolor. Sin embargo, cabe señalar que el tamaño pupilar no solo se ve afectado por el sistema noradrenérgico-LC, sino también por otros sistemas de neurotransmisores, como el sistema colinérgico [80], y los cambios en el tamaño pupilar deben interpretarse con cautela.

En la actualidad, la pupilometría es la única técnica no invasiva disponible que podría usarse como un biomarcador confiable y fácilmente accesible en tiempo real de los cambios en la actividad *in vivo* del sistema noradrenérgico-LC, con gran potencial para la traslacionalidad clínica. Como tal, varios estudios han evaluado las fluctuaciones pupilares como un reflejo de la actividad del sistema noradrenérgico-LC, para estudiar su implicación en tareas cognitivas [95], rendimiento de la memoria [96], enfermedad de Alzheimer [97] y trastorno de estrés postraumático [98]. Sin embargo, aunque es común encontrar estudios que utilizan la pupilometría como técnica para la evaluación de la actividad del LC en humanos, la aplicación de esta técnica a la investigación preclínica en roedores aún no está muy extendida [97]. Todo ello a pesar de la evidencia de que la pupilometría puede proporcionar una evaluación *in vivo* útil de la función del LC en roedores despiertos o anestesiados [99], [100].

Además, en la literatura científica reciente, hay una falta de consenso sobre las especificaciones técnicas de algunos componentes utilizados para la grabación de imágenes o la colocación del animal y las cámaras, con estudios que utilizan diferentes tecnologías de visión, tamaños de imagen, tasas de fotogramas y fuentes de luz [37], [79], [80], [82], [84], [100], [101]. Recientemente, se han realizado esfuerzos por proponer protocolos comunes, presentando procedimientos que describen como realizar grabaciones pupilométricas en la oscuridad y como evaluar la modulación del sistema noradrenérgico-LC en ratones despiertos y anestesiados [82].

En este estudio, se ha presentado y evaluado un sistema de pupilometría automática que emplea técnicas de aprendizaje profundo, y que ha sido diseñado y desarrollado con el propósito de evaluar indirectamente, en tiempo real, la función del sistema noradrenérgico-LC en roedores anestesiados. El objetivo es triple. Primero, se ha presentado la plataforma *hardware* desarrollada para realizar los experimentos de laboratorio, que permite posicionar al animal, administrar la anestesia y ajustar las cámaras para la mejor grabación binocular de las pupilas. Segundo, se ha descrito la herramienta *software* creada para registrar grabaciones bilaterales, optimizando los parámetros para minimizar la pérdida de fotogramas y la calidad de la imagen. Finalmente, se propone un modelo de segmentación de instancias que emplea técnicas de aprendizaje profundo para calcular el diámetro pupilar en ratones en condiciones de poca luz. El rendimiento del sistema se evaluó y comparó con otros métodos de referencia. Con ello, se ha proporcionado un marco integrado y validado que facilita el estudio no invasivo de la correlación del tamaño pupilar y la actividad del LC en roedores ligeramente anestesiados.

3.1.1. Trabajos recientes

El tamaño pupilar es el resultado de la acción equilibrada de dos músculos del iris: el esfínter y el dilatador. Estos músculos están inervados por neuronas simpáticas del ganglio cervical superior y por neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar [102].

En roedores, la pupilometría se aplica convencionalmente como una técnica no invasiva, con una evaluación no completamente automatizada de los cambios en el tamaño pupilar durante el experimento. De forma general, este análisis se realiza fuera de línea, fotograma a fotograma, lo que lo hace lento, laborioso e ineficiente en el caso de grabaciones largas.

La aplicación de técnicas de procesamiento digital de imágenes ha intentado aliviar esta carga al transformar el proceso de anotación en un proceso automático. En los últimos años, se han utilizado algoritmos convencionales para segmentar la pupila en regiones de interés circulares o elípticas. La **Tabla 1** y la **Tabla 2** resumen las características de algunos estudios relevantes realizados en roedores en los últimos cinco años que relacionan la pupilometría y la actividad del LC. En 2016, Reimer *et al.* [80] exploraron la relación entre comportamientos exploratorios, sincronización cortical y dilatación pupilar en ratones adultos. Posteriormente, en 2017,

Liu et al. [79] exploraron como las vías simpáticas y parasimpáticas contribuyen a la dilatación pupilar inducida por la activación del LC en ratas adultas utilizando un sistema de pupilometría ensamblado ad-hoc. Yüzgeç et al. [84] estudiaron en 2018, el tamaño pupilar, el acoplamiento a estados corticales y la estabilidad del sueño profundo en ratones adultos. En 2019, Breton-Provencher y Sur [100] analizaron los mecanismos en ratones que relacionaban la actividad noradrenérgica del LC y la dilatación pupilar en ratones despiertos con la cabeza inmovilizada. Zerbi et al. [37], también en 2019, estudiaron el efecto en ratones adultos de la estimulación del LC sobre la conectividad funcional a gran escala, evaluando la activación exitosa del LC mediante pupilometría. En 2020, Hayat et al. [101] estudiaron si la excitación optogenética del LC provoca signos de excitación comportamentales, electrofisiológicos y pupilares en ratas adultas. Finalmente, y también en 2020, Privitera et al. [82] diseñaron y desarrollaron un conjunto completo de herramientas de pupilometría para la monitorización en tiempo real de la actividad del LC en roedores. Su enfoque fue doble. Primero, describieron un método para el análisis de las imágenes de pupila utilizando MATLAB. Como enfoque alternativo, los autores también propusieron una adaptación del software de seguimiento de movimiento DeepLabCut (DLC), que incluía una red neuronal profunda [103] para la segmentación y el seguimiento de la pupila.

Entre las características frecuentes en la mayoría de los estudios mencionados se incluyen el uso de métodos convencionales de análisis de imagen, siendo remarcable la necesidad de ajuste manual de algunos de los parámetros en ciertas etapas del procesamiento, especialmente aquellos relacionados con el umbral, el movimiento de las vibrisas y el ruido. La falta de una evaluación sistemática para proporcionar el grado de certeza sobre el rendimiento de los algoritmos de detección del tamaño pupilar ha sido una constante en los estudios publicados. Solo Breton-Provencher y Sur [100] proporcionaron una evaluación, aunque cualitativa, de los resultados.

Además de la necesidad de ajuste manual de algunos parámetros, el rendimiento de los algoritmos basados en técnicas convencionales de procesamiento de imágenes está condicionado por el entorno de baja luminosidad, frecuente en estos entornos experimentales. Las limitaciones de tales enfoques se acentúan por los movimientos de las vibrisas del ratón, el parpadeo y las opacidades causadas por el gel aplicado sobre los ojos de

los sujetos experimentales para evitar daños en la córnea durante la anestesia ligera. Por lo tanto, se requiere de un enfoque que supere estos inconvenientes y minimice o elimine la intervención manual para llevar a cabo experimentos con roedores de manera confiable. En este sentido, se ha demostrado que la aplicación de aprendizaje profundo es eficaz para la detección en tiempo real de la pupila en humanos [104], [105], [106], [107], [108]. Estos estudios en humanos están abrumadoramente orientados a estimar los centros pupilares para determinar la mirada. Pero la pupilometría en roedores presenta algunos desafíos diferentes de los encontrados en humanos. En roedores, la precisión en la definición del tamaño pupilar se ve afectada por movimientos dispersos, una baja diferencia de contraste entre la pupila y el iris, el desenfoque, los reflejos y el ruido [109].

Muy recientemente, el aprendizaje profundo se ha aplicado en ratones en estudios del LC [82]. Sin embargo, la evaluación precisa y sistemática de la robustez y de la precisión del modelo para delimitar el error medio de estimación en el cálculo del tamaño pupilar sigue siendo una tarea pendiente.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta sección describe los materiales y métodos utilizados en este estudio para alcanzar los objetivos presentados en la introducción.

3.2.1. Plataforma de pupilometría

A partir de las especificaciones funcionales emanadas de las necesidades experimentales de nuestro grupo de trabajo, se diseñó una plataforma que permite ubicar al sujeto experimental, y que incluye dos cámaras de video para la adquisición de las imágenes de pupila y una fuente de luz.

No existe, hasta la fecha, consenso sobre la disposición de estos elementos, ni su forma o características. Por ello, se priorizó la flexibilidad en el emplazamiento de los componentes durante el experimento, para disponer del mayor grado de libertad en la colocación de los diferentes elementos del sistema. Esta flexibilidad permite definir, y posteriormente depurar, el método para la toma de datos experimentales.

Tabla 1. Aspectos generales de los estudios recientes realizados para evaluar la función del locus coeruleus usando registros de pupilometría. LC-NA: locus coeruleus sistema noradrenérgico.

Autores	Muestra	Objetivos	Tasa de fotogramas y tamaño de la imagen
Zerbi et al., 2019 [37]	Ratas adultas	Estudiar el efecto de la estimulación de LC en la conectividad funcional a gran escala	-
Breton-Provencher et Sur, 2019 [100]	Ratas adultas	Estudio de los mecanismos de los ratones que controlan los modos de actividad de LC-NA.	20 Hz 240 × 184
Yüzgeç et al., 2018[84]	Ratas adultas	Estudio de los mecanismos de los ratones que controlan los modos de actividad de LC-NA. Acoplamiento del tamaño de la pupila a los estados corticales y estabilidad del sueño profundo.	10 240x376
Liu et al., 2017 [79]	Ratas adultas	Explorar cómo las vías simpáticas y parasimpáticas contribuyen a la dilatación de la pupila en la activación del locus coeruleus.	50
Reimer et al., 2016 [80]	Ratas adultas	Relación entre las conductas exploratorias, la sincronización cortical y la dilatación de la pupila.	10 1280×1024
Hayat et al, 2020 [101]	Ratas adultas	Explorar si la excitación optogenética de LC provoca signos electrofisiológicos y pupilares de excitación.	30
Pritiviera et al., 2020 [82]	Ratas adultas	Diseñar e implementar una caja de herramientas completa de pupilometría para el monitoreo en tiempo real de la actividad del locus coeruleus en roedores.	Variable

Tabla 2. Hardware, métodos y resultados en los estudios recientes realizados para evaluar la función del locus coeruleus (LC) usando registros de pupilometría (I).

Autores	Hardware	Iluminación	Métodos	Software y rendimiento
Zerbi et al., 2019 [37]	Raspberry Pi 3 Model B y NoIR Camera Module V2.	Fuente de luz infrarroja (Pi Supply, Bright Pi- Bright White y luz de cámara IR).	Los fotogramas se binarizaron y se utilizó un algoritmo de ajuste de elipse para aproximar el tamaño de la pupila. Las mediciones se normalizaron respecto del nivel basal.	MATLAB. Fuera de línea. Rendimiento no reportado.
Breton-Provencher et Sur, 2019 [100]	Ordenador principal y cámaras CMOS de alta resolución Thorlabs DCC1545M con una lente telecéntrica de 1.0× (58-430, Edmund Optics).	Iluminación infrarroja a 780 nm. Fuente de luz de matriz de diodos Thorlabs LIU780A. La iluminación se realizó en un ángulo de ~ 60° para mantener la pupila constreñida dentro del ritmo entre los dos párpados.	Se normalizó la intensidad mínima y máxima. Se empleó convolución de fotogramas. Las imágenes se binarizaron mediante un umbral manual para cada experimento. Se empleó ajuste de mínimos cuadrados y se estimó el diámetro para cada fotograma.	MATLAB. Fuera de línea y en línea. Análisis cualitativo del rendimiento.
Reimer et al., 2016 [80]	Cámara Thorlabs DCC1545M con lente telecéntrico TML-HP 1x, Edmund Optics) y CR-GM00-H6400, Teledyne Dalsa.	Luz roja y verde. Finalmente, luz de 490 nm en su lugar.	Suavizado con un kernel gaussiano 2D y umbralizado. Ajuste a un círculo por mínimos cuadrados. El umbral de detección, los anchos de suavizado, el estímulo visual, el rechazo de reflexión especular y la región de interés se ajustaron manualmente.	Adquisición en LabVIEW y procesamiento en MATLAB. Rendimiento no reportado.
Hayat et al, 2020 [101]	Cámaras de visión en color y procesador de vídeo RV2 para sincronizar fotograma a fotograma los datos de vídeo y la estimulación láser.	Luz infrarroja.	Recorte manual de fotogramas alrededor del ojo. Se aplicó una máscara basada en la mediana y se seleccionó el círculo mejor ajustado en el centro. Se calculó el cambio relativo porcentual.	MATLAB. Rendimiento no reportado.

Tabla 2 (continuación). Hardware, métodos y resultados en los estudios recientes realizados para evaluar la función del locus coeruleus (LC) usando registros de pupilometría (II).

Autores	Hardware	Iluminación	Métodos	Software y rendimiento
Yüzgeç et al., 2018[84]	Cámaras USB, 0.3MP Mono Firefly MV USB. Lente de microvideo, 25.0 mm FL, sin filtro de corte IR, f/2.5.	Retroiluminación infrarroja. LED de 940 nm (Everlight Electronics, 3 mW, 40 mA, 1,2 V) en el cráneo, por encima de la corteza frontal.	Recorte alrededor de la pupila. Se usó agrupamiento K-medias para binarizar la imagen. Se detectaron componentes conectados y el más grande se asignó a la pupila. Se ajustó por mínimos cuadrados una elipse al contorno del componente. Su eje mayor se definió como el diámetro de la pupila. Los parpadeos y períodos con párpados cerrados se detectaron de forma manual y se excluyeron del análisis.	MATLAB. Rendimiento no reportado.
Liu et al., 2017 [79]	Sistema xPC en tiempo real y sistemas de pupilometría ensamblados ad-hoc (DMK 23U618, Imaging Source, Alemania o FL3-U3-13Y3M-C, Point Grey, BC, Canadá).	Se ajustó para que la iluminancia en ambos ojos se midiera en 50 lux.	No reportado	Software y rendimiento no reportado.
Pritiviera et al., 2020 [82]	Raspberry Pi 3 Modelo B y cámara NoIR Camera Module V2.	Diodo emisor de luz UV (LED) de 5 mm y 375 nm.	Mejora de contraste y recorre de imágenes. Umbralización estática y segmentación creciente para adaptarse a las imágenes de la pupila. Mecanismo de detección de valores atípicos.	MATLAB. Rendimiento no reportado.

La **Figura 2** ilustra la plataforma desarrollada, consistente en una placa de acero base sobre la que se colocaron dos elementos: a) una plataforma regulable en altura para ubicar al animal (roedor) sedado, para evitar su movimiento; y b) dos cámaras para enfocar cada ojo del roedor, acopladas a una estructura que permite posicionarlas con libertad dentro del espacio delimitado por la plataforma. La estructura de sujeción de las cámaras se hace necesaria para permitir la utilización en diferentes tamaños de roedores (ratas y ratones).

El soporte base sobre el que se coloca el roedor se diseñó específicamente y se fabricó mediante impresión 3D. Se utilizó filamento de polietileno (PETG), por su biocompatibilidad y por la posibilidad que ofrece de ser esterilizado tras una prueba, empleando desinfectantes utilizados comúnmente en laboratorios de experimentación animal, como la acetona o el alcohol isopropílico.

Se eligió, para el registro de las imágenes, la cámara Thorlabs modelo DCC1545M. Se trata de una cámara CMOS de 1.3 Megapíxeles monocromo que ha sido empleada en estudios muy recientes [81]. Este modelo permite la captura de imágenes con una tasa de hasta 25 fotogramas por segundo, con una resolución de 1280x1024 píxeles. Se empleó una lente Edmund Optics de 25.0mm de distancia focal, sin filtro infrarrojo y una apertura de f/2.5. Esta lente permite enfocar el ojo del animal a una distancia aproximada de 2 centímetros, de forma que ocupe el campo completo de visión de la cámara. Este posicionamiento permite una mayor resolución en la cuantificación del diámetro de la pupila.

Se utilizó una iluminación ambiental baja (15 lux blancos en la posición del roedor) para evitar reacciones pupilares. Se utilizó una bombilla Philips BR125 IR 250W, dado que la luz roja no afecta a la conducta de los roedores por carecer de receptores para ello [37]. La bombilla se colocó a 80-100 cm frente al roedor para obtener suficiente iluminación ocular, evitando el calentamiento del animal.

Durante los experimentos se utilizó un lubricante ocular humectante (gel ocular Lubrithal™, Dechra Pharmaceuticals PLC, Northwich, Reino Unido) para evitar la desecación de la córnea. Un suplemento excesivo de este lubricante puede causar artefactos visuales, como deformación pupilar, sombras o burbujas de aire que quedan atrapadas dentro del gel. Estos artefactos debieron ser mitigados por el experimentador, mediante la aplicación de una capa delgada de lubricante.

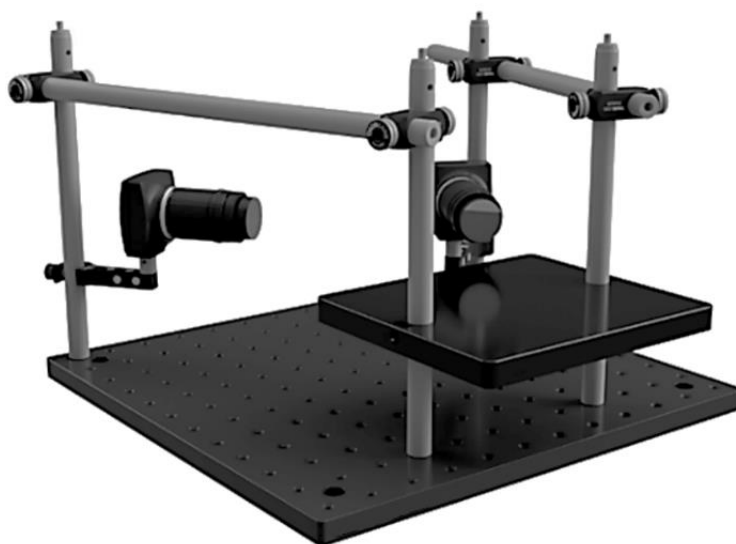


Figura 2. Plataforma desarrollada para la monitorización de los cambios en la pupila de pequeños roedores.

3.2.2. Software de control del sistema de pupilometría

El sistema integral de pupilometría desarrollado incluye dos módulos bien diferenciados. El primero permite la adquisición de los videos de ambos ojos. El segundo, facilita el análisis de los videos para extraer los datos referentes a la pupila. Su uso es secuencial, es decir, se realizan el experimento y posteriormente se analiza los videos generados. Cada módulo se ha integrado en una aplicación independiente. En la **Figura 3** se muestra el flujo de trabajo y datos entre ambas, así como las entradas y salidas de cada una de ellas.

Ambas aplicaciones se desarrollaron empleando el lenguaje de programación Python, elegido por su capacidad multiplataforma. La librería Qt fue empleada para la creación de la interfaz de usuario. Qt, además de permitir la creación de interfaces gráficas, dispone de un mecanismo de comunicación entre componentes, y funciones internas que utilizan interrupciones, siendo posible la comunicación entre estas funciones e hilos del programa sin llamadas explícitas en el código.

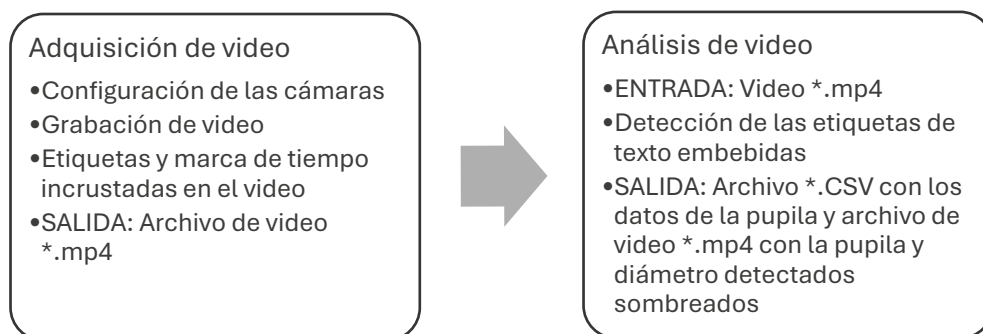


Figura 3. Flujo de trabajo del sistema.

3.2.2.1. Módulo de adquisición de video

El objetivo de este módulo es el registro y almacenamiento de las imágenes obtenidas por las dos cámaras. Ha de asegurarse la coherencia temporal entre ambos videos. Con este fin, se optó por una técnica de programación multihilo en la que cada componente del sistema (interfaz de usuario, la comunicación con cada una de las cámaras, y el almacenamiento de los videos adquiridos) se ejecuta en un hilo independiente. En caso de ser necesario, los hilos se pueden ejecutar de forma concurrente en núcleos separados.

Además, para paliar la pérdida de fotogramas, que origina pérdidas de la coherencia temporal, se diseñó un mecanismo de corrección, duplicando el fotograma anterior al perdido junto con una etiqueta de error para su evaluación en la etapa de análisis posterior. La configuración de los parámetros de las cámaras se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros de configuración utilizados para la adquisición de imágenes durante las sesiones experimentales.

Parámetro	Valor
Reloj	30 MHz
Tasa de fotogramas	10
Tiempo de Exposición	79.085 ms
Tamaño de imagen	1280×1024 píxeles
Formato	Mono 8 bits por píxel
Ganancia	Ajustable por el usuario

3.2.2.2. Módulo de análisis de video

Esta aplicación funciona como interfaz para la ejecución del algoritmo de detección de la pupila [110]. El algoritmo de detección de la pupila comprende un proceso de segmentación rápida basado en instancias que emplea la arquitectura SOLOv2 de aprendizaje profundo, como se describirá a continuación. A partir de esta segmentación se calculan diversos parámetros relacionados con la pupila, que junto a las etiquetas detectadas se almacenan en un archivo que permitirá realizar el postratamiento y análisis de los datos en programas externos como MATLAB o Excel. Se ha implementado un mecanismo de lectura de las etiquetas de texto colocadas por el software de registro utilizando la librería *easyOCR*. De estas etiquetas, se extrae la marca de tiempo y el resto del texto para añadirlo al fichero de texto con valores separados por comas (CSV, del inglés *comma separated values*) que se genera como salida.

3.2.3. Método basado en aprendizaje profundo para la segmentación pupilar

La segmentación de imágenes se ha convertido en una tarea ordinariamente vinculada al campo de la visión por computador. En los últimos años, la aparición del aprendizaje profundo, y más específicamente de las redes neuronales convolucionales (CNN, del inglés *Convolutional Neural Network*), ha afectado directamente la segmentación de imágenes, proporcionando modelos con un rendimiento notable [111].

La segmentación de imágenes puede ser semántica y basada en instancias [112]. Mientras que la segmentación semántica de imágenes se basa en la partición de la imagen en regiones a las que se asigna una cierta categoría, la segmentación basada en instancias permite diferenciar miembros de la misma categoría a través de una descripción exhaustiva de la escena [113].

La segmentación en general, y la segmentación basada en instancias en particular, se ha beneficiado en gran medida de la adopción de CNNs para aumentar el rendimiento, lo que ha llevado a la propuesta de múltiples modelos en los últimos años [114], [115], [116], [117], [118], [119], [120].

En este estudio, se optó por adaptar el modelo de segmentación rápida basado en instancias SOLOv2. Se eligió esta técnica de segmentación basada en instancias frente a las estrategias de segmentación semántica por su rendimiento sobresaliente con conjuntos de imágenes estándar, su baja carga computacional y su potencial para funcionar bien minimizando

el posprocesamiento [121]. La segmentación basada en instancias se reveló especialmente ventajosa para manejar las oclusiones pupilares (por ejemplo, en el caso de artefactos o brillo desproporcionado dentro de la pupila), dado que el método segmenta la pupila como un todo, proporcionando una única instancia.

Como primera etapa de procesamiento, SOLOv2 [121] extrae información de imagen relevante a través de una red de convolución ResNet-50 [122]. SOLOv2 se conecta a una red piramidal de características (FPN) [123]. La categorización semántica de objetos potenciales de la imagen y la extracción de la máscara de instancia se lleva a cabo en dos subredes de procesamiento. La **Figura 4** ilustra la arquitectura del modelo.

Cuando se completa una grabación experimental utilizando el módulo de adquisición de video, se genera un archivo AVI (siglas en inglés de *Audio Video Interleave*). La ruta a este archivo se utiliza como parámetro de entrada a un script que procesa el video utilizando el modelo de aprendizaje profundo entrenado. La salida principal del módulo de análisis es el denominado *pupilograma* o curva que representa el diámetro pupilar en función del tiempo.

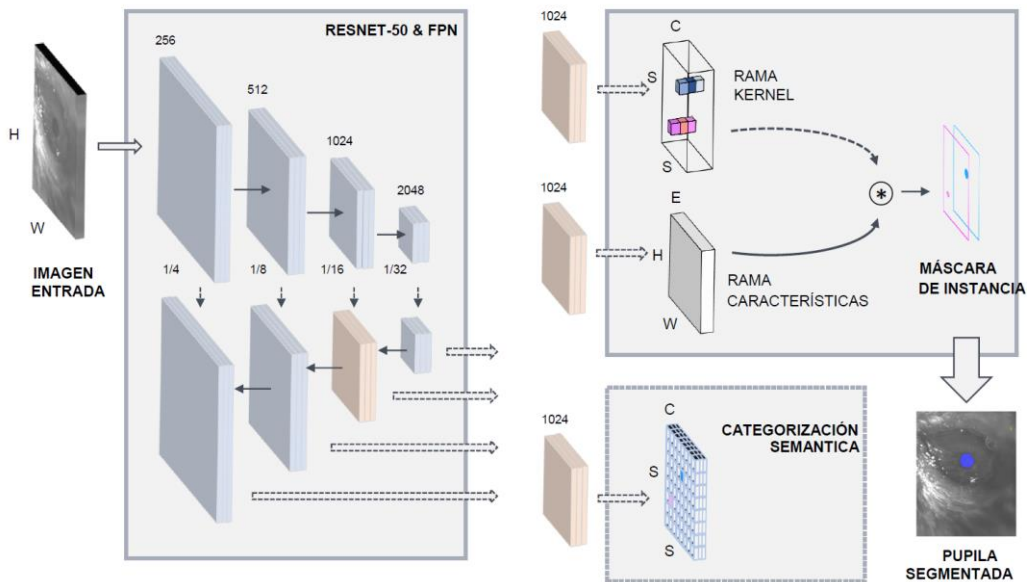


Figura 4. Modelo de la arquitectura de aprendizaje profundo.

Como salida, el módulo general un archivo CSV, que incluye el número de fotogramas, las marcas de tiempo, las coordenadas del centroide del área segmentada (x, y), el área segmentada, la circularidad pupilar y la distancia entre los píxeles más alejados de la región de interés (definida como el diámetro pupilar). La circularidad se definió como:

$$Circularidad = 4\pi \frac{area}{perímetro^2}$$

3.2.3.1. Aprendizaje de transferencia y aumento de datos

Un problema principal encontrado en el proceso de aprendizaje de los algoritmos de aprendizaje profundo consiste en establecer un número muy grande de parámetros para generalizar o aprender del conjunto de datos de entrenamiento. Esta tarea requiere grandes conjuntos de datos con imágenes que alimenten los algoritmos, pero que a menudo son limitados o escasos. Generar grandes conjuntos de datos etiquetados manualmente es costoso y, en muchos casos, requiere un experto en la materia. En este estudio, se utilizaron dos técnicas para completar el conjunto de datos de entrenamiento, aumentando el número de imágenes disponibles: aumento de datos y transferencia de aprendizaje.

El aumento de datos se utilizó para aumentar el conjunto de datos de entrenamiento, con objeto de mejorar la precisión, la generalización y el control del sobreajuste. Esta técnica permitió aumentar el tamaño y la diversidad del conjunto de datos de entrenamiento generando nuevas imágenes a partir de transformaciones de las originales. Se aplicaron redimensionamientos a seis escalas fijas diferentes y volteos con una probabilidad de 0.5.

La transferencia de aprendizaje inductiva permite preentrenar un modelo utilizando grandes conjuntos de datos etiquetados de un problema no relacionado y luego adaptarlo al problema en estudio. Esto implica un reentrenamiento menor, evitando trabajo de etiquetado de datos. En este estudio, se utilizó esta técnica, y todos los parámetros de la red de convolución ResNet-50 se preentrenaron previamente utilizando como conjunto de datos las imágenes proporcionadas para el desafío *Common Objects in Context (COCO) 2015* [122].

3.2.3.2. Comparación con otras arquitecturas de referencia

Para evaluar la arquitectura propuesta, se compararon los resultados con los de otros marcos de segmentación de imágenes basados en aprendizaje

profundo y con técnicas de procesamiento convencional de imágenes. Se eligieron métodos de última generación de segmentación semántica y basada en instancias como algoritmos de referencia para la comparación. Las arquitecturas de segmentación semántica seleccionadas se basaron en DeepLabv3+, que utiliza convoluciones dilatadas o atroces y agrupamiento piramidal espacial [124], y SegNet [125]. La arquitectura DeepLabv3+ se implementó considerando cuatro redes de convolución diferentes: Xception [126], ResNet-50 y ResNet-18 [122], y MobileNetV2 [127]. Para comparar con una arquitectura de última generación de segmentación basada en instancias, se implementó la arquitectura Mask R-CNN, un enfoque de segmentación por detección que incluye una red de convolución ResNet-50 [114]. Finalmente, se llevó a cabo un experimento de referencia adicional. Para este propósito, se aplicó un algoritmo de procesamiento de imágenes convencional, siguiendo operaciones comunes realizadas en los últimos estudios de LC. Este algoritmo de segmentación incluyó la selección manual, en el primer fotograma de video, de un cuadro delimitador alrededor del área pupilar. La pupila detectada dentro de esta región como referencia inicial para su ubicación y para establecer su nivel medio de intensidad. En fotogramas sucesivos, se aplicó una segmentación por umbral utilizando el valor de intensidad promedio de 13 píxeles ubicados dentro de la pupila detectada en el fotograma anterior. Como resultado, se obtuvo una imagen con diferentes áreas o regiones de píxeles conectados. En una etapa de posprocesamiento, se eliminaron las regiones pequeñas y aquellas fuera del cuadro delimitador inicial. Finalmente, la pupila se segmentó como la región cuyo centroide estaba más cerca del centroide de la pupila detectada en el fotograma anterior.

Para una comparación justa, las redes de segmentación de imágenes basadas en aprendizaje profundo se reentrenaron en los conjuntos de datos propios de este estudio.

3.2.3.3. Validación, pruebas y métricas de evaluación

Se utilizaron un total de 1688 imágenes para el entrenamiento, la validación y las pruebas. El conjunto de entrenamiento incluyó 737 imágenes, el conjunto de validación, utilizado para la validación durante el entrenamiento, 315 imágenes, y el conjunto de datos de prueba 636 imágenes. La estrategia adoptada de entrenamiento, validación y pruebas se muestra en la **Figura 5**.

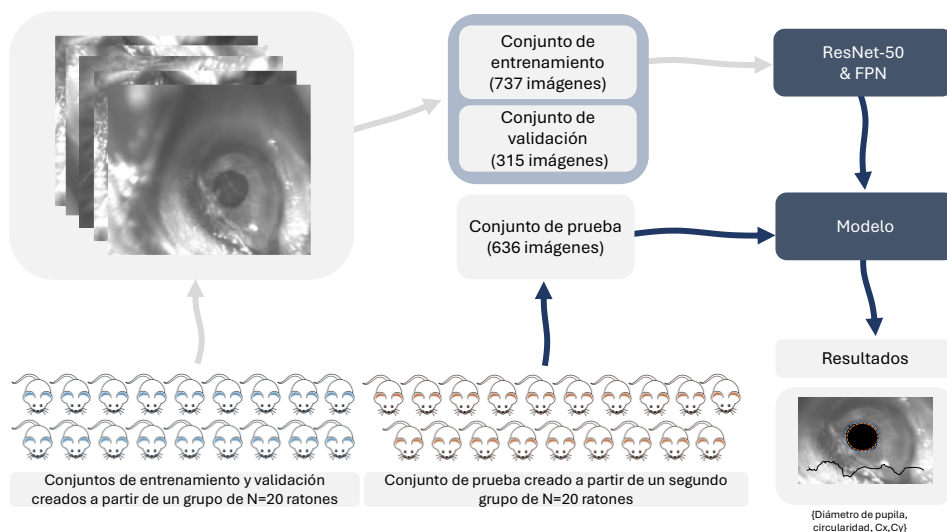


Figura 5. Estrategia de entrenamiento, validación y prueba. FPN: Red Piramidal de Características. (Cx, Cy): coordenadas del centroide del área segmentada.

De entre las métricas de rendimiento ampliamente utilizadas en segmentación, se seleccionaron la Intersección sobre Unión (*IoU*, del inglés *Intersection over Union*), la intersección sobre unión promedio (*mIoU*), la precisión de píxeles y la precisión media como candidatas para este trabajo.

Mientras que la *IoU* estima el rendimiento de la segmentación calculando la intersección y la unión entre la verdad de suelo y la predicción, la *mIoU* toma la *IoU* sobre todas las clases y las promedia. Formalmente, estas métricas se expresan como:

$$Precision\ de\ píxeles = \frac{\sum_i p_{ii}}{\sum_i t_i}, Precision\ media = \frac{1}{k} \sum_i \frac{p_{ii}}{t_i}$$

$$mIoU = \sum_i \frac{p_{ii}}{t_i + \sum_j p_{ij} - p_{ii}}, IoU = \frac{p_{ii}}{\sum_j p_{ij} + \sum_j p_{ji} - p_{ii}}$$

donde k es el número de clases en la segmentación ($k=2$ en este estudio), p_{ij} es el número de píxeles que realmente pertenecen a la clase i y que han sido clasificados como pertenecientes a la clase j , y t_i es el número total de píxeles de la clase i encontrados en la segmentación de la verdad de suelo [128]. Los valores de *mIoU* e *IoU* están restringidos al intervalo $[0,1]$, representando '1' el 100% de precisión, y '0' el 0%.

La principal desventaja de usar la precisión de píxeles es que el resultado puede parecer bueno si una clase supera a la otra. De hecho, esta situación se encuentra en el problema de la detección pupilar de una imagen completa del ojo del animal. La región de interés es pequeña en comparación con el fondo de la imagen. Esto también hace que $mIoU$ sea una medida inadecuada. Sin embargo, IoU aplica un promedio entre clases. En consecuencia, el rendimiento del modelo se verificó calculando el IoU para todo el conjunto de datos [129].

Además de IoU , se calcularon los errores absolutos medios porcentuales (MAPE) del diámetro pupilar, la circularidad y las coordenadas del centroide. MAPE, una métrica popular comúnmente utilizada para evaluar el rendimiento de la predicción se define como:

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_t \left| \frac{G_t - P_t}{G_t} \right|$$

donde G_t y P_t representan, respectivamente, los diámetros pupilares reales y estimados en el fotograma t , siendo N es el número de imágenes evaluadas.

3.2.3.4. Configuración del sistema y detalles de entrenamiento

Para el entrenamiento, la validación y las pruebas del modelo de segmentación se empleó una estación NVIDIA® DGX. Se seleccionaron una tasa de aprendizaje inicial, un decaimiento del peso y un momento de 0.001, 0.0001 y 0.8, respectivamente. No se aplicó ajuste de hiperparámetros en este estudio. La función de pérdida utilizada para el entrenamiento fue la función de entropía cruzada para arquitecturas de segmentación semántica de píxeles. En el caso de los métodos de segmentación por instancias, la función de pérdida de entrenamiento se definió como sigue:

$$L = L_{cate} + \lambda L_{mask}$$

donde L_{cate} es la pérdida focal convencional [130] para la clasificación de categoría semántica y L_{mask} es la pérdida de dado para la predicción de máscara [131]. Las imágenes de entrada al modelo de segmentación se escalaron previamente a 640×512 píxeles.

3.2.3.5. Análisis estadístico

Además de estimar las métricas de rendimiento definidas en la sección anterior para los métodos propuestos y de referencia, para evaluar la

concordancia entre las mediciones del diámetro pupilar se estimó el coeficiente de correlación, se empleó análisis de regresión, y se representaron los diagramas de dispersión y los límites de concordancia en el gráfico de Bland-Altman [132]. Se consideró significativa una probabilidad de error menor al 5%. El método de Bland-Altman es un método gráfico que describe el acuerdo entre dos mediciones cuantitativas cuantificando la diferencia media entre ellas (sesgo) y un rango de confianza, que se espera incluya el 95% de las diferencias entre dos técnicas de medición diferentes.

3.2.3.6. Animales

Los experimentos se realizaron en un grupo de 20 ratones macho adultos C57BL/6J que se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio (22° C, ciclo de luz/oscuridad de 12 h, comida y agua *ad libitum*). El manejo de los animales y los procedimientos asociados se realizaron de acuerdo con las directrices de la directiva de la Comisión Europea (2010/63/EC) y la ley española (RD 53/2013) que regula la investigación animal. Además, los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz.

3.2.3.7. Protocolo de estimulación

Dado que las compresiones nociceptivas de la pata (PC, del inglés *paw compressions*) provocan un aumento en la actividad del LC [133], se midió el diámetro pupilar en respuesta a la estimulación nociceptiva repetida mediante PC consecutivas de la pata trasera, aplicadas durante 1 s entre los extremos de un par de pinzas quirúrgicas. Para cada experimento, el tamaño pupilar basal se registró durante 60 segundos. Posteriormente, se aplicaron estímulos mecánicos cuatro veces a intervalos de 100 segundos.

3.2.3.8. Conjunto de datos

Para monitorear las fluctuaciones pupilares no inducidas por la luminancia, las pupilas de los animales ligeramente anestesiados con isoflurano se grabaron bajo las condiciones de iluminación mencionadas anteriormente.

El tiempo total de monitorización de los 20 animales fue de 8 horas, 19 minutos y 21 segundos. Se marcaron, utilizando una tableta digitalizadora, los contornos de la pupila en un total de 1052 imágenes.

Se construyó un conjunto de datos de prueba de 636 imágenes anotadas manualmente en sesiones adicionales con un nuevo grupo de 20 animales.

Los roedores de este último grupo fueron monitorizados, en total, durante 8 horas, 11 minutos y 22 segundos.

El tiempo promedio empleado para el etiquetado manual de fotogramas fue de 30 segundos por imagen.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Plataforma de pupilometría

La **Figura 6** muestra la plataforma desarrollada y utilizada para registrar las imágenes pupilares durante los experimentos. En la imagen se muestra la posición de las dos cámaras de video y la plataforma de descanso del animal. El roedor recibe la anestesia a través de una máscara nasal durante toda la sesión. El tono rojizo de la luz se debe a la iluminación infrarroja. Esta plataforma se registró como modelo de utilidad en el Registro de la Propiedad Intelectual (número de publicación ES1278199Y).

3.3.2. Software de control

La interfaz de usuario de esta aplicación se muestra en la **Figura 7**. En ella se pueden observar las visualizaciones en tiempo real de las imágenes obtenidas por las cámaras y, en la parte inferior, las pestañas de configuración de parámetros relativos a las cámaras, el registro en video y la configuración módulos accesorios como el estimulador de optogenética, cuyo uso se describirá en el capítulo 4. La configuración realizada en estos apartados (ganancia de las cámaras, ruta de guardado de los videos, tipo de estimulación, etc.) se almacena automáticamente entre sesiones, facilitando la continuación de los experimentos.

Cámaras

Se utilizó la librería para Python proporcionada por el fabricante OEM de las cámaras (*IDS Imaging Development Systems GmbH*) [134]. Se uso esta API para generar los eventos de lectura de los datos del fotograma actual desde la cámara y almacenarlos en un buffer circular independiente para cada una de ellas.

3.3.2.2. Adquisición de video

El registro de los datos experimentales se gestionó en la pestaña de “Grabación”. En ella, el usuario podía elegir la ruta de guardado de los videos y el prefijo asociado al fichero (usualmente el nombre del

sujeto/animal experimental) al cual se agregaba automáticamente la fecha y hora de inicio de la grabación, así como el ojo registrado.

En cada uno de los extremos de la pantalla se dispusieron contadores con el número de fotogramas grabados y perdidos para cada una de las cámaras para indicar al usuario si existía algún error en la conexión y actuar en consecuencia. Para mitigar la pérdida de fotogramas y la de coherencia temporal en los videos almacenados se optó por duplicar el fotograma anterior en vez de omitirlo, junto con una etiqueta identificadora y la marca de tiempo duplicada. Esta función permite que ambos videos presenten el mismo número de fotogramas/duración y una detección de errores por la aplicación de análisis y su posterior tratamiento o filtrado.

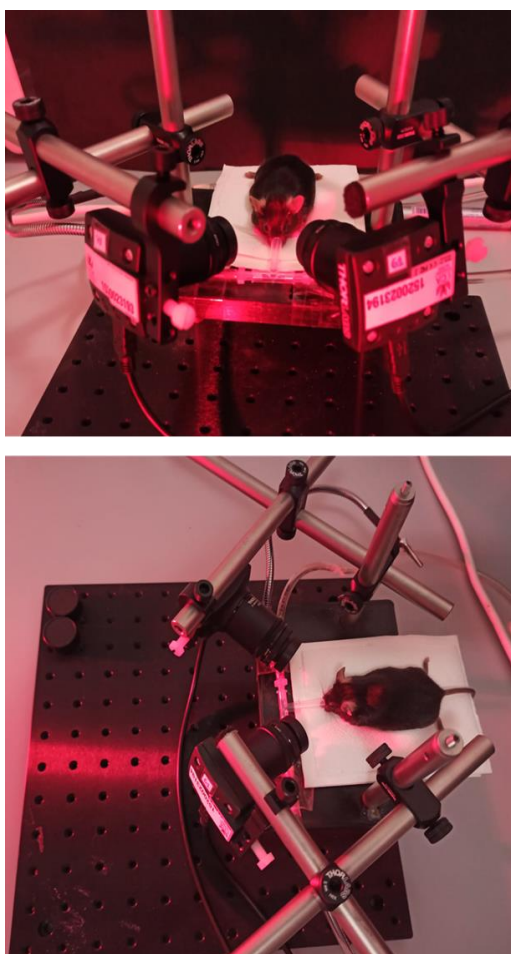


Figura 6. Imágenes del montaje experimental durante una sesión de laboratorio.

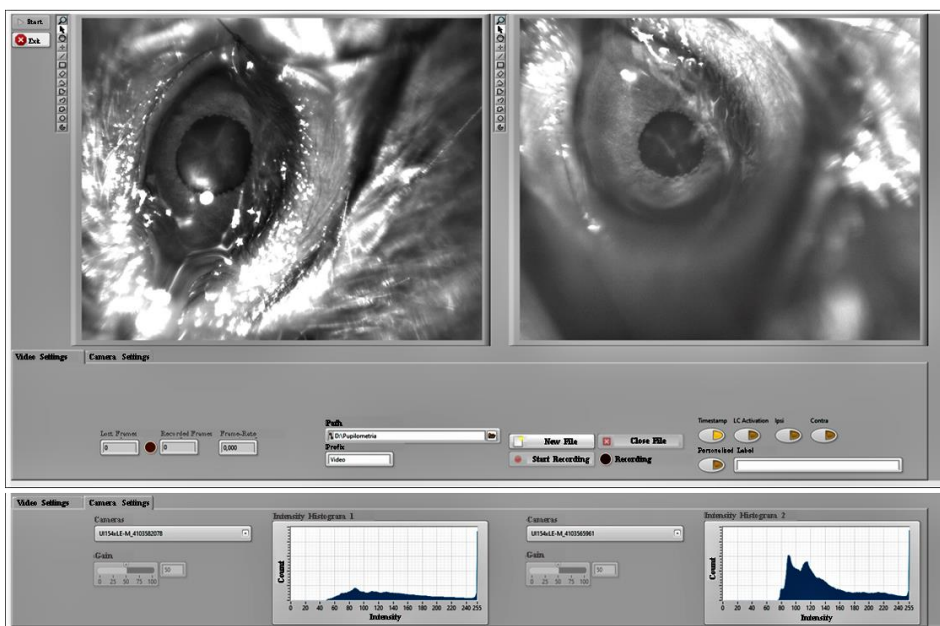


Figura 7. Interfaz de usuario de la aplicación de registro.

Por otro lado, en esta pestaña se dispusieron los controles de las etiquetas que podían ser incrustadas en el video, tres de ellas predefinidas (marca de tiempo, estimulaciones izquierda y derecha) y una cuarta personalizada para otros casos o comentarios que el experimentador desee agregar.

3.3.2.3. Análisis de video

Esta aplicación funciona como interfaz para la ejecución del algoritmo de detección de la pupila desarrollado [18]. (Figura 8). Únicamente debía indicarse el directorio donde se encontraban los archivos de video e indicar si se deseaba detectar las etiquetas incrustadas y/o guardar el video con la región de la pupila detectada superpuesta con el video original. Se optimizó la aplicación para ejecutar el análisis de hasta 3 videos en paralelo.

El algoritmo de detección de la pupila generaba a su salida una imagen binaria con la región pupilar por cada fotograma del video original. A partir de esta imagen se calculaba el diámetro de la pupila como la distancia mayor entre los píxeles de la región seleccionada, las coordenadas del centroide y la circularidad, que junto a las etiquetas detectadas se almacenaban en un archivo separado por comas que permitirá realizar el postratamiento y análisis de los datos en otros programas como MATLAB o Excel.

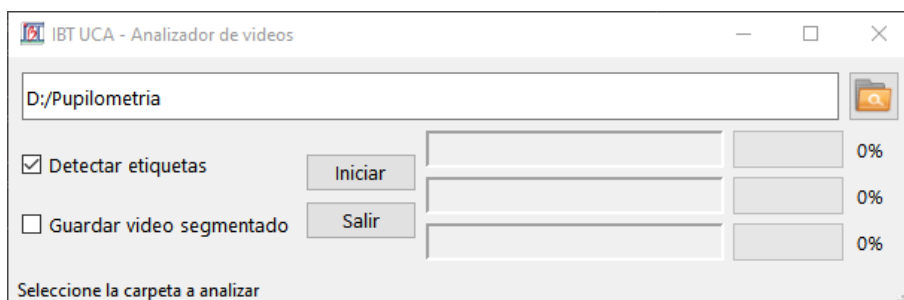


Figura 8. Interfaz de usuario de la aplicación de análisis de video.

3.3.3. Evaluación de la segmentación

Se comparó la arquitectura propuesta con otros métodos de referencia. Para una comparación justa, se entrenaron redes de segmentación de imágenes comunes en el estado del arte con el conjuntos de datos registrado en este estudio. Las métricas de segmentación consideradas en este estudio se calcularon para la validación y prueba de los modelos de segmentación pupilar. Los valore de MAPE del tamaño pupilar estimado, la circularidad y las coordenadas del centroide, así como las métricas *IoU* se presentan para ambos conjuntos de datos. La métrica *IoU* se determinó para comparar las máscaras pupilares reales y las estimadas. Un análisis detallado de los resultados se muestra en la **Tabla 4**.

Los valores medios de *IoU* alcanzados por la arquitectura propuesta en los conjuntos de validación y prueba fueron 0.94 y 0.93, respectivamente. Estos valores de *IoU* superaron a los del resto de métodos basados en instancias (Mask R-CNN), segmentación semántica (DeepLabv3+ y SegNet) y modelos de segmentación tradicional evaluados. Tan solo el método de segmentación basada en instancias Mask R-CNN igualó esta métrica en el conjunto de prueba (0.93).

El error MAPE para el diámetro pupilar estimado para el método propuesto basado fue del 1.70% en el conjunto de validación y del 1.89% en el conjunto de prueba. Este error es sustancialmente más bajo que los errores estimados para los otros métodos de referencia. Una situación análoga ocurre con la circularidad pupilar. En ambos casos, los métodos basados en segmentación por instancias proporcionaron un mejor rendimiento que los demás. El método propuesto solo fue ligeramente superado en precisión por la arquitectura Mask R-CNN en el cálculo de las coordenadas del punto central de la pupila.

La **Figura 9** ilustra el resultado obtenido para la segmentación automática de un conjunto de seis fotogramas, ordenados desde el tamaño pupilar más grande (a) hasta el más pequeño (d), capturados en diferentes condiciones, algunas de ellas consideradas particularmente desafiantes para el procesado automático.

La **Figura 9(a, b)** muestra los resultados obtenidos en dos imágenes de pupilas dilatadas. La presencia de vibrisas y gel humectante, además de una perspectiva de visión de grabación que acentúa la esfericidad del globo ocular, hacen que la segmentación automática utilizando técnicas convencionales sea particularmente problemática.

Sin embargo, el marco basado en aprendizaje profundo propuesto funcionó en ambos casos, mostrando un alta *IoU* y un pequeño error absoluto medio porcentual al estimar el tamaño pupilar.

Tabla 4. Comparativa del rendimiento de la arquitectura propuesta y las referencias en los conjuntos de validación y prueba. *IoU*: Intersección sobre la Unión. MAPE PD: Error absoluto medio porcentual del diámetro pupilar. MAPE PC: Error absoluto medio porcentual de la circularidad de la pupila. MAPE Cx: Error absoluto medio porcentual de la coordenada X del centroide. MAPE Cy: Error absoluto medio porcentual de la coordenada Y del centroide.

Método	Conjunto de validación / Conjunto de prueba				
	<i>IoU</i>	MAPE PD (%)	MAPE PC (%)	MAPE Cx (%)	MAPE Cy (%)
Mask R-CNN	0.92/0.93	4.13/2.98	2.11/3.28	0.30/0.18	0.30/0.23
DeepLabv3+ ResNet-50	0.90/0.86	4.25/5.28	2.72/4.45	0.45/0.73	0.57/0.91
DeepLabV3+ ResNet-18	0.84/0.79	7.80/7.94	11.95/13.19	0.86/1.05	0.82/1.14
DeepLabv3+ MobileNetV2	0.87/0.87	5.87/5.88	7.28/4.94	0.70/0.51	0.62/0.52
DeepLabV3+ Xception	0.80/0.77	11.71/10.06	11.14/9.41	1.30/0.94	1.19/1.36
SegNet	0.74/0.70	16.85/22.24	80.15/76.62	1.77/0.76	1.49/0.72
Algoritmo convencional	0.70/0.80	13.43/8.38	24.55/10.46	2.18/1.50	2.42/1.05
Método propuesto	0.94/0.93	1.70/1.89	1.89/2.56	0.26/0.26	0.36/0.38

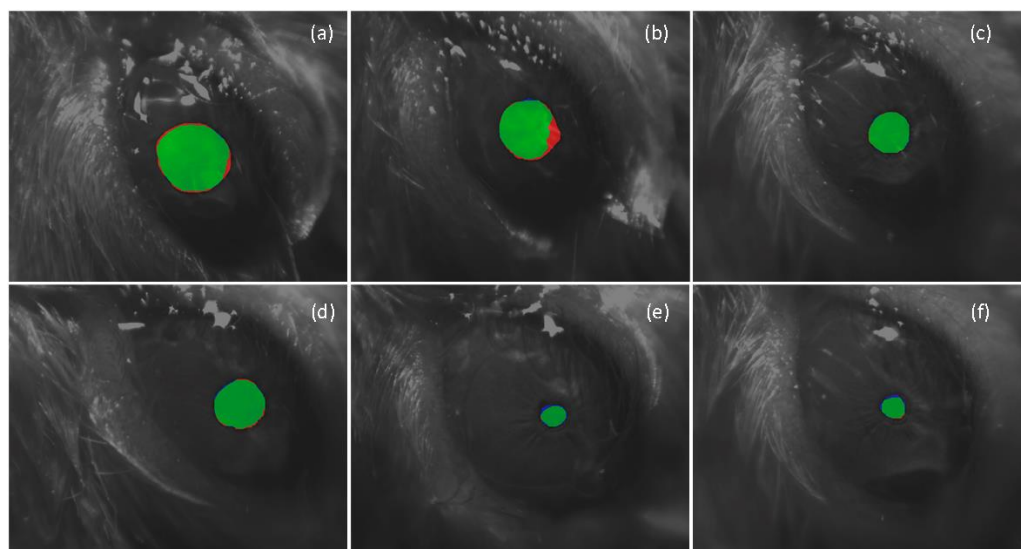


Figura 9. Comparación entre segmentación pupilar automática y manual. El color rojo muestra el resultado de la segmentación manual (referencia) y el color azul muestra el resultado de la arquitectura propuesta basada en aprendizaje profundo. La intersección de ambas regiones se muestra en color verde. Se indica para cada caso los valores de la intersección sobre unión (IoU) para la región segmentada predicha y el error absoluto medio porcentual (MAPE) para la estimación del diámetro pupilar.

El procesamiento de imágenes de pupilas contraídas es igualmente desafiante. En estos casos, una pequeña desviación en la estimación del contorno se traduce en un mayor error porcentual. Además, también se puede tener en cuenta el posible sesgo durante el proceso de anotación por parte del experimentador humano en regiones tan pequeñas, ya que es probable que se desvíen algunos píxeles de la segmentación perfecta.

Esta situación es consistente con los hallazgos en [55]. La **Figura 9e** ilustra un ejemplo de tal escenario. Las diferencias en la región segmentada automáticamente, con respecto a la segmentación manual, conducen a un mayor error en la estimación del tamaño pupilar.

La **Figura 10** presenta el diámetro pupilar estimado automáticamente y el diagrama de circularidad en uno de los experimentos de grabación pupilar.

La **Figura 11** y la **Figura 12** muestran la relación entre la *IoU* y el MAPE del diámetro y la circularidad pupilares en los conjuntos de validación y prueba. Se puede apreciar que los valores bajos de *IoU* no condujeron a valores

considerables del MAPE del diámetro pupilar estimado. Los valores bajos de IoU correspondieron a casos en los que la región pupilar había sido segmentada parcialmente. Sin embargo, puede suceder que la región faltante en la segmentación resultante no afecte la estimación del diámetro pupilar así definido, como se puede reconocer en la **Figura 9b**.

El método propuesto es efectivo para la generación del pupilograma en experimentos de larga duración, permitiendo la detección de los cambios en el diámetro pupilar en respuesta a los diferentes estímulos presentados al animal. El sistema también permite la grabación de los cambios observados en la circularidad de la región detectada.

3.3.4. Análisis estadístico

Esta subsección incluye un análisis estadístico más detallado de los datos de diámetro y circularidad proporcionados por el método propuesto, con el fin de corroborar la validez de las mediciones proporcionadas y delimitar los límites de concordancia.

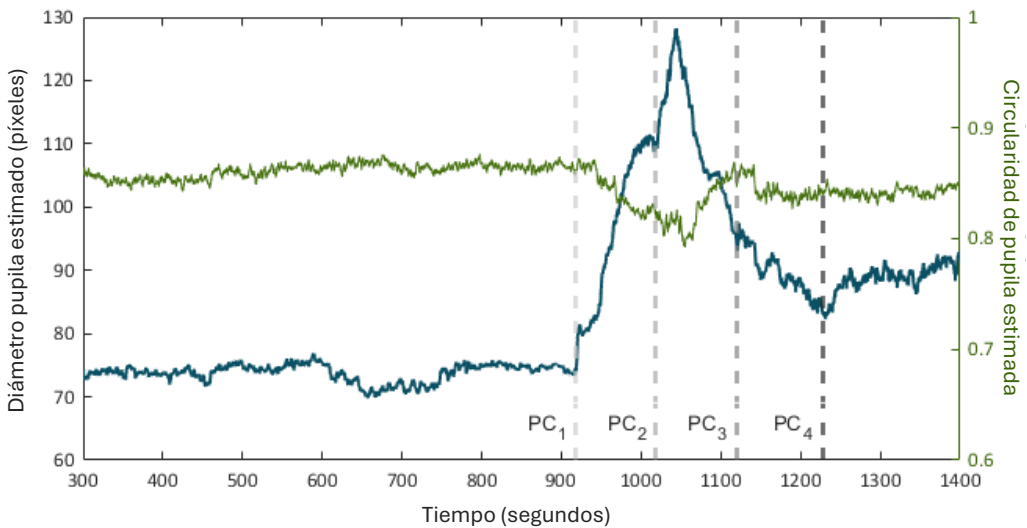


Figura 10. Series temporales del diámetro de la pupila (pupilograma) y la circularidad a lo largo de una sesión de grabación de la pupila. Los tiempos $t = PC_i$ señalan el inicio de eventos consecutivos de compresión de la pata trasera (PC).

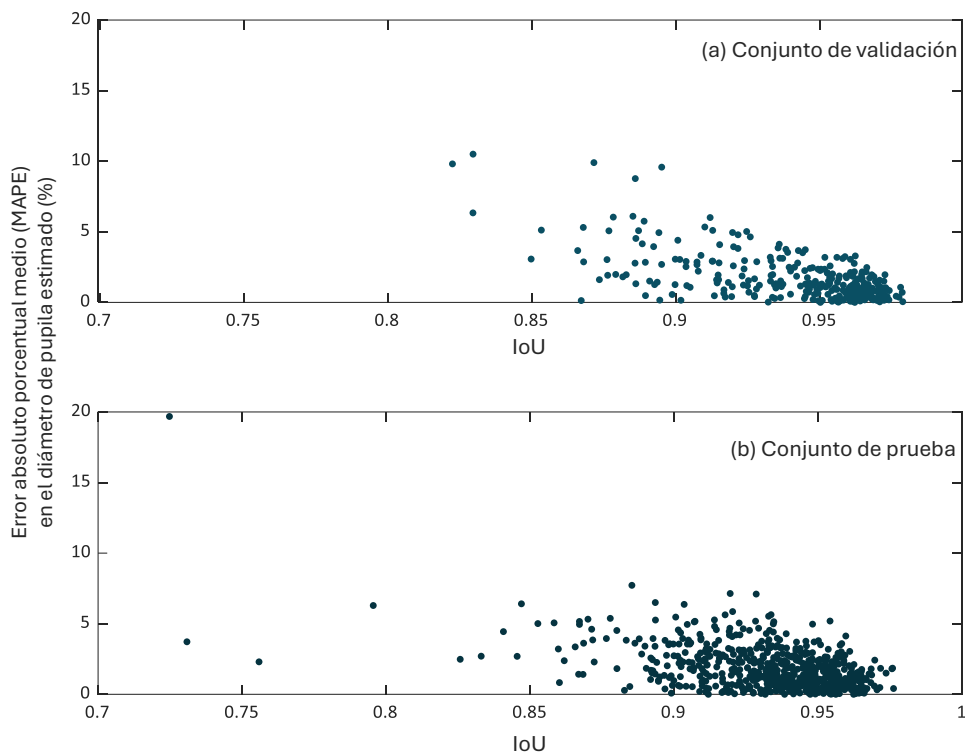


Figura 11. Diagrama de dispersión de la intersección sobre la unión (IoU) frente al error porcentual relativo medio (MAPE) de los diámetros de pupila estimados en los conjuntos de validación (a) y prueba (b).

La distribución normal de los datos (diámetro y circularidad pupilar) se evaluó utilizando la prueba de D'Agostino y Pearson y la prueba de Kolmogórov-Smirnov. No se superaron las pruebas de normalidad y, en consecuencia, se estimaron los coeficientes de correlación de rango no paramétricos (ρ de Spearman y τ de Kendall).

Los coeficientes de correlación de rango de Spearman y Kendall mostraron una fuerte asociación positiva entre los valores obtenidos manualmente y por el marco automático propuesto. El resultado demostró una excelente correlación entre las metodologías: $\rho = 0.997$, $\tau = 0.951$, valor $p < 0.0001$.

Los datos se inspeccionaron a través de la representación de un diagrama de dispersión. Se calcularon las líneas de regresión y los coeficientes de determinación. La **Figura 13** muestra un diagrama de dispersión de los diámetros pupilares etiquetados manualmente frente a los valores

estimados del enfoque basado en aprendizaje profundo. La línea ajustada fue $y=0.961x+3.04$, el valor de R^2 fue 0.994 y el coeficiente de correlación de Pearson fue 0.997.

La línea de regresión tiene una pendiente de 0.961, que podría evaluarse como un muy buen acuerdo entre métodos. En este caso, la pendiente indica que el enfoque basado en aprendizaje profundo propuesto subestima ligeramente la estimación manual. Sin embargo, una alta correlación no es necesariamente sinónimo de acuerdo entre métodos, ya que evalúa la relación y no la diferencia. Dado que el análisis de Bland-Altman puede superar esta limitación, también se aplicó esta metodología. El análisis de concordancia realizado por Bland-Altman demostró una dispersión relativamente pequeña para el procedimiento manual en comparación con el enfoque de aprendizaje profundo (**Figura 14**).

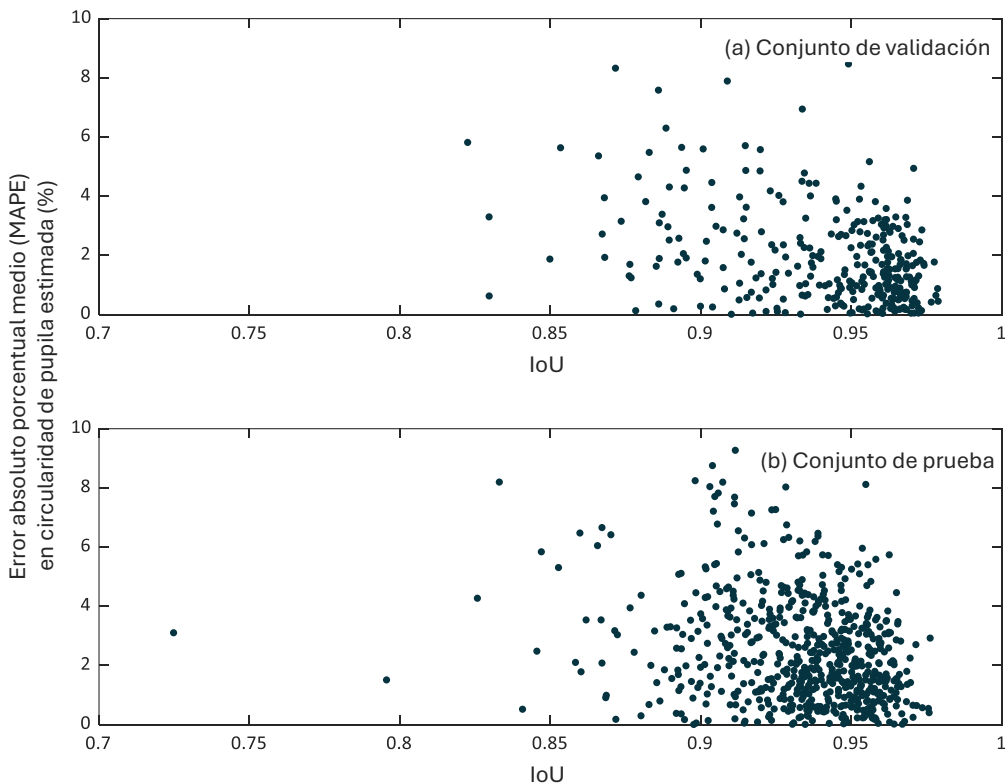


Figura 12. Diagrama de dispersión de la intersección sobre la unión (IoU) frente al error porcentual relativo medio (MAPE) de la circularidad de pupila estimada en los conjuntos de validación (a) y prueba (b).

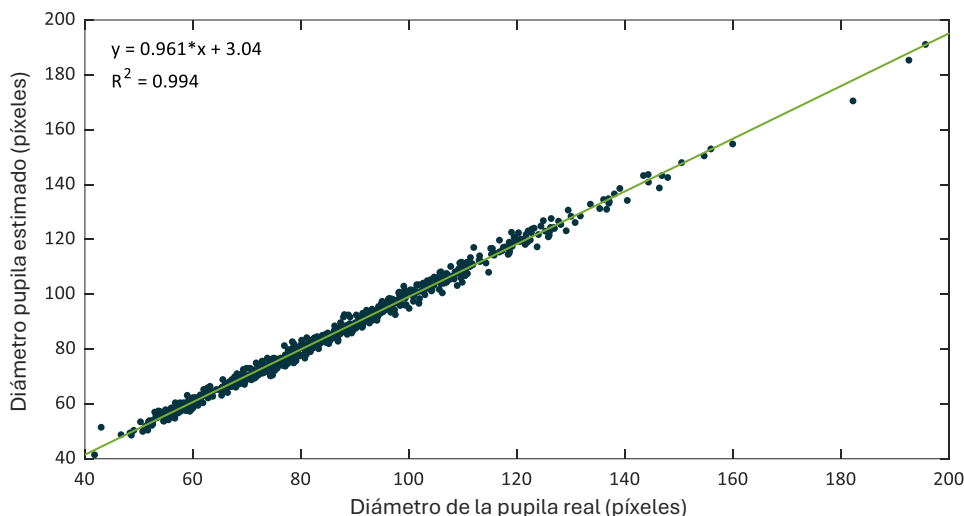


Figura 13. Diagrama de dispersión del diámetro real de la pupila frente al estimado por el enfoque propuesto.

El gráfico de Bland-Altman muestra una excelente concordancia. El sesgo relativo fue del 0.182%, siendo el intervalo de confianza del 95% (IC) de (–0.007%, –0.371%). Los límites de concordancia del 95% inferiores y superiores fueron (–4.90%, –4.26%) y (4.62%, 5.27%), respectivamente.

Las medidas estadísticas obtenidas confirman que el rendimiento del marco propuesto es adecuado para el seguimiento del tamaño pupilar en tiempo real. El sistema ha demostrado una excelente robustez en ratones con bajo contraste pupila-iris. Los estudios publicados que describen sistemas con un propósito similar rara vez presentan el rendimiento obtenido al informar métricas de segmentación comúnmente aceptadas. Como excepción, y muy recientemente, se ha informado un error de diámetro relativo promedio del 12% y un error relativo mediano del 4% para un algoritmo de aprendizaje automático aplicado a imágenes pupilares de ratas [135].

Además, una gran ventaja del método que se presenta es la falta de necesidad de ajuste manual. En [80], [82], [100], [101], se requiere que el usuario realice, en algún momento, o incluso repetidamente a lo largo del proceso, ajustes manuales en los parámetros de los algoritmos de detección. En contraste, el método propuesto en este estudio puede operar completamente de manera automática.

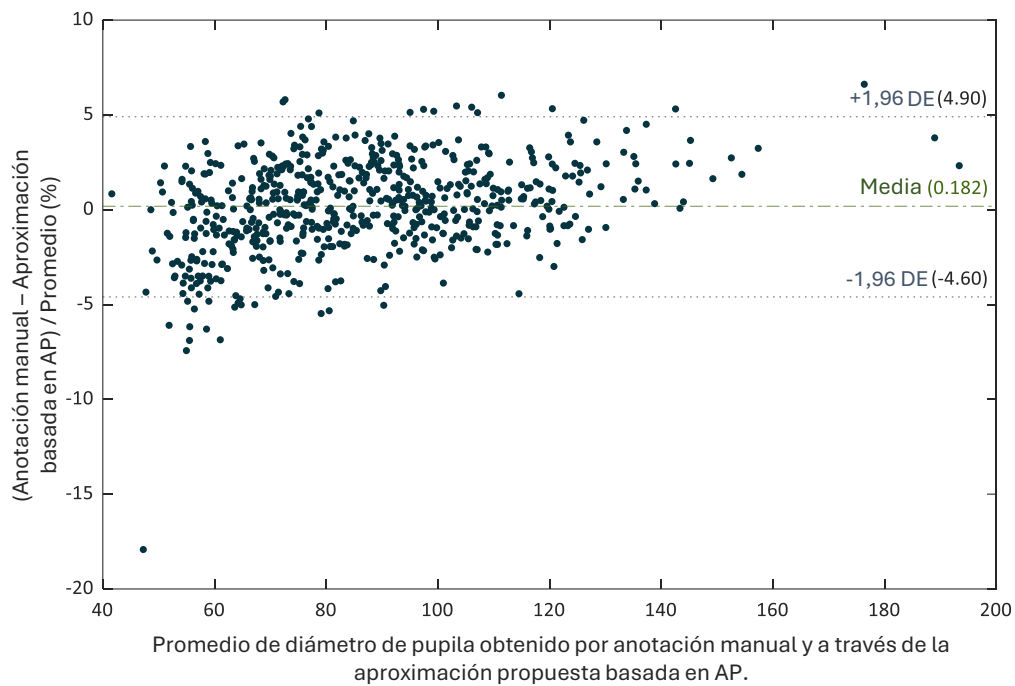


Figura 14. Diagrama de Bland-Altman del diámetro real de la pupila del terreno frente a las estimaciones del enfoque propuesto.

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PUPILAR ANTE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA DEL LC

4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PUPILAR ANTE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA DEL LC

4.1. INTRODUCCIÓN

El tamaño de la pupila está estrechamente correlacionado con la actividad de LC en monos [81], ratones [136] y humanos [137], y con la actividad noradrenérgica cortical en ratones [80], [100], [136]. La estimulación del LC, ya sea mediante impulsos eléctricos, o específicamente a través de la activación de las células noradrenérgicas del LC mediante técnicas de optogenética o herramientas quimiogénicas basadas en DREADD, produce una respuesta de dilatación pupilar [79], [138].

Desde un punto de vista fisiológico, la dilatación pupilar mediada por el LC se produce mediante la inhibición de las vías parasimpáticas a través del núcleo de Edinger-Westphal (EWN) que a su vez controla el músculo esfínter del iris. Así la activación del LC activaría mediante la unión de la noradrenalina (NA) a los receptores adrenérgicos α_2 inhibitorios. Por otro lado, la activación del tono simpático también contribuiría a la dilatación pupilar mediante la activación de receptores adrenérgicos α_1 activadores localizados en el ganglio superior cervical [79].

Este capítulo describe el estudio realizado para comprobar que la activación optogenética de las neuronas noradrenérgicas del LC produce una dilatación pupilar. De esta forma, se persigue contrastar lo indicado en estudios recientes [100], [101] que establecen que cambios en la actividad del LC es suficiente para modificar el diámetro pupilar, proporcionando un marco sólido experimental que ofrece una herramienta de gran potencial para estudiar la relación entre la actividad del LC y el tamaño de la pupila, así como la influencia del LC en diversos procesos cognitivos, conductuales, o patológicos, como los trastornos relacionados con el estrés, el dolor crónico.

4.1.1. Optogenética

La optogenética es una técnica relativamente nueva en el campo de la neurobiología, que integra el uso de la luz (óptica) y la ingeniería genética para manipular la actividad neuronal [139], [140]. Implica la transfección de neuronas con proteínas sensibles a la luz, denominadas opsinas, que,

dependiendo de la variante empleada, pueden activar o silenciar selectivamente esas neuronas mediante pulsos de luz visible [141].

Antes de la aparición de la técnica de estimulación optogenética, era difícil discriminar las vías neuronales implicadas en ciertas respuestas fisiológicas y comportamientos. La principal ventaja frente a otros métodos, como la estimulación quimiogenética o eléctrica, es la precisión temporal y anatómica que se puede lograr a través de estas herramientas [142]. Los cambios en la actividad son por tanto rápidos o inmediatos y de corta duración.

Las tecnologías que se incluyen bajo el paraguas de la optogenética se pueden dividir en dos categorías principales: a) las herramientas utilizadas para expresar opsinas en el tejido diana; y b) las utilizadas para estimular (activar/desactivar células) y/o medir la respuesta resultante.

4.1.1.1. Opsinas en mamíferos

Dado que las opsinas necesarias no se expresan naturalmente en el tejido de mamíferos, las células diana deben ser modificadas genéticamente para expresar estas proteínas.

Existen varias técnicas disponibles para introducir opsinas en células vivas, incluyendo la transfección de ADN, la electroporación y los sistemas de expresión transgénica. En el cerebro, este último método basado en la administración de genes mediada por virus se ha convertido en el método de elección para la mayoría de los neurocientíficos debido a su capacidad de dirigirse a diferentes regiones del tejido cerebral con mayor precisión (**Figura 15**).

Hay tres componentes principales en un sistema de expresión viral:

- La opsina: gen de la proteína sensible a la luz.
- El promotor: región genética que precede al gen de interés utilizada para que el gen se exprese en un tipo específico de células.
- El reportero: gen utilizado para detectar y cuantificar la cantidad de expresión de proteína, por ejemplo, un fluoróforo como es la proteína fluorescente verde (GFP).

Cada uno de estos componentes puede adaptarse para adecuarse a una pregunta de investigación específica. Por ejemplo, hay cientos de tipos diferentes de variantes de opsina disponibles, cada una con características espectrales y cinéticas únicas, que pueden utilizarse para dirigirse a

diferentes tipos de células y provocar diferentes respuestas fisiológicas. Por ejemplo, las canalrodopsinas (ChR2) son una variante de opsina excitatoria comúnmente utilizada, que activa las células en respuesta a la luz azul. Las halorodopsinas (NpHR), por otro lado, son un tipo de opsina inhibitoria que, en respuesta a la luz amarilla, permite que los iones negativos fluyan hacia la célula, inhibiendo la actividad neuronal.

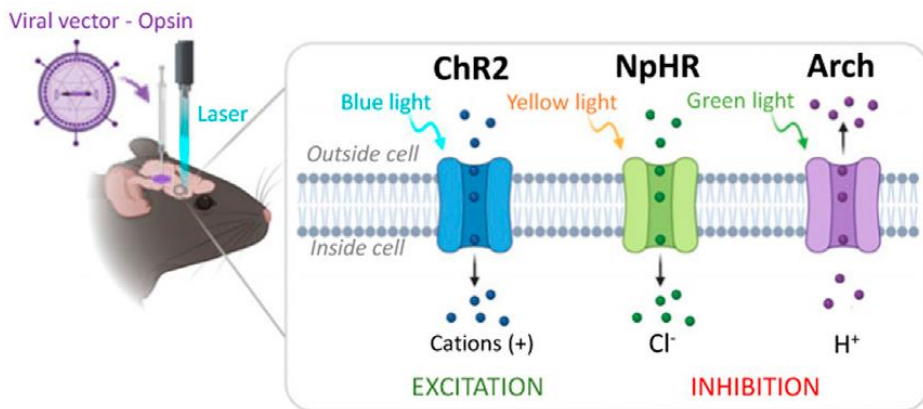


Figura 15. Implantación de opsinas en las membranas celulares de neuronas en ratones. Los receptores se activan mediante la utilización de haces de luz de longitudes de onda específicas para cada uno de ellos. En el caso de canales, estos se abren desencadenando el envío de señales excitatorias o inhibitorias regulando la excitabilidad de dicha neurona. ChR2: Canalrodopsinas, una variante de opsina excitatoria con respuesta a la luz azul. NpHR: Halorodopsinas, tipo de opsina inhibitoria con respuesta a la luz amarilla. Arch: Arqueodopsinas, tipo de opsina inhibitoria con respuesta a la luz verde. Figura adaptada de Suarez-Pereira et al., 2022 [143].

Del mismo modo, existen varios sistemas de expresión viral disponibles en el conjunto de herramientas de optogenética, cada uno diseñado para funcionar en diferentes modelos animales o facilitar diferentes tipos de expresión de opsina.

Los virus adeno-asociados (AAV) son el vector viral más utilizado en la investigación con pequeños animales debido a su especificidad para infectar el tejido neuronal y sus tasas de inflamación relativamente bajas en comparación con otros vectores virales. La administración de genes mediada por AAV tiene un papel fundamental en la investigación actual en neurociencia, ofreciendo nuevas posibilidades para adentrarse en las

complejidades de la biología cerebral y nuevas vías para la intervención terapéutica [144].

Una vez que el vector viral ha sido construido y amplificado, generalmente se utiliza la microinyección para administrar el virus a la región diana del cerebro. El virus infectará las neuronas específicas dado el promotor empleado y expresará el constructo (en este caso el gen de la opsina). Así, el subconjunto neuronal elegido tendrá la maquinaria celular adecuada para reconocer el promotor y expresar la opsina en la célula.

4.1.2. Hardware optogenético

El segundo factor importante que debe considerarse para los estudios optogenéticos son las herramientas necesarias para estimular las células que expresan opsina y medir la respuesta resultante. La mayoría de los dispositivos de focalización de luz disponibles para estudios con animales vivos implican el uso de un sistema cableado o inalámbrico montado en la cabeza, con la adición de un equipo secundario para registrar la respuesta fisiológica.

En efecto, para realizar experimentos optogenéticos es necesario transmitir luz a la región cerebral específica que expresa la opsina elegida. Para ello, se implanta quirúrgicamente una cánula óptica en la región cerebral que expresa la opsina. Un paso importante en la selección de una cánula óptica es seleccionar la longitud adecuada para alcanzar la región cerebral objetivo. Una vez implantada la cánula, se conecta una fuente de luz a través de un cable de fibra óptica y se ilumina el área debajo de la cánula. La propagación de la luz y la profundidad de penetración dependerán del tejido y de la longitud de onda de la fuente de luz.

La estimulación optogenética puede sincronizarse con ciertos eventos conductuales o equipos. Esto es posible mediante la sincronización con señales TTL o analógicas.

Al seleccionar una fuente de luz optogenética, hay que tener en cuenta dos factores clave: la longitud de onda y la intensidad de la luz requerida. En primer lugar, la opsina seleccionada tiene un espectro de activación específico y solo se activará con determinadas longitudes de onda de luz. Una opsina suele tener una longitud de onda máxima en la que precisará menor potencia para generar una respuesta. Las longitudes de onda más alejadas de la longitud de onda máxima requieren de una salida de luz más potente para inducir una respuesta optogenética. Por lo tanto, es mejor

elegir una fuente de luz cercana a la longitud de onda máxima para lograr una activación óptima. Por ejemplo, es frecuente el empleo de longitudes de onda cercanas a los 470 nm para la activación optogenética de ChR2.

La intensidad de luz necesaria depende del campo de visión y de la opsina seleccionada. El campo de visión, que depende a su vez de la fibra óptica en experimentos in vivo, determinará el tamaño del área a cubrir con la fuente de luz. Las opsinas presentan un umbral de intensidad para inducir una respuesta a la iluminación. Estas dos variables están acopladas.

Las dos fuentes de luz más comúnmente utilizadas en este contexto son las fuentes de luz LED y fuentes láser. Las diferencias entre estas fuentes radican en el ancho de banda espectral y la potencia máxima que emiten [145], [146].

Las fuentes láser se utilizan en experimentos que requieren una longitud de onda específica para la estimulación o con una alta potencia, aunque las longitudes de onda disponibles son limitadas. La principal desventaja de las fuentes láser es el riesgo de daño a los tejidos por la potencia utilizada y la necesidad de utilizar gafas de seguridad por parte de los investigadores.

Por otra parte, las fuentes LED presentan anchos de banda espectrales más amplios que sus homólogas láser y en un rango de longitudes de onda disponibles mayor. La potencia máxima de emisión es inferior a la del láser, pudiendo verse disminuida en mayor o menor medida si se aplican filtros ópticos para eliminar partes del espectro de emisión. Otra de las ventajas de estas fuentes es su seguridad para los sujetos del experimento y para el investigador no siendo necesario el uso de gafas protectoras.

4.1.2.1. Protocolos optogenéticos usados para la activación de las neuronas noradrenérgicas del LC

Son varios los protocolos de estimulación optogenética que han sido diseñados y empleados para investigar la función del LC y sus proyecciones. Estos protocolos se pueden clasificar en dos categorías principales: tónicos y fásicos. Pero la heterogeneidad del LC y la complejidad de sus efectos dificultan una categorización simple. El LC muestra dos tipos de actividad: el modo tónico es alto en la vigilia y bajo en el sueño, y está implicado también en el estrés, la excitación, la ansiedad y en el procesamiento del dolor. El modo fásico ocurre en la presentación de estímulos destacados o ante tareas conductuales [147], [148], [149], y está relacionado con la liberación de NA en áreas de proyección [150].

Protocolos Tónicos: Estimulación Sostenida

Los protocolos tónicos se sustentan en una estimulación continua o sostenida, sin interrupciones significativas. La luz se aplica durante un período largo y uniforme, lo que provoca una activación constante de las neuronas o células, lo que podría simular una estimulación de bajo nivel de frecuencia durante un período largo. Se distingue entre baja y alta frecuencia.

El protocolo tónico de Baja Frecuencia (3 Hz) implica la administración continua de pulsos de luz durante un período prolongado, como 1 hora. Carter et al. (2010) [151] reportaron que la activación tónica a 3 Hz durante varias horas puede aumentar la duración de la vigilia y disminuir la duración del sueño no REM en ratones, como consecuencia de la activación del LC.

McCall et al. (2015) [38], [152]: Usaron un protocolo de activación tónica a 5 Hz durante 24 horas para investigar el papel del LC en la ansiedad. Observaron que la estimulación optogenética prolongada del LC produjo efectos ansiogénicos en ratones, lo que implica la liberación de galanina.

Harley y Yuan (2021) [153] describieron cómo el empleo de un protocolo tónico de alta frecuencia (5-20 Hz) durante períodos más cortos, de en torno a 20 segundos, puede provocar diferencias conductuales en ratones. Este efecto se atribuyó a una disminución de la liberación de noradrenalina [153]. Es importante destacar que la probabilidad y la latencia del paro varían con la frecuencia de estimulación, pero no con la duración. Harley y Yuan (2021) [153] también demostraron que la activación tónica a 3 Hz durante 1 hora resulta en la expresión de *c-fos* en dos tercios de las neuronas LC ipsilaterales y un 30% en el contralateral. La expresión de *c-fos* se utilizaba como un marcador de actividad neuronal, lo que sugiere la activación de las neuronas del LC.

Protocolos Fásicos: Activación Interrumpida

Los protocolos fásicos se basan en una estimulación pulsada o intermitente, con luz en intervalos específicos o de forma periódica. La luz puede encenderse y apagarse de manera rápida o con intervalos definidos, lo que puede simular patrones de actividad neuronal que se asemejan a impulsos o picos rápidos de señal. Este tipo de estimulación es útil para estudiar respuestas neuronales a cambios rápidos en la señal, como las activaciones a alta frecuencia que se encuentran en las señales cerebrales naturales (por ejemplo, en las oscilaciones de alta frecuencia).

Los protocolos fásicos de corta duración (0.5 segundos cada 20 segundos) implican la administración de breves ráfagas de pulsos de luz, con períodos de silencio intercalados. Carter et al. (2010) [151] reportaron que la activación fásica del LC a 10 Hz durante 0.5 segundos cada 20 segundos aumentaba la duración de la vigilia y el sueño no REM a niveles similares a los observados durante el período activo en ratones.

Un protocolo fásico de larga duración, por ejemplo, durante 60 segundos, parece imitar más estrechamente la activación tónica en términos de duración, pero se clasifica como fásico debido a su naturaleza transitoria. Hickey et al. (2014) [33] utilizaron un protocolo de luz continua durante 60 segundos antes de la aplicación de un estímulo nociceptivo térmico para estudiar el papel del LC en la modulación del dolor. Encontraron que la estimulación optogenética del LC produjo cambios en la nocicepción térmica, dependiendo de la ubicación de la fibra óptica.

Una variante fásica consiste en aplicar un protocolo fásico emparejado con estímulos sensoriales (500 ms a 20 Hz). Este protocolo implica la administración de pulsos de luz coincidentes con la presentación de un estímulo sensorial, como un tono. Martins et al. (2015) [154] emplearon un protocolo fásico que implicaba la administración de pulsos de luz de 500 ms a 20 Hz, coincidentes con la presentación de un tono de 500 ms, para investigar el papel del LC en la plasticidad cortical. Descubrieron que la estimulación optogenética del LC promovió cambios a largo plazo en la codificación de frecuencia en la corteza auditiva.

Por otro lado, Uematsu et al. (2017) [39] investigaron el papel del LC en el condicionamiento del miedo utilizando protocolos fásicos para inhibir o activar las proyecciones del LC a diferentes regiones del cerebro. Sus hallazgos sugieren que el LC modula el miedo y la extinción de una manera específica de la vía.

Selección del protocolo optogenético

Los protocolos de estimulación optogenética son herramientas poderosas para investigar la función del LC y sus proyecciones en una variedad de procesos, como el dolor, la ansiedad, el aprendizaje y la memoria. La selección del protocolo adecuado es crucial para obtener resultados significativos y relevantes para la pregunta de investigación en cuestión.

La elección del protocolo optogenético depende en gran medida de la pregunta de investigación específica. Los protocolos tónicos son

adecuados para investigar los efectos de la activación sostenida del LC, mientras que los protocolos fásicos son más apropiados para estudiar los efectos de la activación transitoria y la interacción del LC con otros circuitos neuronales.

Se ha comprobado que la estimulación optogenética del LC, utilizando luz azul para activar neuronas LC que expresan ChR2, induce una dilatación pupilar inmediata y pronunciada [155]. Este efecto se observa de forma consistente en ratones despiertos y con la cabeza fijada [101]. Además, estudios recientes han descrito como la pupilometría puede discriminar entre modos de activación del LC. Se ha comprobado que la estimulación fásica induce una respuesta pupilar transitoria, mientras que la tónica produce una dilatación gradual [82].

Como se ha indicado con anterioridad, además de la duración y la frecuencia de la estimulación, otros factores como la potencia de la luz, el tamaño de la fibra óptica y la ubicación del objetivo también pueden influir en los resultados. La heterogeneidad del LC agrega otra capa de complejidad, ya que diferentes subconjuntos de neuronas LC pueden responder de manera diferente a la estimulación optogenética.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Animales

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz, de acuerdo con la Directiva de la Comisión Europea (2010/63/EU) y la Ley Española (RD 53/2013) que regula la investigación animal.

Se utilizaron ratones adultos C57BL/6J machos y hembras TH-Cre con un peso entre 20 y 35 gramos que fueron mantenidos en habitaciones separadas según su sexo alojados en jaulas de plexiglás transparentes bajo condiciones estándar de laboratorio, (temperatura constante de 22°C, ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua *ad libitum*).

4.2.2. Vectores virales

Se utilizó como vector viral AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP para la fotoactivación del LC con una concentración de 5.2×10^{12} gc/ml.

4.2.2.1. Administración de vectores virales y fibras de optogenética

Antes de todos los procedimientos quirúrgicos, los ratones fueron anestesiados en una cámara de inducción con isoflurano al 4% en volumen y posteriormente, colocadas en una plataforma estereotáxica donde se mantuvieron con isoflurano al 2%.

La cirugía se realizó en condiciones estériles, siguiendo los procedimientos descritos en [151]. Bajo control microscópico, se realizó una craneotomía utilizando un taladro quirúrgico de alta velocidad. A continuación, se introdujeron agujas de inyección en la zona adyacente al LC izquierdo (coordenadas desde bregma: -5.5 (machos) o -5.4 (hembras) anterior-posterior (AP), -1.00 medial-lateral (ML), -3.6 mm dorsal-ventral (DV) [156]. Los vectores virales se inyectaron en el LC a una velocidad de 200 nL/min, con un volumen total de 500 nL en una sola administración en el LC izquierdo. Posteriormente, se implantó una fibra óptica [$200\mu\text{m}$ de diámetro, $0,66$ de apertura numérica y 3 mm de longitud] (MFC_200/250-0,66_3 mm_ZF1,25_FLT, Doric Lenses) en las coordenadas relativas a la inyección del virus 0.00 AP, -0.25 ML, $+1.00$ DV. La fibra se cubrió con pegamento tisular y, para una mejor sujeción del implante, se implantaron dos tornillos de acero y se cubrió todo con cemento dental.

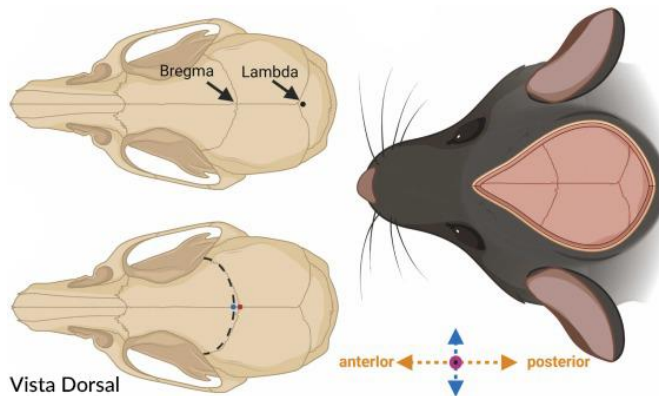


Figura 16. Sistema de coordenadas estereotáxicas de referencia en ratones [26].

4.2.2.2. Anestesia y condiciones de experimentación

Tres semanas tras la administración de los vectores virales y la implantación de fibras, se realizó la monitorización bilateral de las pupilas tras la activación de las neuronas del LC izquierdo mediante optogenética.

Para ello, los animales se extrajeron del animalario al menos 30 minutos antes del inicio del experimento y se llevaron a la sala con iluminación controlada a 15 lux para habituarse a dichas condiciones lumínicas y temperatura de 20-22°C. Al iniciar el experimento, los ratones fueron anestesiados en una cámara de inducción con isoflurano al 4% en volumen y posteriormente, colocadas en la plataforma de pupilometría donde se mantuvieron con isoflurano al 1-2% según su peso durante el tiempo restante. El registro de las pupilas comenzó con una fase inicial de 400 segundos (periodo basal) en los que los animales permanecieron bajo leve anestesia sin recibir ningún estímulo y posteriormente se sometieron al protocolo de optogenética elegido.

4.2.3. Registro y estimulación optogenética

4.2.3.1. Pupilómetro

Para la realización de la pupilometría bilateral durante las estimulaciones del LC mediante técnicas de optogenética se empleó la plataforma y aplicaciones desarrolladas para tal efecto y descritas en el Capítulo 3. No se precisaron nuevos elementos de sujeción para el animal y/o útiles.

4.2.3.2. Subsistema de registro de optogenética

Partiendo del sistema desarrollado anteriormente para el control y adquisición de los registros en video de las cámaras, y para realizar experimentos con estimulación optogenética fue necesario agregar nuevas funcionalidades que habilitasen el control del generador de estímulos y ofrecieran al investigador la personalización de los parámetros necesarios para su correcta configuración.

Hardware

El montaje experimental completo se puede visualizar en la **Figura 17**. Los dispositivos de estimulación optogenética constan de varios componentes siendo el generador de estímulos y el controlador de los LEDs los principales módulos.

El generador de estímulos está controlado por un software específico que permite al investigador definir con exactitud los parámetros del estímulo que se utilizará durante el experimento, denominado tren (de estímulos). Un tren está compuesto por una señal de ancho de pulso variable (PWM) en los que se define el ancho de pulso, el tiempo a nivel alto (instantes en los que se produce la emisión de luz), la frecuencia de la señal PWM y la duración del grupo o el número de veces que se repetirá dicha señal. El conjunto

forma un grupo, que se repetirá bien durante una duración global concreta o bien por un número de veces determinado. Según la estimulación que se quiera realizar, es posible que sea necesario incluir un tiempo de separación entre los trenes y los grupos (**Figura 18**).

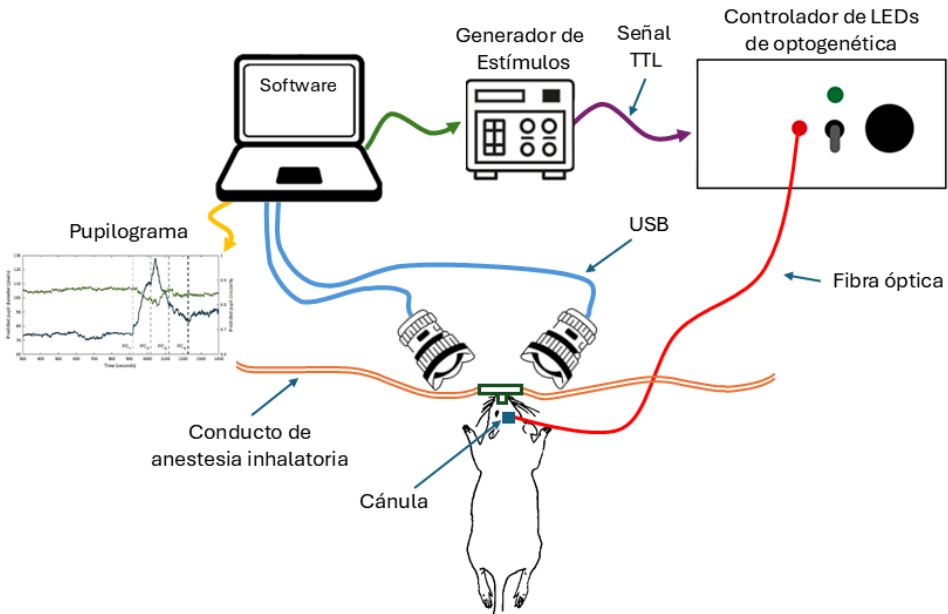


Figura 17. Montaje experimental para el registro bilateral de pupila con control de la estimulación optogenética.

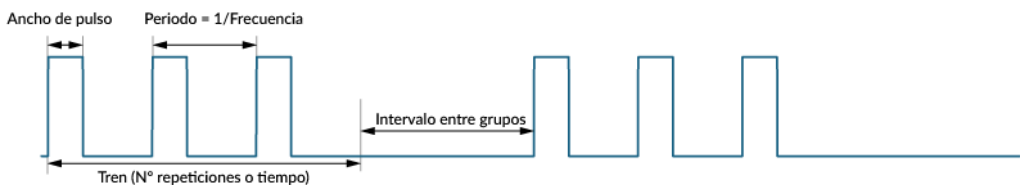


Figura 18. Descripción de los parámetros que definen una estimulación.

Para los experimentos desarrollados en este estudio, se utilizó un dispositivo PulserPlus de Prizmatix [157]. La comunicación con este dispositivo se realizó directamente mediante el envío de la configuración del tren de estímulos a través del puerto serie. El fabricante ofrece en el manual del dispositivo el protocolo de texto para comunicarse con el

dispositivo, configurarlo y activar o detener la generación de señales a su salida [158].

Protocolo optogenético

En este estudio, se utilizó un protocolo de estimulación basado en el protocolo 3 descrito por McCall et al. en [38]. Dicho protocolo tiene como objetivo incrementar la tasa de descarga de las neuronas del LC, con demostrados efectos ansiogénicos.

La estimulación consiste en un tren de estímulos de frecuencia 5Hz, con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos. El periodo de 3 minutos de transmisión va seguido de otro periodo de 3 minutos de silencio o reposo. El ciclo se repite tres veces consecutivas, como se ilustra en la **Figura 19**.

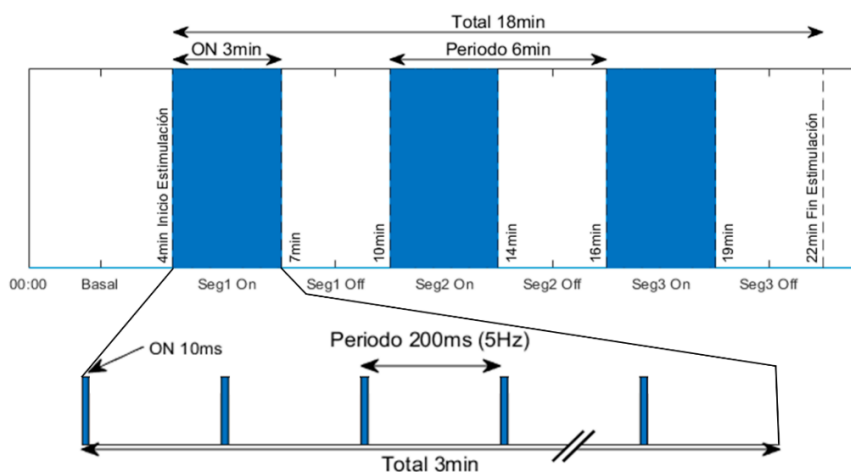


Figura 19. Protocolo de estimulación optogenética utilizado.

4.2.3.3. Estimulador de optogenética

Para la excitación lumínica de las opsinas implantadas anteriormente se utilizó una fuente de luz Optogenetics-LED-Blue de Prizmatix de 470nm. Esta fuente de luz tiene una entrada TTL compatible con el generador de estímulos descrito anteriormente, y su salida se conecta directamente a un conector de fibra óptica SMA.

La potencia de salida medida en la punta de la fibra de 1m es superior a 380mW, según los datos proporcionados por el fabricante, aunque es regulable, bien mediante una entrada analógica o manualmente. Durante

los experimentos realizados en este estudio, la potencia se mantuvo constante a un valor del 35%.

En la **Figura 20** se puede observar la distribución espectral del LED utilizado frente a la respuesta espectral de las opsinas ChR2 utilizadas.

Software

La aplicación desarrollada para la adquisición y procesado de video binocular, descrita en el Capítulo 3, fue concebida con un enfoque modular que permitió agregar nuevas funcionalidades conforme la complejidad del marco experimental crecía.

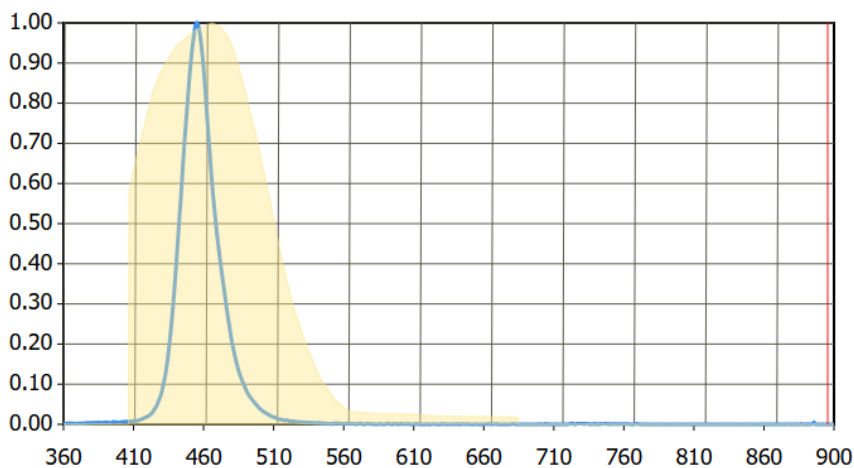


Figura 20. Comparativa del espectro de emisión del Optogenetics-LED-Blue y las opsinas ChR2. Cortesía de Prizmatix [28].

Para añadir funcionalidades relacionadas con la experimentación usando técnicas de optogenética, se añadió un nuevo módulo, como una pestaña adicional en la aplicación principal. Este módulo puede ser activado o desactivado al arrancar la aplicación, con objeto de reducir la carga computacional si no se hace uso de él, y de esta forma minimizar la pérdida de tramas de video en el proceso de adquisición.

Se implementaron dos modos de funcionamiento, para permitir un control avanzado del generador de estímulos. En el modo simple, activado por defecto, los estímulos se pueden caracterizar definiendo la frecuencia, el ancho de pulso y la duración total del estímulo. Para la generación de estímulos más complejos, como era el caso de los utilizados en este estudio, fue preciso generar repeticiones del estímulo definiendo la

separación entre estas repeticiones. Los cambios realizados en estos parámetros se reflejan en la gráfica implementada en la interfaz, permitiendo al usuario visualizar el tren de pulsos que se utilizará en la estimulación (**Figura 21**).

La interfaz incluye además la posibilidad de incrustar etiquetas incrustadas en el video. Se definieron tres etiquetas por defecto (marca de tiempo, estimulaciones izquierda y derecha) y una cuarta personalizable.

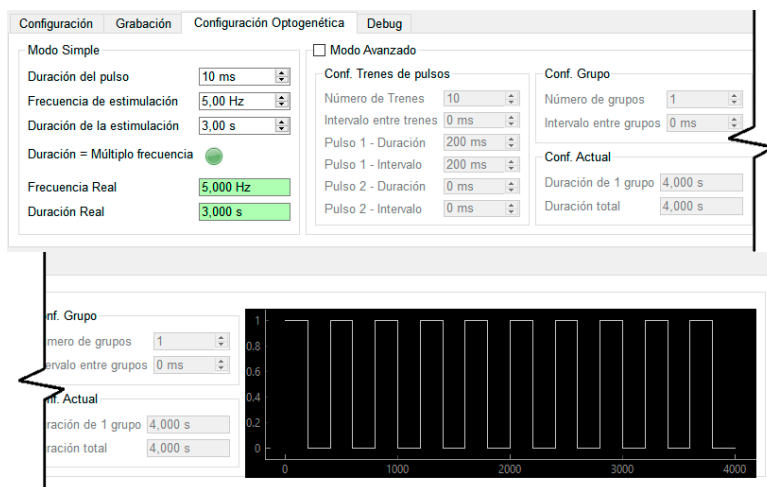


Figura 21. Interfaz desarrollada para el control de la estimulación optogenética en la aplicación de registro de pupilometría.

4.2.4. Conjunto de datos

Para este experimento se utilizó un conjunto de datos compuesto de 7 hembras y 4 machos, de los que se obtuvo un registro de la pupilometría de ambos ojos con las correspondientes etiquetas de la estimulación optogenética.

4.2.4.1. Estimación del pupilograma

Como se describió en el Capítulo 3, el algoritmo de detección de la pupila utiliza una red neuronal entrenada mediante técnicas de aprendizaje profundo (arquitectura SOLOv2). El modelo otorga a su salida una imagen en la que se marca la región identificada como la pupila. El diámetro de la pupila se calcula como la distancia mayor entre los píxeles de la región seleccionada. Este diámetro, junto a las etiquetas que fueron incrustadas

durante el experimento, se almacenan en un archivo separado por comas para su posterior tratamiento y análisis.

4.2.4.2. Procesado del pupilograma

Los pupilogramas generados por el modelo de aprendizaje automático se almacenaron en un fichero de texto con valores separados por comas (CSV). Se desarrolló una aplicación empleando el software MATLAB para visualizar y filtrar las series temporales con los datos pupilares, y para facilitar la extracción de los fragmentos de interés (**Figura 22**).

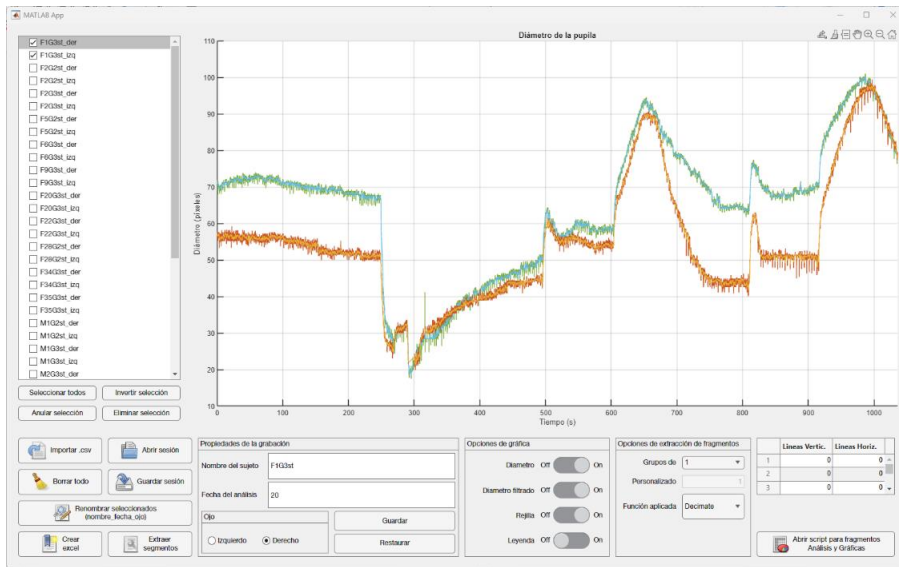


Figura 22. Interfaz desarrollada para la visualización y tratamiento de los datos de pupilometría extraídos de los videos registrados durante las sesiones experimentales.

Las series temporales resultantes contienen una cantidad importante de ruido y artefactos. Por ello, se aplicó un filtrado adaptado a su uso en ratones, a partir del desarrollado en 2019 por Kret y Sjak-Shie [160] para su uso en humanos con el fin de para generar una señal de salida suave y continua. Este filtrado persigue la eliminación de fragmentos aislados de la serie temporal por errores en la detección, la eliminación de valores atípicos y el suavizado de la curva mediante un filtrado pasa-banda. Los parámetros para el filtrado propuesto por Kret y Sjak-Shie se recogen en la **Tabla 5**.

Además, las señales extraídas directamente de los archivos contienen artefactos que provocan inconsistencias en la cuantificación del diámetro de la pupila en determinados instantes.

Estos artefactos tienen su origen en los movimientos respiratorios del animal durante el proceso de registro, en la aplicación del gel ocular para la lubricación del ojo, o en errores en la segmentación. Estos artefactos se manifiestan de diferentes formas según su causa.

Tabla 5. Parámetros de filtrado del pupilograma.

Criterios de filtrado del rango de pupilas			Criterios de filtro de eliminación de bordes		
PupilDiameter_Min	10	(px)	gapDetect_minWidth	400	(ms)
PupilDiameter_Max	200	(px)	gapDetect_maxWidth	1000	(ms)
Criterios de filtrado de muestras aisladas			gapPadding_backward	200	(ms)
islandFilter_islandSeperation_ms	200	(ms)	gapPadding_forward	200	(ms)
islandFilter_minIslandWidth_ms	500	(ms)	Criterios de filtro de desviación		
Criterios de filtrado de la velocidad de dilatación			residualsFilter_passes	4	(# of passes)
dilationSpeedFilter_MadMultiplier	10	(# of MADs)	residualsFilter_MadMultiplier	10	(# of MADs)
dilationSpeedFilter_maxGap_ms	200	(ms)	residualsFilter_interpFs	100	(Hz)
				1	(Hz)

La respiración provoca un desenfoque en la imagen y causa que el diámetro de la pupila detectado sea de menor tamaño al real. En la **Figura 23** se puede apreciar este fenómeno, que se presenta de manera cíclica, superpuesto al pupilograma.

Los errores en la segmentación pueden causar valores anómalos. En la **Figura 24** pueden observarse algunos de estos errores.

Para atenuar estos efectos en la señal resultante, se aplicaron técnicas correctoras, derivadas de la propuesta de Privitera et al. [24], para eliminar medidas de pupila con coordenadas centrales fuera rango, y para suprimir grupos de puntos aislados durante un intervalo de tiempo dado y cuya duración fuera inferior a la especificada. La **Figura 25** ilustra este efecto indeseado y la resultante de aplicar las medidas mitigadoras del mismo.

Finalmente, se aplicó el método de Savitzky–Golay [161] con una ventana de 15 segundos y grado 10 para generar la versión final de la serie temporal empleada para la determinación de los índices cuantitativos de la dinámica pupilar. El resultado se aprecia en la **Figura 26**.

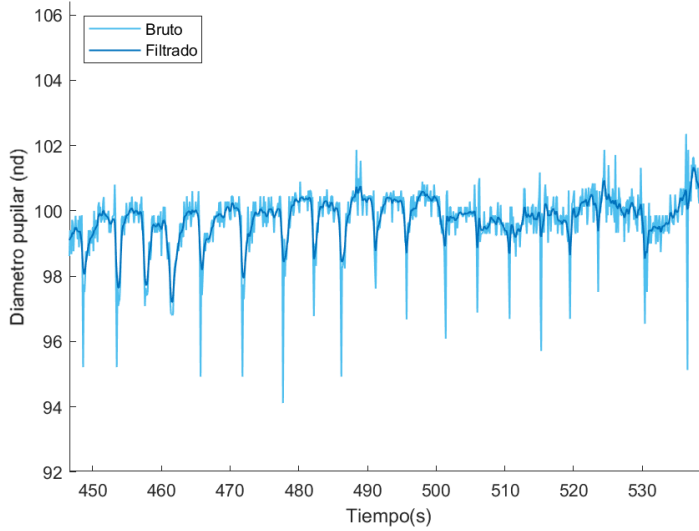


Figura 23. Ruido debido a los movimientos respiratorios del ratón.

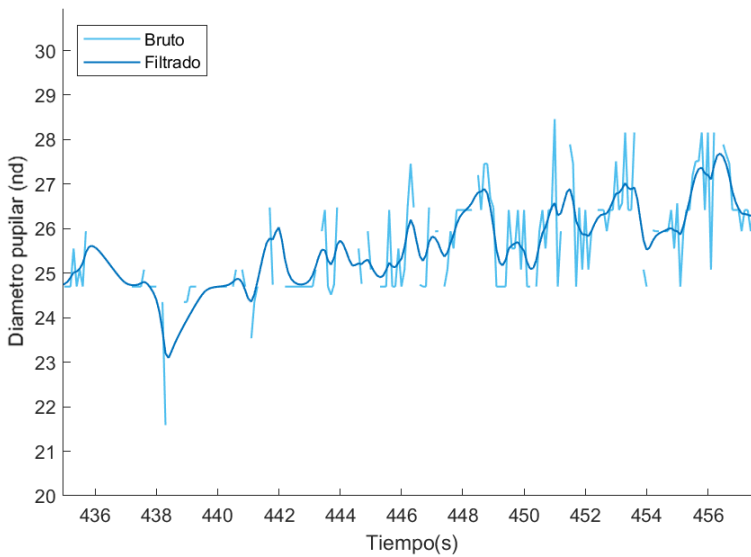


Figura 24. Discontinuidades debidas a errores en el modelo en la detección del diámetro de la pupila.

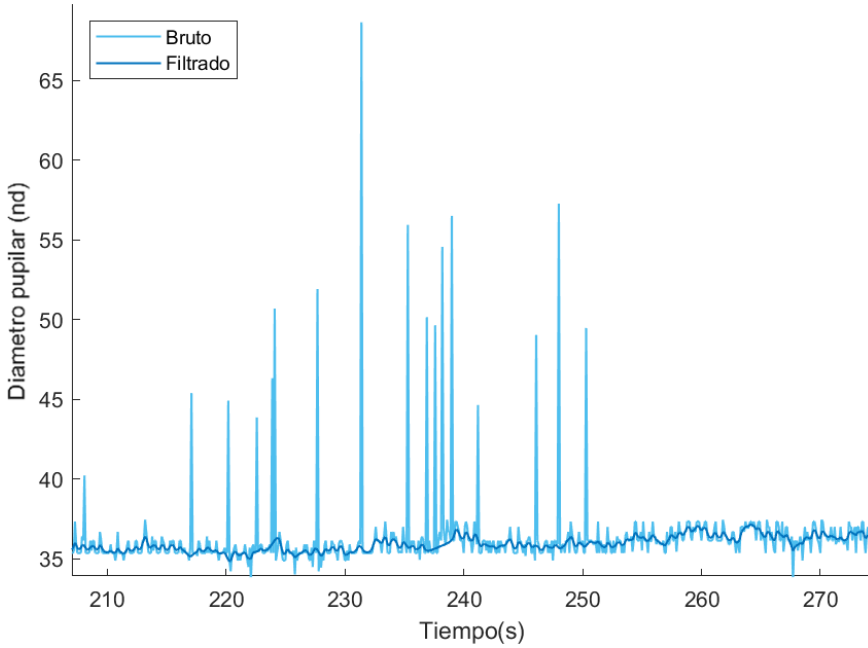


Figura 25. Artefactos presentes en el pupilograma causados por las medidas de pupila con coordenadas centrales fuera de rango, a causa de los movimientos respiratorios del animal.

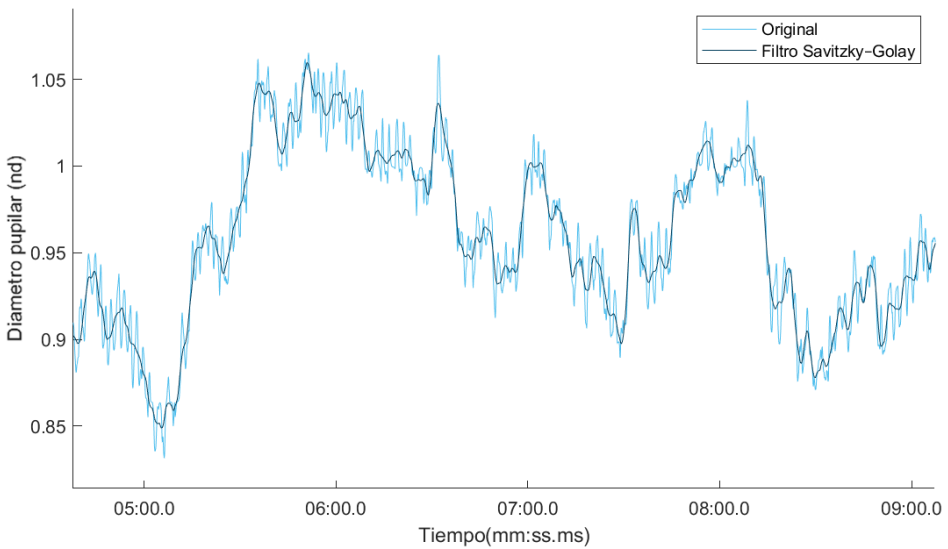


Figura 26. Comparativa de la respuesta tras el filtrado adicional mediante el filtro de Savitzky-Golay.

4.2.4.3. Segmentación y etiquetado

La interfaz desarrollada permitía extraer los segmentos de interés de las señales, a partir de ventanas temporales definidas por el investigador. Para facilitar su tarea, podían emplearse las etiquetas de video detectadas automáticamente. Cada segmento se almacenaba en un fichero de texto, que incluía el pupilograma en bruto y filtrado, de todos los datos de los animales seleccionados para su procesado.

4.2.5. Caracterización de la dinámica del pupilograma

El estudio de la dinámica de la respuesta pupilar frente a diferentes estímulos proporciona información valiosa sobre los mecanismos subyacentes en el sistema nervioso autónomo y su interacción con el entorno. Como se ha indicado con anterioridad, esta dinámica está determinada por una combinación de procesos fisiológicos, incluyendo la actividad del músculo esfínter del iris, controlado por el sistema parasimpático, y el músculo dilatador del iris, influenciado por el sistema simpático. La caracterización temporal de estas respuestas permite identificar patrones y diferencias asociadas a estados fisiológicos, patológicos o condiciones externas.

En el campo de la ingeniería de control, ciertos índices se emplean para describir y analizar el comportamiento transitorio de sistemas dinámicos [162]. Estos índices han demostrado ser útiles no solo en sistemas de control clásicos de primer y segundo orden, sino también en aplicaciones biomédicas, donde los principios de análisis temporal pueden aplicarse al estudio de respuestas fisiológicas [163], [164].

La aplicación de estos conceptos a la respuesta pupilar puede proporcionar una perspectiva cuantitativa y estandarizada para comparar respuestas bajo distintas condiciones de estímulo o entre grupos de individuos. El análisis temporal de la respuesta pupilar mediante estos índices permite una caracterización más precisa y cuantitativa que el uso exclusivo de métodos descriptivos o cualitativos. Estos índices facilitan la comparación entre diferentes individuos, condiciones fisiológicas o experimentales, y podrían servir como biomarcadores potenciales para el diagnóstico o seguimiento de trastornos neurológicos o autonómicos. Además, su base en principios bien establecidos de ingeniería de control garantiza la reproducibilidad y robustez del análisis, integrando herramientas de otras disciplinas al estudio biomédico.

Se relacionan a continuación los índices propuestos para la caracterización de la dinámica de la respuesta pupilar ante estímulos, no solo optogenéticos, como los descritos en este capítulo, sino nociceptivos, empleados en los capítulos siguientes. La **Figura 27** ilustra cada uno de estos índices sobre una respuesta pupilar estándar en respuesta a un estímulo externo.

Retardo (t_d): Tiempo medido en segundos que permite cuantificar el desfase en la respuesta de un ojo respecto al otro. Se calcula como la diferencia entre los instantes que preceden a la dilatación pupilar causada por un estímulo.

Amplitud de pico (V_{max}): Máxima dilatación alcanzada por la dilatación pupilar en la respuesta inicial. Es especialmente relevante para evaluar la capacidad máxima de reacción del sistema pupilar frente a un estímulo, lo que puede estar influenciado por la intensidad del estímulo, la sensibilidad del sistema autonómico y la eficiencia de los mecanismos simpáticos y parasimpáticos en la regulación de la respuesta pupilar, especialmente en el contexto de estímulos rápidos o intensos. Este parámetro se combina con el tiempo de pico (t_{max}) para analizar tanto la amplitud como el momento de la respuesta. Tiempos de pico prologados podrían sugerir un retardo en la activación del sistema nervioso simpático o parasimpático. De él se derivan otros parámetros como la constante de tiempo (t_{63}) y el tiempo de subida (t_{subida}).

Constante de tiempo (t_{63}): Tiempo en segundos que tarda la respuesta en alcanzar el 63% de su valor máximo, también conocido como constante de tiempo. Puede interpretarse como una medida de la rapidez general del sistema ante un estímulo, ya que indica cómo evoluciona el sistema hacia su estado estacionario. Este índice también es útil para comparar diferentes condiciones de estímulo-respuesta, identificando posibles retardos o deficiencias en la dinámica del sistema.

Tiempo de subida (t_{subida}): Intervalo de tiempo medido en segundos que transcurre desde que la respuesta alcanza un porcentaje inicial del 10% su valor máximo hasta que alcanza el porcentaje del 90%. Este índice describe cuán rápido reacciona la pupila ante un estímulo, reflejando la velocidad de activación del sistema nervioso responsable del cambio de diámetro. Un menor tiempo de subida indica una respuesta más rápida, lo que podría estar relacionado con mayor sensibilidad o eficiencia en la transmisión de señales.

Respuestas máximas a 30 y 60 segundos ($V_{\max30}$, $V_{\max60}$): Máxima dilatación alcanzada por la pupila dentro del intervalo de tiempo de 30 ($V_{\max30}$) y 60 ($V_{\max60}$) segundos posteriores al estímulo, medida en unidades relativas respecto al diámetro inicial previo al estímulo (basal). Este índice representa el pico máximo de respuesta dentro del período especificado, proporcionando información sobre la amplitud máxima transitoria de la respuesta pupilar. En general, captura el máximo de dilatación, incluso si ocurre de forma rápida y momentánea dentro del intervalo de 30 segundos, y proporciona una aproximación a la fuerza del estímulo y su capacidad para generar una respuesta marcada antes de que comience la estabilización o recuperación.

Tiempos de respuestas máximas a 30 y 60 segundos ($t_{\max30}$, $t_{\max60}$): Intervalo de tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo hasta que se alcanza el valor máximo de dilatación dentro de los primeros 30 ($t_{\max30}$) o 60 ($t_{\max60}$) segundos posteriores al estímulo. Este parámetro combina la dinámica inicial de la respuesta con una restricción temporal, lo que lo hace particularmente útil para evaluar la rapidez y amplitud máxima dentro de un periodo específico. Alteraciones en estos índices pueden indicar disfunciones en los mecanismos de control autonómico, especialmente en la activación inicial.

Velocidades de respuestas máximas a 30 y 60 ($Vel_{\max30}$, $Vel_{\max60}$): Cociente entre la máxima dilatación alcanzada en los primeros 30 ($V_{\max30}$) o 60 ($V_{\max60}$) segundos tras el estímulo y el tiempo necesario para alcanzar dicha dilatación ($t_{\max30}$ o $t_{\max60}$). $Vel_{\max30}$ proporciona información sobre la rapidez y eficiencia con la que el sistema pupilar reacciona al estímulo en términos de su amplitud máxima inicial. Al extender el análisis a un intervalo temporal más largo, $Vel_{\max60}$ permite capturar respuestas que tienen dinámicas más lentas o sostenidas.

Respuesta a 30, 60, 90 y 120 segundos (V_{30} , V_{60} , V_{90} , V_{120}): Se refieren al cambio en el diámetro de la pupila observado 30 (V_{30s}), 60 (V_{60s}), 90 (V_{90s}) y 230 (V_{120s}) segundos después del estímulo, medido en unidades relativas respecto al diámetro inicial previo al estímulo (basal). Frente a otros índices transitorios, estos índices cuantifican la magnitud de la respuesta sostenida a medio y largo plazo del sistema pupilar frente al estímulo, reflejando el estado estacionario o la dinámica de recuperación en el intervalo temporal especificado. Desde un punto de vista fisiológico, estos índices permiten evaluar la capacidad de la pupila para mantener o

alcanzar un estado estable tras el estímulo, lo cual puede estar relacionado con mecanismos autonómicos de regulación. También puede permitir detectar diferencias individuales en la amplitud máxima sostenida de la respuesta pupilar, que pueden depender de factores como la intensidad del estímulo, la fatiga o condiciones patológicas.

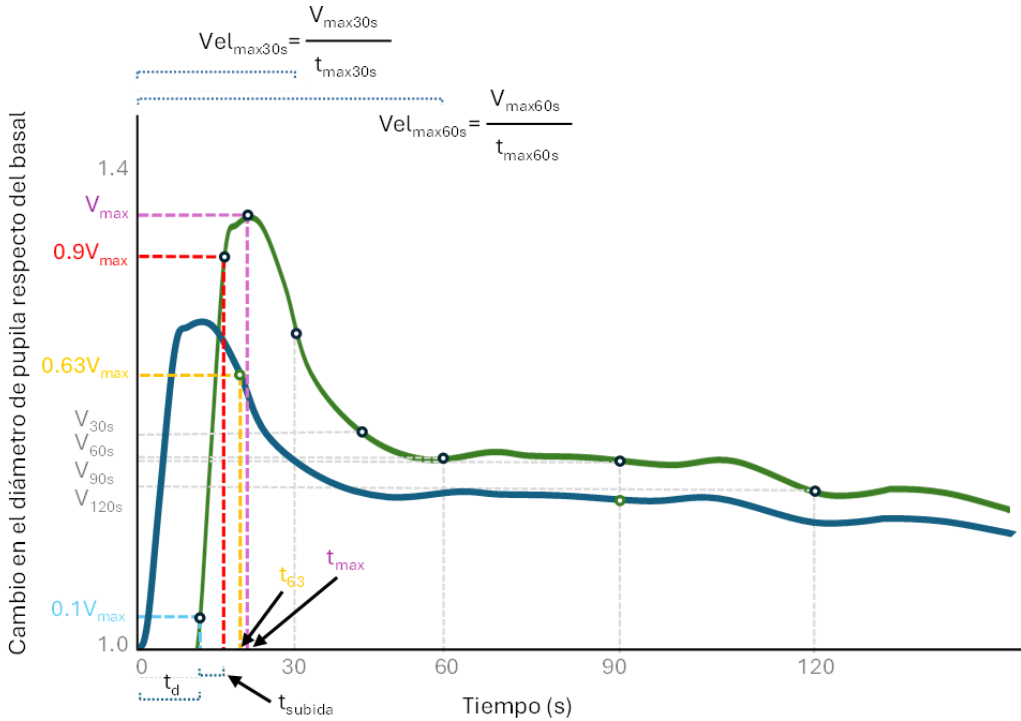


Figura 27. Ilustración de los índices seleccionados para la caracterización de la respuesta temporal del pupilograma. Se ilustra un comportamiento típico en el pupilograma del ojo izquierdo (verde) y derecho (azul), en respuesta a un estímulo optogenético.

4.2.6. Análisis estadístico

A partir de los pupilograma resultantes para el grupo de sujetos experimentales, se estimaron en cada caso los índices definidos en la sección anterior. Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM).

Los resultados de las comparaciones estadísticas se representaron gráficamente para facilitar la interpretación. Para cada tipo de

estimulación, se calculó el pupilograma medio de la respuesta pupilar. Estos pupilogramas muestran la evolución de la dilatación pupilar promedio a lo largo del tiempo. Los intervalos de confianza del 95% se representaron mediante sombras de error estándar de la media (EEM), lo que permite observar la variabilidad de la respuesta entre los sujetos a lo largo del tiempo.

Se emplearon diagramas de violín para mostrar la distribución de la respuesta pupilar en cada estímulo, permitiendo visualizar la densidad de los datos, así como los valores de mediana, cuartiles y posibles valores atípicos.

Para garantizar la validez de los análisis estadísticos, se identificaron y eliminaron los valores atípicos (en inglés, '*outliers*') en las respuestas pupilares utilizando el criterio del rango intercuartílico (IQR, por sus siglas en inglés). El IQR se calculó como la diferencia entre el tercer cuartil (Q3) y el primer cuartil (Q1) de los datos, y se identificaron como valores atípicos aquellos valores que se encontraban por debajo de $Q1 - 1.5 \times IQR$ o por encima de $Q3 + 1.5 \times IQR$. Estos valores atípicos fueron excluidos del análisis para evitar que afectaran de manera desproporcionada los resultados estadísticos y garantizaran una interpretación más precisa de las comparaciones de las respuestas pupilares.

Para analizar las diferencias en la respuesta pupilar a estímulos, se emplearon diversos métodos estadísticos según la comparación a realizar: comparación entre ojos (derecho e izquierdo) o comparación entre estímulos aplicados. Los análisis se realizaron utilizando técnicas adecuadas para datos repetidos.

Para comparar la respuesta pupilar entre los ojos derecho e izquierdo, se empleó una prueba t de muestras dependientes (también conocida como prueba t pareada) [165]. Este análisis es apropiado porque cada sujeto proporciona datos emparejados de ambos ojos. La hipótesis nula era que no existía diferencia significativa entre la respuesta pupilar del ojo derecho y el izquierdo. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. La normalidad en los datos se analizó empleando la prueba de Kolmogórov-Smirnov [166]. En caso de que los datos no cumplieren con este supuesto de normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon Signed-Rank [166].

Para comparar la respuesta pupilar a los diferentes estímulos optogenéticos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas

repetidas, dado que los estímulos se administraron de manera repetida dentro de los mismos participantes. Este enfoque permitió determinar si existían diferencias significativas en la respuesta pupilar entre los distintos tipos de estímulos. La hipótesis nula era que no hay diferencias entre las respuestas pupilares a los diferentes estímulos. En caso de encontrar diferencias significativas, se realizó un análisis *post hoc* para identificar qué estímulos difieren entre sí. Para controlar el error tipo I en las comparaciones múltiples, se aplicó un ajuste de Bonferroni o de Tukey, dependiendo del número de comparaciones. Para más de 10 grupos de comparaciones, se empleó el ajuste de Tukey, dado que el de Bonferroni puede ser demasiado conservador, presentar menos sensibilidad, y aumentar el riesgo de error tipo II (no detectar diferencias reales) [167].

Para evaluar la relación entre las medidas de interés, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r). Esta prueba se empleó debido a su capacidad para medir la fuerza y la dirección de una relación lineal entre dos variables cuantitativas. Antes de realizar el análisis, se verificaron los supuestos de normalidad de las distribuciones. El nivel de significancia estadística (p) se estableció en 0.05 para todas las pruebas. El coeficiente de correlación de Pearson se interpretó como sigue:

- $|r| < 0.3$: Correlación débil
- $0.3 \leq |r| < 0.7$: Correlación moderada
- $|r| \geq 0.7$: Correlación fuerte

Todos los análisis exploratorios se llevaron a cabo utilizando el software MATLAB (Mathworks).

4.3. RESULTADOS

Se presentan en esta sección los resultados del estudio para comprobar si la fotoactivación de las neuronas noradrenérgicas del LC, mediante el uso del subsistema optogenético, es capaz de producir la subsecuente respuesta de dilatación pupilar en animales sanos.

En neurociencia, se utilizan los términos ipsilateral y contralateral para describir la relación espacial entre diferentes partes del cuerpo y el sistema nervioso. Ipsilateral se refiere a estructuras o funciones que se encuentran en el mismo lado del cuerpo. Contralateral, por el contrario, se refiere a estructuras o funciones que se encuentran en lados opuestos del cuerpo.

En este estudio, durante los experimentos la fotoestimulación se realizó sobre el LC izquierdo, por lo que la respuesta ipsilateral se refiere a la dilatación de la pupila del ojo izquierdo y, la contralateral, a la del ojo derecho.

4.3.1. Sincronización optogenética cámaras

Uno de los principales requisitos del sistema es garantizar la coherencia temporal entre los estímulos y los videos adquiridos, ya sea para la colocación de las etiquetas si los estímulos son manuales o controlados por la propia aplicación, como es el caso de la estimulación optogenética.

Con el fin de comprobar esta coherencia temporal se realizó un estudio del retardo entre la activación de la optogenética respecto a la aparición de la etiqueta en el video. Esto se comprobó experimentalmente modificando ligeramente el software de análisis para que la etiqueta se mostrase como un rectángulo blanco y se pudiese medir el cambio mediante una resistencia dependiente de la luz o LDR (**Figura 28**).



Figura 28. Detalle del montaje de la resistencia dependiente de la luz (LDR) para la detección de la aparición de etiquetas en el video.

Se realizaron 30 mediciones con un osciloscopio midiendo el desfase entre la activación de la señal cuadrada enviada por el generador de estímulos y el cambio en pantalla medido por la LDR (**Figura 29**). Se observó una diferencia significativa ($p\text{-valor} < 0.001$) entre las medias siendo 4 veces superior la de la cámara 1 y con una mayor dispersión (**Tabla 6**).

Este efecto se sigue observando tras reiniciar el software y el equipo en el que se ejecuta, aunque se considera despreciable, dado que, en promedio, el error es menor que el tiempo entre fotogramas registrados 10fps, configuración utilizada durante los experimentos.

Tabla 6. Desfase entre la activación de la señal cuadrada enviada por el generador de estímulos y el cambio en pantalla medido por la resistencia dependiente de la luz (LDR).

	Cámara 1	Cámara 2
Media	69,58	15,47
Desviación estándar	39,42	4,61
Error estándar de la media	1,31	0,15
Máximo	126,00	23,20
Mínimo	10,40	10,40

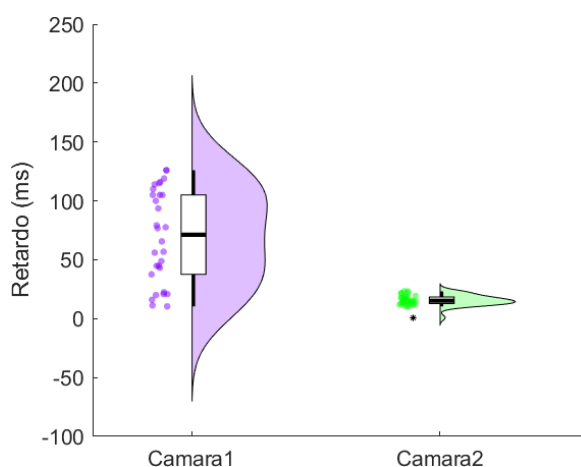


Figura 29. Dispersión del desfase entre la activación optogenética y la aparición de la etiqueta en el video.

4.3.2. Registros experimentales

La **Figura 30** ilustra el pupilograma completo obtenido durante una sesión experimental empleando el protocolo optogenético descrito, con tres intervalos de estimulación (*On*) y tres intervalos de reposo (*Off*).

Como se aprecia, la fotoactivación de las neuronas noradrenérgicas del LC produce una rápida respuesta de dilatación pupilar en cada tren de estímulos (*On_i*), cesando esa respuesta o incluso restableciéndose el diámetro pupilar en las fases de reposo (*Off_i*).

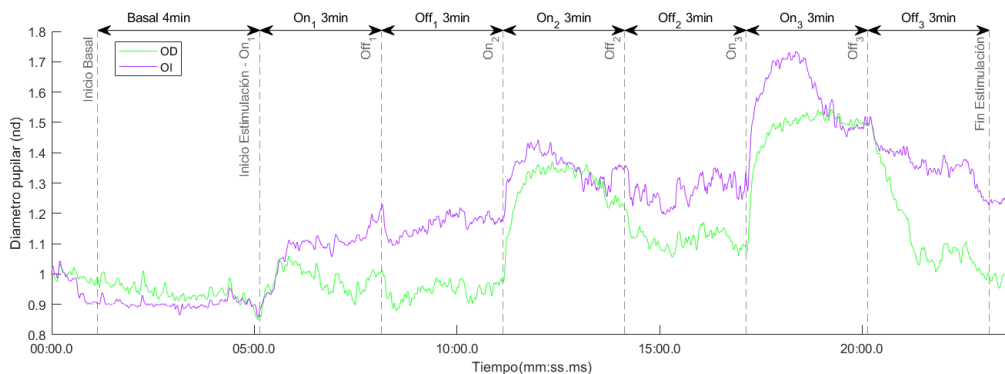


Figura 30. Pupilograma del registro completo durante una sesión experimental. OD: ojo derecho (trazo verde); OI: ojo izquierdo (trazo morado).

4.3.3. Comparación entre ojos y sexo

En primer lugar, se realizó la comparación entre las respuestas del ojo derecho respecto al ojo izquierdo para cada estimulación. Como se ha comentado en la sección 4.2.2.1, las estimulaciones optogenéticas se realizaron en todos los experimentos en el LC izquierdo.

4.3.3.1. Comparativa entre ojos en machos

La **Figura 31** ilustra la respuesta pupilar de cada ojo en el grupo de machos a cada uno de los tres intervalos de estimulación optogenética del LC izquierdo.

En la **Figura 32** se puede observar la distribución de los índices propuestos para cada ojo y en la **Tabla 7** se detallan los valores promedio y su error estándar de la media para cada ojo. La **Figura 33a** describe la significancia estadística asociada a las comparaciones entre ojos, estimada con la prueba t pareada o con la prueba no paramétrica de Wilcoxon Signed-Rank, según normalidad de los datos.

Como se aprecia, existen diferencias significativas entre ojos para los índices V_{90} y V_{120} , siendo mayores en el ojo izquierdo que en el derecho en la primera ventana de estimulación (On_1), y sin diferencias significativas en el resto de las ventanas de estimulación (**Figura 31, Tabla 7**). Estos índices proporcionan información importante sobre la fase tardía de la respuesta pupilar (90-120 segundos tras la fotoactivación). A menudo, el diámetro pupilar en esta fase se mantiene aumentado reflejando un estado más

estable de la respuesta, ya que, en muchos casos, el sistema tiende a regresar a un equilibrio tras el estímulo inicial.

Tabla 7. Promedios para cada ojo, estimados en machos, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a la estimulación optogenética del LC. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.

Índice	On ₁		On ₂		On ₃	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD
t _d (s)	5.88 \pm 5.88	5.78 \pm 5.78	11.00 \pm 11.00	11.53 \pm 11.53	3.10 \pm 3.10	3.77 \pm 2.19
t ₆₃ (s)	23.28 \pm 5.61	19.78 \pm 3.44	18.30 \pm 1.98	20.05 \pm 5.83	31.30 \pm 5.56	19.73 \pm 4.09
t _{max30} (s)	24.12 \pm 5.88	16.75 \pm 13.25	15.57 \pm 14.42	18.48 \pm 11.53	26.90 \pm 3.10	24.48 \pm 3.42
t _{max60} (s)	54.12 \pm 5.88	50.05 \pm 5.83	47.90 \pm 10.68	42.80 \pm 10.79	56.90 \pm 3.10	46.98 \pm 10.53
t _{subida} (s)	33.25 \pm 8.19	27.05 \pm 3.69	24.15 \pm 4.22	26.60 \pm 7.83	36.92 \pm 4.23	25.90 \pm 5.55
V ₃₀ (nd)	1.14 \pm 0.04	1.09 \pm 0.05	1.08 \pm 0.02	1.09 \pm 0.02	1.09 \pm 0.01	1.09 \pm 0.03
V ₆₀ (nd)	1.25 \pm 0.04	1.13 \pm 0.05	1.15 \pm 0.01	1.13 \pm 0.04	1.18 \pm 0.02	1.13 \pm 0.05
V ₉₀ (nd)	1.30\pm0.04	1.12\pm0.04	1.21 \pm 0.03	1.13 \pm 0.05	1.18 \pm 0.04	1.11 \pm 0.07
V ₁₂₀ (nd)	1.33\pm0.05	1.12\pm0.04	1.23 \pm 0.03	1.15 \pm 0.04	1.14 \pm 0.08	1.10 \pm 0.09
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.07 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.01 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01

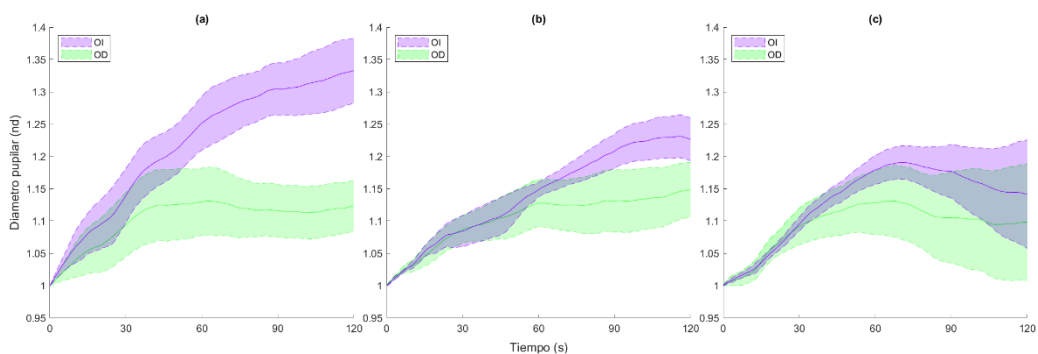


Figura 31. Respuesta pupilar del grupo de machos tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogenética del locus coeruleus izquierdo. (a) respuesta al primer tren de estímulos (On1) de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos; (b) respuesta al segundo tren de estímulos (On2); (c) respuesta al tercer tren de estímulos (On3). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Evaluación de la respuesta pupilar ante la estimulación optogenética del LC

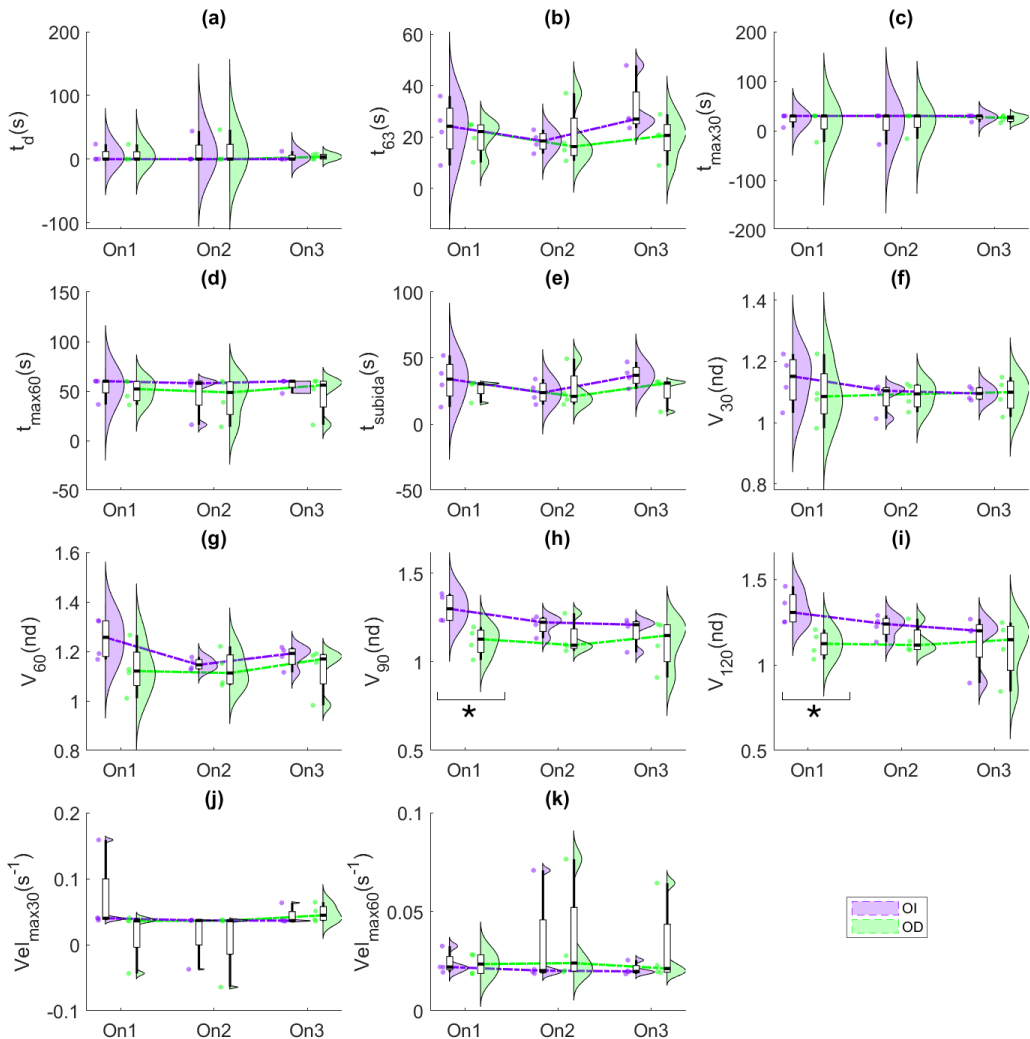


Figura 32. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de machos tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogenética del LC izquierdo. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.

En el grupo de estudio, ambos índices tienen valores altos respecto al valor basal o inicial en el caso del ojo izquierdo (ipsilateral a la fotoactivación del LC) lo que podría indicar una hiperreactividad en ese ojo. En cambio, los valores de ambos índices son similares al valor basal en el caso del ojo contralateral (derecho), lo que sugiere una respuesta transitoria y una más rápida recuperación. En los subsiguientes periodos de estimulación, no se

detectan diferencias en la dinámica en ambos ojos, lo que podría indicar una desensibilización en la respuesta.

En cuanto a la correlación (**Figura 33b**), se observa una fuerte correlación positiva entre ambos ojos para el desfase temporal entre el inicio de la respuesta de ambos ojos para los dos primeros estímulos (t_d), así como para el tiempo en el que alcanzan el máximo antes de los 30 segundos ($t_{\max30s}$), indicando que la sincronización pupilar se mantiene en las fases dinámicas iniciales de la respuesta.

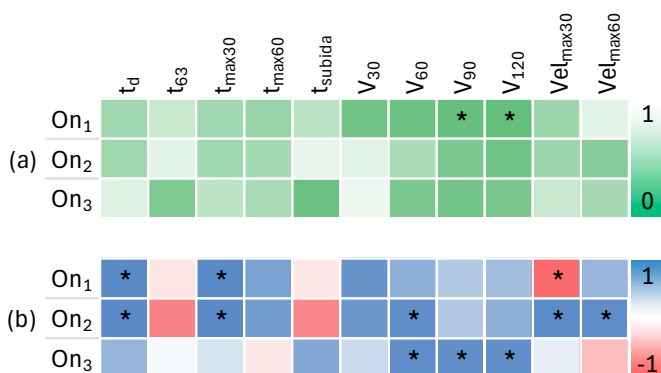


Figura 33. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en machos para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$.

En el segundo periodo de estimulación también se aprecia una correlación positiva entre ojos en V_{60} y $Vel_{\max30}$, $Vel_{\max60}$. Ello sugiere que en la fase temprana ambos ojos están respondiendo de manera sincronizada y proporcional a los estímulos, lo que indica una sincronización bilateral en la respuesta autonómica. Sin embargo, la respuesta del ojo derecho se estabiliza en la fase tardía mientras que la del izquierdo sigue creciendo. Esto podría indicar una mayor reactividad en el ojo ipsilateral al LC estimulado.

Finalmente, en la tercera ventana de estimulación se evidencia una correlación moderada en V_{60} , V_{90} , y V_{120} . Esto parece indicar una

recuperación al estado basal (estado antes de la estimulación) que refleja que la respuesta pupilar de ambos ojos es similar durante la fase de estabilización autónoma tardía (**Figura 31**) ante este último periodo de estimulación.

4.3.3.2. Comparativa entre ojos en hembras

La **Figura 34** ilustra la respuesta pupilar de cada ojo en el grupo de hembras durante cada intervalo de estimulación optogénica del LC izquierdo.

En la **Figura 35** se puede observar la distribución de los índices propuestos para cada ojo y, con más detalle, en la **Tabla 8** se detallan los valores promedio y su error estándar de la media para cada ojo.

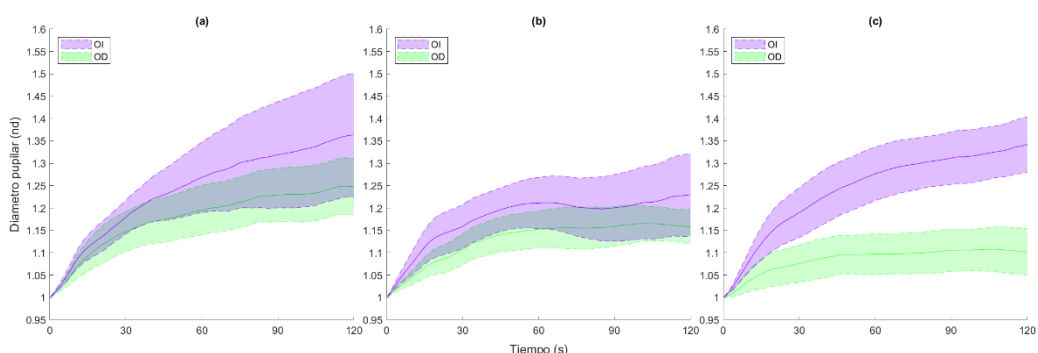


Figura 34. Respuesta pupilar del grupo de hembras tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogénica del LC izquierdo. (a) respuesta al primer tren de estímulos (On₁) de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos; (b) respuesta al segundo tren de estímulos (On₂); (c) respuesta al tercer tren de estímulos (On₃). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

La **Figura 36a** describe la significancia estadística asociada a las comparaciones entre ojos (prueba t pareada o prueba de Wilcoxon Signed-Rank). Existen diferencias significativas en la intensidad de la respuesta pupilar a largo plazo en el tercer estímulo (V_{30} , V_{60} , V_{90} , y V_{120}).

En el caso de las hembras, también se produce una respuesta de dilatación pupilar en cada una de las tres fases de estimulación, aunque la dinámica difiere a la de los machos. En hembras la respuesta pupilar ante la fotoactivación del LC izquierdo es similar para ambos ojos en los dos primeros periodos de estimulación (On₁ y On₂). Sin embargo, en el tercer periodo (On₃) se aprecia una respuesta pupilar diferente para el ojo izquierdo en comparación con el derecho. Esta diferencia se debe a una

disminución en la amplitud de la respuesta del ojo contralateral (ojo derecho) con las sucesivas estimulaciones, comportamiento que no se observa en la secuencia temporal del ojo izquierdo.

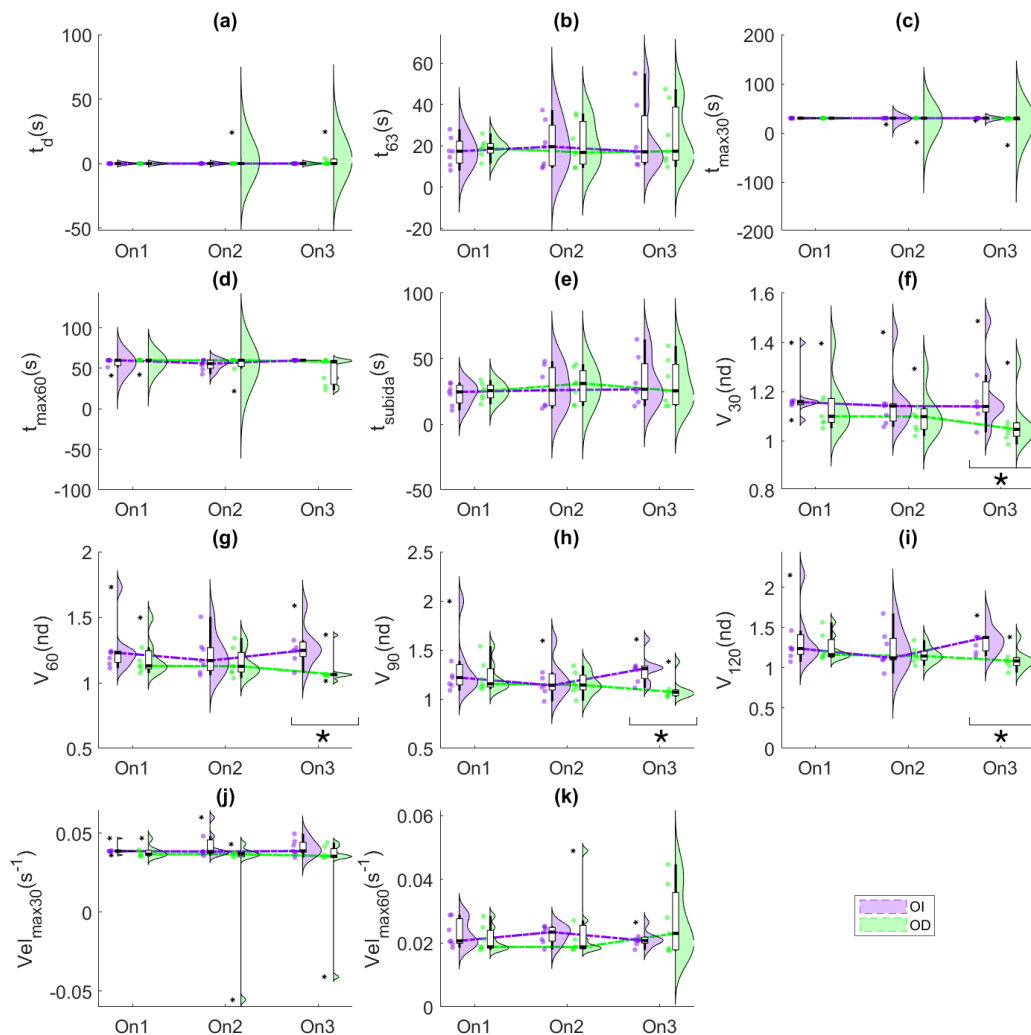


Figura 35. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de hembras tras cada una de las tres ventanas de estimulación optogénica del locus coeruleus izquierdo. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo. Oni: Tren de estímulos *i* de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.

Tabla 8. Promedios para cada ojo estimados en hembras para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a la estimulación optogenética del LC. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media. OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; Oni: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.

Índice	On ₁		On ₂		On ₃	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD
t _d (s)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.00±0.68
t ₆₃ (s)	17.17±2.64	18.84±1.72	20.29±4.23	20.74±4.13	23.94±6.37	24.26±5.76
t _{max30} (s)	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	29.00±0.68
t _{max60} (s)	58.53±1.43	60.00±0.00	54.57±2.96	60.00±0.00	60.00±0.00	48.82±6.64
t _{subida} (s)	23.07±3.05	24.83±2.43	28.10±5.79	29.44±4.79	32.76±7.02	30.96±6.82
V ₃₀ (nd)	1.16±0.00	1.09±0.02	1.11±0.02	1.07±0.02	1.14±0.04	1.03±0.01
V ₆₀ (nd)	1.19±0.02	1.16±0.04	1.16±0.04	1.14±0.04	1.22±0.03	1.06±0.00
V ₉₀ (nd)	1.21±0.04	1.25±0.07	1.14±0.04	1.13±0.04	1.26±0.04	1.06±0.01
V ₁₂₀ (nd)	1.23±0.05	1.27±0.07	1.16±0.07	1.13±0.03	1.29±0.04	1.06±0.03
Vel _{tmax30} (s ⁻¹)	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
Vel _{tmax60} (s ⁻¹)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00

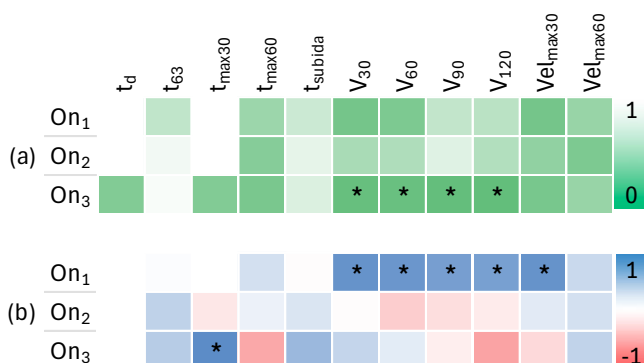


Figura 36. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en hembras para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$.

4.3.4. Comparación entre estimulaciones y sexo

A continuación, se describe el análisis estadístico desarrollado para comprobar si existen diferencias significativas o correlación en el comportamiento de la pupila en cada ventana de estimulación.

4.3.4.1. Comparativa entre estímulos en machos

La **Tabla 9** detalla la comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos, y la **Figura 37a** describe la significancia estadística asociada a las comparaciones entre estimulaciones para cada uno de los ojos (prueba ANOVA - Bonferroni) en el caso del grupo de machos.

En la secuencia temporal ilustrada en la **Figura 31** se observa una disminución de la respuesta en el lado ipsilateral, pudiendo indicar una desensibilización ante estímulos consecutivos. No se aprecia ninguna diferencia significativa entre las medias de los diferentes índices a lo largo de las tres estimulaciones.

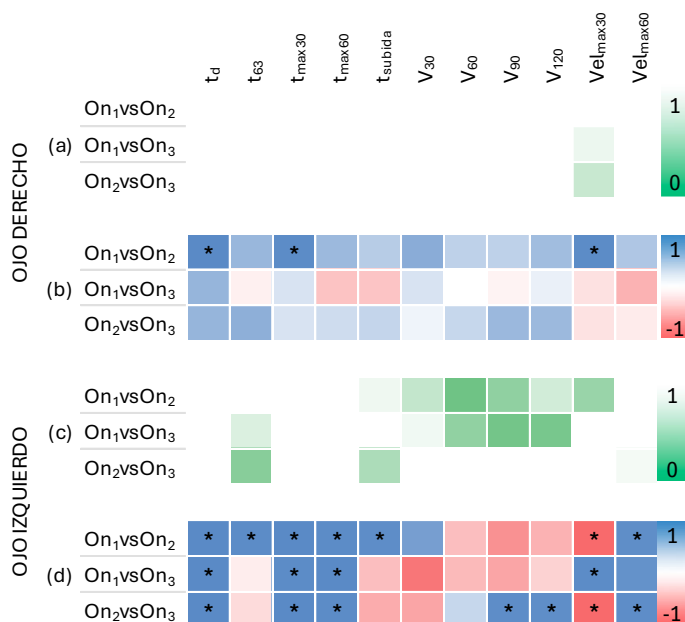


Figura 37. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos, para el ojo derecho (a) y el ojo izquierdo (c). Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en machos para el ojo derecho (b) y el ojo izquierdo (d).

Respecto a la correlación (**Figura 38b**), en las respuestas del ojo izquierdo existe una fuerte correlación negativa entre la primera y segunda ventana de estimulación y entre la segunda y la tercera para Vel_{max30} , lo que puede indicar una desensibilización ipsilateral.

También existe una correlación positiva fuerte entre t_{max30} y t_{max60} del ojo izquierdo para todas las estimulaciones (**Figura 38d**), que sugiere que los individuos mantienen un patrón relativo consistente en sus respuestas entre ambas estimulaciones (**Figura 31b**).

Tabla 9. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). On_i: Tren de estímulos *i* de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.

OJO DERECHO						
Índice	On ₁ vsOn ₂		On ₁ vsOn ₃		On ₂ vsOn ₃	
	On ₁	On ₂	On ₁	On ₁	On ₂	On ₁
t_d (s)	5.78 \pm 5.78	11.53 \pm 11.53	5.78 \pm 5.78	3.77 \pm 2.19	11.53 \pm 11.53	3.77 \pm 2.19
t_{63} (s)	19.78 \pm 3.44	20.05 \pm 5.83	19.78 \pm 3.44	19.73 \pm 4.09	20.05 \pm 5.83	19.73 \pm 4.09
t_{max30} (s)	16.75 \pm 13.25	18.48 \pm 11.53	16.75 \pm 13.25	24.48 \pm 3.42	18.48 \pm 11.53	24.48 \pm 3.42
t_{max60} (s)	50.05 \pm 5.83	42.80 \pm 10.79	50.05 \pm 5.83	46.98 \pm 10.53	42.80 \pm 10.79	46.98 \pm 10.53
t_{subida} (s)	27.05 \pm 3.69	26.60 \pm 7.83	27.05 \pm 3.69	25.90 \pm 5.55	26.60 \pm 7.83	25.90 \pm 5.55
V_{30} (nd)	1.09 \pm 0.05	1.09 \pm 0.02	1.09 \pm 0.05	1.09 \pm 0.03	1.09 \pm 0.02	1.09 \pm 0.03
V_{60} (nd)	1.13 \pm 0.05	1.13 \pm 0.04	1.13 \pm 0.05	1.13 \pm 0.05	1.13 \pm 0.04	1.13 \pm 0.05
V_{90} (nd)	1.12 \pm 0.04	1.13 \pm 0.05	1.12 \pm 0.04	1.11 \pm 0.07	1.13 \pm 0.05	1.11 \pm 0.07
V_{120} (nd)	1.12 \pm 0.04	1.15 \pm 0.04	1.12 \pm 0.04	1.10 \pm 0.09	1.15 \pm 0.04	1.10 \pm 0.09
Vel_{max30} (S ⁻¹)	0.02 \pm 0.02	0.01 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.01 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01
Vel_{max60} (S ⁻¹)	0.02 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01

OJO IZQUIERDO						
Índice	On ₁ vsOn ₂		On ₁ vsOn ₃		On ₂ vsOn ₃	
	On ₁	On ₂	On ₁	On ₁	On ₂	On ₁
t_d (s)	5.88 \pm 5.88	11.00 \pm 11.00	5.88 \pm 5.88	3.10 \pm 3.10	11.00 \pm 11.00	3.10 \pm 3.10
t_{63} (s)	23.28 \pm 5.61	18.30 \pm 1.98	23.28 \pm 5.61	31.30 \pm 5.56	18.30 \pm 1.98	31.30 \pm 5.56
t_{max30} (s)	24.12 \pm 5.88	15.57 \pm 14.42	24.12 \pm 5.88	26.90 \pm 3.10	15.57 \pm 14.42	26.90 \pm 3.10
t_{max60} (s)	54.12 \pm 5.88	47.90 \pm 10.68	54.12 \pm 5.88	56.90 \pm 3.10	47.90 \pm 10.68	56.90 \pm 3.10
t_{subida} (s)	33.25 \pm 8.19	24.15 \pm 4.22	33.25 \pm 8.19	36.92 \pm 4.23	24.15 \pm 4.22	36.92 \pm 4.23
V_{30} (nd)	1.14 \pm 0.04	1.08 \pm 0.02	1.14 \pm 0.04	1.09 \pm 0.01	1.08 \pm 0.02	1.09 \pm 0.01
V_{60} (nd)	1.25 \pm 0.04	1.15 \pm 0.01	1.25 \pm 0.04	1.18 \pm 0.02	1.15 \pm 0.01	1.18 \pm 0.02
V_{90} (nd)	1.30 \pm 0.04	1.21 \pm 0.03	1.30 \pm 0.04	1.18 \pm 0.04	1.21 \pm 0.03	1.18 \pm 0.04
V_{120} (nd)	1.33 \pm 0.05	1.23 \pm 0.03	1.33 \pm 0.05	1.14 \pm 0.08	1.23 \pm 0.03	1.14 \pm 0.08
Vel_{max30} (S ⁻¹)	0.07 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
Vel_{max60} (S ⁻¹)	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00

4.3.4.2. Comparativa entre estímulos en hembras

La **Tabla 10** detalla la comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras.

La **Figura 38(a, c)** describe la significancia estadística en las hembras asociada a las comparaciones entre estimulaciones para cada uno de los ojos según la prueba ANOVA - Bonferroni.

No se aprecia ninguna diferencia significativa entre las medias de las estimulaciones. A diferencia de los machos, no se observa en la **Figura 38(a, c)** un aumento de las diferencias entre las medias en el ojo ipsilateral respecto al contralateral.

Tabla 10. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). On_i: Tren de estímulos i de frecuencia 5Hz con un ancho de pulso de 10ms, transmitido durante 3 minutos.

OJO DERECHO						
Índice	On ₁ vsOn ₂		On ₁ vsOn ₃		On ₂ vsOn ₃	
	On ₁	On ₂	On ₁	On ₁	On ₂	On ₁
t _d (s)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.00±0.68	0.00±0.00	1.00±0.68
t ₆₃ (s)	18.84±1.72	20.74±4.13	18.84±1.72	24.26±5.76	20.74±4.13	24.26±5.76
t _{max30} (s)	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	29.00±0.68	30.00±0.00	29.00±0.68
t _{max60} (s)	60.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	48.82±6.64	60.00±0.00	48.82±6.64
t _{subida} (s)	24.83±2.43	29.44±4.79	24.83±2.43	30.96±6.82	29.44±4.79	30.96±6.82
V ₃₀ (nd)	1.09±0.02	1.07±0.02	1.09±0.02	1.03±0.01	1.07±0.02	1.03±0.01
V ₆₀ (nd)	1.16±0.04	1.14±0.04	1.16±0.04	1.06±0.00	1.14±0.04	1.06±0.00
V ₉₀ (nd)	1.25±0.07	1.13±0.04	1.25±0.07	1.06±0.01	1.13±0.04	1.06±0.01
V ₁₂₀ (nd)	1.27±0.07	1.13±0.03	1.27±0.07	1.06±0.03	1.13±0.03	1.06±0.03
Vel _{max30} (S ⁻¹)	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
Vel _{max60} (S ⁻¹)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00

OJO IZQUIERDO						
Índice	On ₁ vsOn ₂		On ₁ vsOn ₃		On ₂ vsOn ₃	
	On ₁	On ₂	On ₁	On ₃	On ₂	On ₃
t _d (s)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
t ₆₃ (s)	17.17±2.64	20.29±4.23	17.17±2.64	23.94±6.37	20.29±4.23	23.94±6.37
t _{max30} (s)	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00	30.00±0.00
t _{max60} (s)	58.53±1.43	54.57±2.96	58.53±1.43	60.00±0.00	54.57±2.96	60.00±0.00
t _{subida} (s)	23.07±3.05	28.10±5.79	23.07±3.05	32.76±7.02	28.10±5.79	32.76±7.02
V ₃₀ (nd)	1.16±0.00	1.11±0.02	1.16±0.00	1.14±0.04	1.11±0.02	1.14±0.04
V ₆₀ (nd)	1.19±0.02	1.16±0.04	1.19±0.02	1.22±0.03	1.16±0.04	1.22±0.03
V ₉₀ (nd)	1.21±0.04	1.14±0.04	1.21±0.04	1.26±0.04	1.14±0.04	1.26±0.04
V ₁₂₀ (nd)	1.23±0.05	1.16±0.07	1.23±0.05	1.29±0.04	1.16±0.07	1.29±0.04
Vel _{max30} (S ⁻¹)	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
Vel _{max60} (S ⁻¹)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00

En la **Figura 38(b, d)**, se aprecia una correlación positiva moderada entre los tamaños de la respuesta del ojo ipsilateral (izquierdo) a largo plazo entre todas las estimulaciones, lo que implica una consistencia en la respuesta pupilar entre los estímulos. La dilatación tardía parece menos susceptible a variaciones por habituación o adaptación rápida.

Respecto al ojo derecho (contralateral), se observa una correlación positiva fuerte en $t_{\max30}$, t_{subida} y $Vel_{\max30}$ entre las estimulaciones 2 y 3 que parece indicar, de nuevo una desensibilización en la respuesta que mantiene un patrón relativo consistente en sus respuestas entre estimulaciones acumulativas.

No se aprecia ninguna diferencia significativa entre las medias de las estimulaciones. A diferencia de los machos, no se observa en la **Figura 38(a, c)** un aumento de las diferencias entre las medias en el ojo ipsilateral respecto al contralateral.

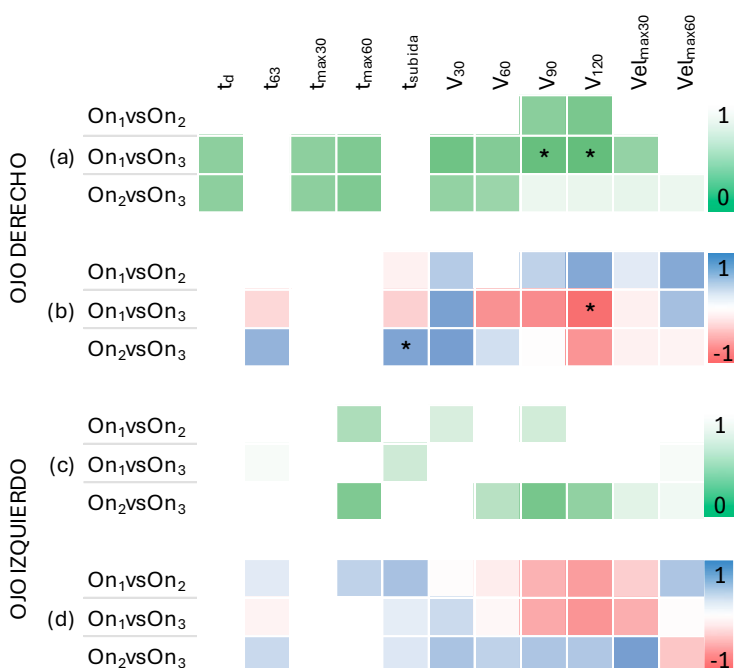


Figura 38. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras, para el ojo derecho (a) y el ojo izquierdo (c). Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en hembras para el ojo derecho (b) y el ojo izquierdo (d).

Al finalizar los experimentos, se extrajeron los cerebros de cada animal para la verificación histológica de la correcta expresión del vector viral en el LC en todos los animales (**Anexo I**). Solamente se incluyeron en este estudio los datos de aquellos los animales en cuyo LC izquierdo se observó fluorescencia verde por la expresión del gen reportero del vector viral de optogenética (**Anexo I, Figura 75**).

4.4. DISCUSIÓN

En este estudio se ha evaluado en profundidad la respuesta pupilar desencadenada por la fotoactivación repetida de las neuronas noradrenérgicas del LC en ratones macho y hembra. Así, la respuesta pupilar fue la esperada y corresponde con otros estudios de optogenética en el LC y pupilometría como el de Hayat et al. [101] y Grimm et al. [168]. A pesar de las diferencias de frecuencia y duración de la estimulación optogenética de los protocolos empleados en dichos estudios, la fotoactivación de las neuronas noradrenérgicas del LC resulta, al igual que en esta investigación, en un incremento rápido del diámetro pupilar que suele disminuir al cesar la estimulación.

Además, se han analizado las diferencias en la respuesta pupilar entre el ojo derecho e izquierdo tras la estimulación optogenética del LC izquierdo en ratones macho y hembra.

En los machos, la respuesta inicial a la estimulación muestra una clara lateralización, con el ojo izquierdo (ipsilateral al LC estimulado) presentando una mayor dilatación que el ojo derecho en la fase tardía. Esta asimetría se atenúa en las estimulaciones posteriores, sugiriendo una desensibilización a la estimulación repetida.

La diferencia en la dinámica pupilar de ambos ojos ante el primer estímulo puede ser debido a la lateralización del sistema nervioso simpático, que es el responsable de la dilatación de la pupila [79]. La estimulación del LC izquierdo activa preferentemente el ganglio cervical superior izquierdo, que a su vez inerva el músculo dilatador de la pupila del ojo izquierdo. Esta vía simpática lateralizada provoca una dilatación más pronunciada en la pupila izquierda en comparación con la derecha. Ello podría reflejar un desequilibrio en la respuesta autonómica, con una activación diferencial del sistema simpático o una inhibición diferencial del parasimpático.

Las proyecciones ascendentes del LC son bilaterales principalmente, y los resultados obtenidos pueden indicar que existe una mayor predominancia del lado ipsilateral respecto del contralateral, lo que coincidiría con lo descrito por Liu et al. en [79].

En contraste, las hembras no exhiben una lateralización significativa en las dos primeras estimulaciones. Sin embargo, en la tercera estimulación, las hembras desarrollan una mayor dilatación en el ojo izquierdo, indicando una posible sensibilización a la estimulación repetida. Por el contrario, otro estudio que evaluó la respuesta pupilar ante la fotoestimulación del LC en ambos sexos, no encontraron diferencias significativas en el aumento del diámetro pupilar a los protocolos empleados. No obstante, cabe destacar que solamente evaluaron el parámetro de diámetro pupilar del ojo ipsilateral al LC estimulado y ante protocolos de estimulación tónica y fásica de muy corta duración que quizás no sean suficientes para alcanzar las diferencias sexuales observadas en este estudio.

La divergencia en los patrones de respuesta entre machos y hembras observada subraya un posible dimorfismo sexual en la respuesta del LC a la estimulación optogenética. Estudios recientes han demostrado que el LC presenta dimorfismo sexual, con diferencias en la morfología, la función y la conectividad entre machos y hembras [71], [169]. Por ejemplo, las neuronas del LC en hembras suelen tener una mayor arborización dendrítica y una mayor excitabilidad [169]. Dichas diferencias sexuales, así como la influencia de las hormonas sexuales, podrían contribuir a la variación en la respuesta pupilar observada.

Sin embargo, se desconoce si existe un dimorfismo sexual en las vías del LC y sistema nervioso vegetativo que controlan el tamaño de la pupila (ganglio cervical superior y núcleo de Edinger-Westphal). Los datos obtenidos en esta investigación demuestran que la respuesta lateralizada debido a la primera estimulación optogenética que se produce en machos no es tan evidente en hembras. Sin embargo, esta lateralización, mayor estimulación de la pupila izquierda con respecto a la derecha, se vuelve más evidente en la tercera estimulación. Este resultado también contrastaría con lo encontrado en machos donde parece haber una desensibilización cuando se realizan varias estimulaciones optogenéticas. Así, las hembras podrían mostrar una mayor plasticidad neuronal en las vías LC-pupila en comparación con los machos, lo que podría resultar en una sensibilización o potenciación de la respuesta a la estimulación repetida.

Estos resultados podrían sugerir que puede existir una adaptación diferencial al estrés. La exposición a eventos estresantes desencadena la activación del LC [170] por la liberación de CRF desde el núcleo paraventricular del hipotálamo, activación que es posteriormente contrarrestada por la liberación de péptidos opioides endógenos que inhiben la actividad de las neuronas del LC para protegerlo de una hiperestimulación [171]. Por lo que la estimulación optogenética del LC podría considerarse un factor estresante y la respuesta a él ser diferente en función del sexo. De este modo, como ya se ha descrito, los machos muestran una desensibilización, mientras que las hembras presentan una sensibilización a la estimulación repetida. En este sentido, las hembras podrían presentar una respuesta al estrés más prolongada o diferencial en comparación con los machos. Esto tendría sentido ya que estudios recientes del grupo CTS-510 muestran que las hembras presentan mayor respuesta de ansiedad que los machos [169]. Por otro lado, estudios del grupo de Rita Valentino han demostrado que las ratas hembra presentan una menor función de los receptores mu-opioides del LC [172], los cuales juegan un papel importante en la inhibición del LC para su recuperación ante situaciones de estrés [170], [173], [174]. De este modo, las hembras tendrían un sistema de inhibición menos eficiente para proteger al LC de la sobreexcitación frente a estímulos estresantes.

Asimismo, las hormonas sexuales, como el estrógeno, pueden modular la actividad del LC y la respuesta a la noradrenalina [169]. Es posible que la fluctuación hormonal en las hembras a lo largo del ciclo estral influya en la respuesta pupilar a la estimulación optogenética del LC, acentuando las diferencias entre ojos en la tercera ventana de estimulación.

En resumen, estos datos demuestran que existen diferencias sexuales en la respuesta del tamaño de las pupilas tras la estimulación optogenética de un LC. Existen en ambos sexos una mayor respuesta ipsilateral pero que es más evidente en la primera estimulación para los machos y en la tercera para las hembras. Esta respuesta sensibilizada o potenciada tardía podría relacionarse con una menor o más tardía respuesta inhibitoria ante estímulos excitadores que podrían relacionarse con la mayor vulnerabilidad de las mujeres ante eventos estresantes, incluyendo el dolor.

En cuanto a los resultados de correlaciones, en machos las correlaciones positivas observadas en los índices evaluados sugieren una buena sincronización entre ambos ojos en el desfase temporal de la respuesta

pupilar y en el tiempo en el que alcanzan el máximo antes de los 30 segundos en las primeras fases de fotoactivación del LC. No obstante, la correlación positiva en V_{60} y Vel_{max30} , Vel_{max60} en el segundo periodo de estimulación podría indicar una mayor reactividad en el ojo ipsilateral al LC estimulado y coincidiría con lo descrito por Liu et al. en [79]. Y en la tercera fase de estimulación, la correlación en la amplitud de la respuesta (V_{60} , V_{90} , y V_{120}) podría indicar una recuperación al estado basal (estado antes de la estimulación) que refleja que la respuesta pupilar de ambos ojos es similar durante la fase de estabilización autonómica tardía ante este último periodo de estimulación.

En las hembras se aprecia una correlación positiva moderada en el primer estímulo en la velocidad de la respuesta en alcanzar el máximo antes de los 30s (t_{max30}) de ambos ojos, pudiendo indicar una respuesta transitoria inicial similar. También se observa una correlación positiva moderada-fuerte entre los valores de amplitud la respuesta pupilar a los 30, 60, 90 y 120 segundos (V_{30} , V_{60} , V_{90} , y V_{120}), pudiendo indicar una respuesta no lateralizada ante este primer estímulo. Finalmente, los valores medios de t_{max30} de ambos ojos en la tercera ventana de estimulación sugieren una respuesta lateralizada estabilizándose en primer lugar el ojo contralateral (ojo derecho) y posteriormente el ipsilateral, coincidiendo de nuevo con lo descrito por Liu et al. [79]. Si bien la correlación alta sugiere que ambos ojos están bajo un control coordinado central, la diferencia en medias puede indicar asimetrías en la rapidez de respuesta de las vías simpáticas o parasimpáticas que actúan sobre cada ojo.

Al analizar el efecto de la fotoactivación repetida del LC, en machos se aprecia una atenuación en la intensidad de la respuesta en el lado ipsilateral a medida que se suceden estimulaciones que podría deberse a varios factores. La estimulación repetida del LC podría llevar a una habituación de la respuesta neuronal y, en consecuencia, a una disminución de la dilatación pupilar [175], [176]. Esta habituación podría explicar la atenuación de la respuesta pupilar en las ventanas de estimulación posteriores. Por otro lado, la fotoactivación del LC, al igual que ocurre con el estrés, produce una liberación continua de noradrenalina [35], [168], [174], [177], [178], [179], [180], [181], [182] que podría desensibilizar los receptores adrenérgicos en el músculo dilatador de la pupila, lo que provocaría una respuesta atenuada en las siguientes ventanas de estimulación [176]. Finalmente, el LC recibe aferencias de varias áreas del

cerebro, incluyendo aquellas involucradas en el procesamiento del estrés. También es posible que la liberación de péptidos opioides endógenos tras la activación inicial del LC [171] desencadene circuitos de retroalimentación que modulen su actividad en las siguientes ventanas de estimulación, contribuyendo a la atenuación de la respuesta y la desaparición de las diferencias entre los ojos [152], [183]. Asimismo, las correlaciones significativas resultantes para el ojo izquierdo en los diferentes periodos de fotoactivación del LC también sugieren la desensibilización ipsilateral.

Hay que destacar que con el protocolo de fotoactivación repetida elegido, (i) el sistema autonómico podría reaccionar más rápido o más lento ante las estimulaciones repetidas debido a adaptaciones del sistema nervioso simpático o parasimpático y (ii) tres minutos de descanso entre las ventanas de estimulación podrían no haber sido suficientes para restaurar completamente la homeostasis autonómica y podrían existir efectos acumulativos del estímulo. Dicha estimulación repetida, por tanto, puede alterar los tiempos de respuesta al influir en la redistribución de neurotransmisores o en la sensibilidad de los receptores involucrados.

En las hembras, no se observa una atenuación significativa de la respuesta pupilar por la fotoactivación repetida del LC. De hecho, la respuesta pupilar en las hembras se mantiene relativamente consistente a lo largo de las tres ventanas de estimulación. Estos resultados vuelven a sugerir que podría existir una diferencia sexual en la respuesta del LC a la estimulación repetida, con los machos mostrando una mayor tendencia a la desensibilización que las hembras. Esta diferencia como ya se ha descrito podría estar relacionada con el dimorfismo sexual del LC y la influencia de las hormonas sexuales en la actividad del LC.

Por tanto, estos hallazgos destacan la importancia del sexo en la respuesta pupilar a la estimulación optogenética del LC, los cuales podrían tener implicaciones para la comprensión de las diferencias sexuales en la respuesta al estrés, la ansiedad y el dolor.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA PUPILAR ANTE ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS Y EVALUACIÓN EN DOLOR CRÓNICO A LARGO PLAZO

5. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA PUPILAR ANTE ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS Y EVALUACIÓN EN DOLOR CRÓNICO A LARGO PLAZO

5.1. INTRODUCCIÓN

El dolor constituye una vivencia subjetiva adversa que incorpora un componente sensorial y emocional, actuando como una señal de alarma para el organismo sobre un riesgo real o potencial para la integridad de los tejidos [1].

El dolor, para cumplir su función, debe ser aversivo y generar estrés con el objetivo de dar una respuesta al daño. Sin embargo, cuando el dolor supera el periodo normal de curación, pasa a ser crónico y deja de tener ese papel fisiológico protector [2]. Además, el dolor crónico frecuentemente coexiste con trastornos de salud mental asociados al estrés como son la ansiedad o la depresión. Los trastornos neuropsiquiátricos son una creciente amenaza social y económica en Europa, agravada por el envejecimiento poblacional. Concretamente, la ansiedad y los trastornos del estado de ánimo, especialmente prevalentes en mujeres, son de las condiciones más incapacitantes, proyectadas como principales contribuyentes a la carga mundial de morbilidad para la próxima década. Asimismo, los trastornos afectivos también se asocian a síntomas somáticos como el dolor, necesitando frecuentemente los pacientes consultas médicas relacionadas con el dolor [6], [7], [8]. En este sentido, se ha descrito que la comorbilidad dolor crónico-trastornos ansiodepresivos sigue una relación bidireccional y no solo conviven, sino que ambas patologías favorecen el desarrollo mutuo. De este modo, el dolor crónico puede favorecer la aparición de trastornos ansiodepresivos y viceversa, complicando el tratamiento y aumentando la carga clínica [9], [10]. Aunque esta conexión está bien documentada, los mecanismos subyacentes a dicha comorbilidad todavía no se conocen con exactitud.

Modelos preclínicos en animales han sido fundamentales para investigar estos vínculos, permitiendo controlar variables inexplorables en humanos y profundizar en los mecanismos de estas enfermedades. Varios estudios han reproducido con éxito síntomas de ansiedad y depresión en modelos de dolor neuropático en roedores, destacando el círculo vicioso entre dolor

crónico y trastornos mentales. Por ejemplo, el dolor neuropático prolongado puede desencadenar comportamientos depresivos más severos que el propio dolor, mientras que el estrés crónico puede alterar la sensibilidad al dolor, reforzando esta interacción bidireccional [12], [15].

Las diferencias de sexo son un factor crítico en el estudio del dolor crónico y los trastornos ansio depresivos, ya que se han observado diferencias significativas en ambos mecanismos. En este sentido, los datos epidemiológicos muestran una mayor incidencia de dolor y patologías afectivas en mujeres [184], [185]. Asimismo, las mujeres presentan mayor sensibilidad al dolor [186] y en dolor crónico también presentan mayor comorbilidad con trastornos de ansiedad o depresión [186], [187], [188]. A pesar de estas diferencias sexuales, la mayoría de los estudios preclínicos en animales se han centrado en machos, lo que resalta la necesidad de caracterizar modelos que incorporen este parámetro biológico para reflejar mejor la heterogeneidad observada en humanos.

En la búsqueda de los mecanismos neurobiológicos que expliquen dicha comorbilidad, se ha demostrado que el dolor neuropático no altera la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, aunque inicialmente se consideró que el dolor crónico actuaba como un estrés crónico como otros de tipo ambiental [14]. Así, varios autores han propuesto que la plasticidad celular y molecular en determinadas estructuras cerebrales clave podrían desempeñar un papel fundamental en esta comorbilidad. En este contexto, el LC se postula como un núcleo crítico en la sintomatología ansio depresiva inducida por el dolor.

El LC, principal fuente de noradrenalina del sistema nervioso central participa regulando muchas funciones fisiológicas, incluyendo el nivel de alerta (en inglés, *arousal*), la memoria, la cognición, la flexibilidad conductual, la reactividad al estrés y el procesamiento del dolor [189], [190], [191]. Respecto a su implicación en el procesamiento del dolor, el sistema noradrenérgico-LC participa en las vías ascendentes y descendentes del dolor, pero no parece que juegue un papel relevante en la sensibilidad sensorial basal en situaciones fisiológicas. No obstante, ante una situación de dolor, se produce la activación descendente del LC (desde el LC hasta la médula espinal) observándose una respuesta analgésica endógena mediada por este núcleo. Sin embargo, cuando el dolor persiste, los mecanismos endógenos fallan volviendo el fenotipo de dolor. De hecho, a largo plazo el LC parece cambiar su papel de inhibir el dolor a facilitarlo o

a no desempeñar ningún papel [18]. En esta situación, el grupo de investigación CTS-510 ha observado un aumento en la actividad electrofisiológica, de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y del transportador de noradrenalina en el LC de animales con un modelo de dolor crónico de tipo neuropático, lo que se traduce en una activación de este núcleo que coincide con el inicio de conductas ansiodepresivas en animales con dolor a largo plazo [15]. Esto sugiere que las lesiones nerviosas pueden afectar las proyecciones del LC, desencadenando consecuencias conductuales específicas. Concretamente, estudios más recientes de este grupo de investigación indican que las dimensiones sensorial y emocional del dolor crónico son procesadas por vías neuronales independientes. Las proyecciones descendentes del LC a la médula espinal disminuyen su actividad contribuyendo a la hipersensibilidad sensorial, mientras que las proyecciones ascendentes del LC a áreas corticolímbicas (involucradas en la fisiopatología de la depresión y los trastornos de ansiedad) como LC-BLA o LC-PFC (corteza prefrontal) parecen estar sobreactivadas en dolor neuropático a largo plazo lo que llevaría al desarrollo síntomas ansiodepresivos y la adquisición de memoria aversiva [24], [58].

Por tanto, el papel del LC en la modulación del dolor es dinámico y cambia a lo largo del tiempo debido al diferente nivel de activación de unas vías de proyección con respecto a otras. En este sentido, el estudio de la actividad del LC podría contribuir al diagnóstico y tratamiento de la comorbilidad dolor crónico-trastornos ansiodepresivos.

Como ya se ha descrito en capítulos anteriores, el estudio de la actividad del LC conlleva ciertas limitaciones principalmente por su pequeño tamaño y localización. No obstante, se ha demostrado que la activación eléctrica, mediante técnicas de quimiogenética y optogenética del LC produce una respuesta de dilatación pupilar [79], [80], [86], [101], [168]. Además, estudios en roedores y en humanos han descrito que la estimulación nociva también desencadena una respuesta de dilatación pupilar junto con la activación del LC, la cual precede a los cambios pupilares [79], [80], [83], [192], [193], [194]. Y aunque otros sistemas de neurotransmisión contribuyen a los cambios del tamaño pupilar, el sistema noradrenérgico-LC es el único que ha sido relacionado con cambios pupilares como respuesta a la estimulación nociceptiva [195]. Por tanto, se plantea la pupilometría como una herramienta no invasiva y con gran potencial de

traslacionalidad para el estudio de la actividad del LC en patologías en las cuales su funcionalidad se encuentra alterada como es en la comorbilidad dolor crónico-trastornos ansio depresivos.

En este contexto y dada la relación descrita por otros autores y en el capítulo 4, entre la actividad del LC y cambios en el diámetro pupilar y el estado de hiperactivación del LC descrito en dolor crónico a largo plazo que se relaciona con síntomas ansio depresivos, surge la pregunta de cómo responderá la pupila ante estímulos nociceptivos en animales sometidos a un dolor de tipo neuropático de larga duración que muestran sintomatología ansio depresiva. Asimismo, teniendo en cuenta las diferencias sexuales existentes en el LC [68], [69], [70], [169] y las descritas en dolor crónico, se ha analizado la influencia del sexo en esta respuesta.

Se han analizado los cambios en el ojo ipsilateral (del mismo lado del estímulo) y contralateral (del lado opuesto al estímulo), así como los tiempos de respuesta, los cambios relativos en la amplitud de la pupila y la dinámica temporal de estos cambios. Además, la evaluación de los tiempos de respuesta y la dinámica de la amplitud nos permitirá comprender mejor la naturaleza temporal de la interacción entre el LC y la pupila en respuesta al dolor, y si esta interacción difiere entre machos y hembras.

En base a la evidencia previa sobre la relación entre el LC, la pupila y el dolor, se plantean las siguientes hipótesis:

- La estimulación mecánica dolorosa evocará una dilatación pupilar tanto en el ojo ipsilateral como en el contralateral. Esta dilatación reflejará, indirectamente, la activación del LC en respuesta al estímulo nociceptivo.
- La respuesta pupilar en el ojo ipsilateral al estímulo será más rápida y de mayor amplitud que en el contralateral: Esto se debe a la organización anatómica de las vías sensoriales del dolor, que procesan la información nociceptiva en el hemisferio cerebral contralateral al estímulo.
- Existirán diferencias sexuales en la respuesta pupilar al dolor: Específicamente, se espera que las hembras muestren una respuesta pupilar más pronunciada al dolor, con mayor amplitud y/o menor latencia, en comparación con los machos. Estas diferencias reflejarían las diferencias sexuales en la función del LC y la sensibilidad al dolor.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Animales y grupos de estudio

Se emplearon 41 ratones adultos (20 machos y 21 hembras) de la cepa C57BL/6J, con un rango de peso comprendido entre 20 y 35 gramos. Como se describió en el capítulo anterior, los animales fueron alojados en recintos separados según su sexo, utilizando jaulas transparentes de plexiglás y bajo condiciones controladas de laboratorio: temperatura constante de 22 °C, ciclo luz/oscuridad de 12 horas, y acceso a alimento y agua de manera ad libitum. Todos los procedimientos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz, cumpliendo con las disposiciones establecidas por la Directiva 2010/63/EU de la Comisión Europea y el Real Decreto 53/2013 que regula el uso de animales en investigación científica en España.

Los grupos de estudio fueron 4: animales con dolor neuropático a largo plazo (grupos CCI), 10 machos y 10 hembras, los cuales se sometieron al modelo de dolor neuropático ocho semanas antes de la pupilometría y animales sanos, 10 machos y 11 hembras, (grupos naïve) que no presentaban dolor.

5.2.2. Modelo de dolor crónico

El modelo de dolor neuropático inducido se basa en la constricción crónica del nervio ciático, del inglés *Chronic Constriction Injury* (CCI). Para ello, los animales se anestesiaron con isoflurano (4% inducción, 2.5% mantenimiento) y se expuso el nervio ciático de la pata trasera derecha en el que realizarán tres ligaduras con catgut cromado (de calibre 6/0) alrededor del nervio, con una separación de 1,0-1.5 mm, con una presión de nudo tal que el riego sanguíneo no se vea interrumpido. La herida quirúrgica de la piel se cerró con sutura no reabsorbible 4/0 [196]. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia, se alojaron de nuevo en sus respectivas jaulas. Se esperaron ocho semanas desde la inducción del modelo de dolor para la realización de los experimentos de pupilometría. Tras dichos experimentos, se comprobó que los animales CCI presentaran dolor en la pata operada y una conducta de tipo depresiva como consecuencia del dolor neuropático a largo plazo (**Anexo II**).

5.2.2.1. Anestesia y condiciones de experimentación

Los animales fueron retirados del animalario al menos 30 minutos antes del inicio del experimento y trasladados a una sala con iluminación controlada a 15 lux, permitiéndoles habituarse a estas condiciones lumínicas y a una temperatura ambiental de 20-22 °C. Al comienzo del procedimiento experimental, los ratones fueron anestesiados en una cámara de inducción utilizando isoflurano al 4% en volumen. Posteriormente, se colocaron en la plataforma de pupilometría, donde se mantuvo la anestesia con isoflurano al 1-2%, ajustado según el peso de cada animal, durante el resto del experimento.

5.2.3. Registro y estimulación

5.2.3.1. Pupilómetro

Para llevar a cabo la pupilometría bilateral durante las estimulaciones mecánicas se utilizó la plataforma y las aplicaciones específicamente diseñadas para este propósito, tal como se detalla en el Capítulo 3. No fue necesario emplear elementos adicionales de sujeción para los animales ni herramientas complementarias.

5.2.3.2. Protocolo de estimulación

Se realizó el registro binocular de las pupilas de todos los grupos experimentales (machos naïve, hembras naïve, machos CCI y hembras CCI) siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. El registro de las pupilas comenzó con una fase inicial de 400 segundos (periodo basal) en los que los animales permanecieron bajo leve anestesia sin recibir ningún estímulo y posteriormente se sometieron a cuatro estimulaciones mecánicas nociceptivas consistentes en aplicar una compresión en una de las patas traseras con unas pinzas con puntas blandas durante 1s. Así, se llevaron a cabo dos estimulaciones de la pata derecha (D_1 y D_2) separadas entre ellas de 100 segundos y 200 segundos más tarde se realizaron dos estimulaciones de la pata izquierda (I_1 e I_2) separadas también entre ellas de 100 segundos.

La **Figura 39** ilustra el montaje experimental empleado en este estudio.

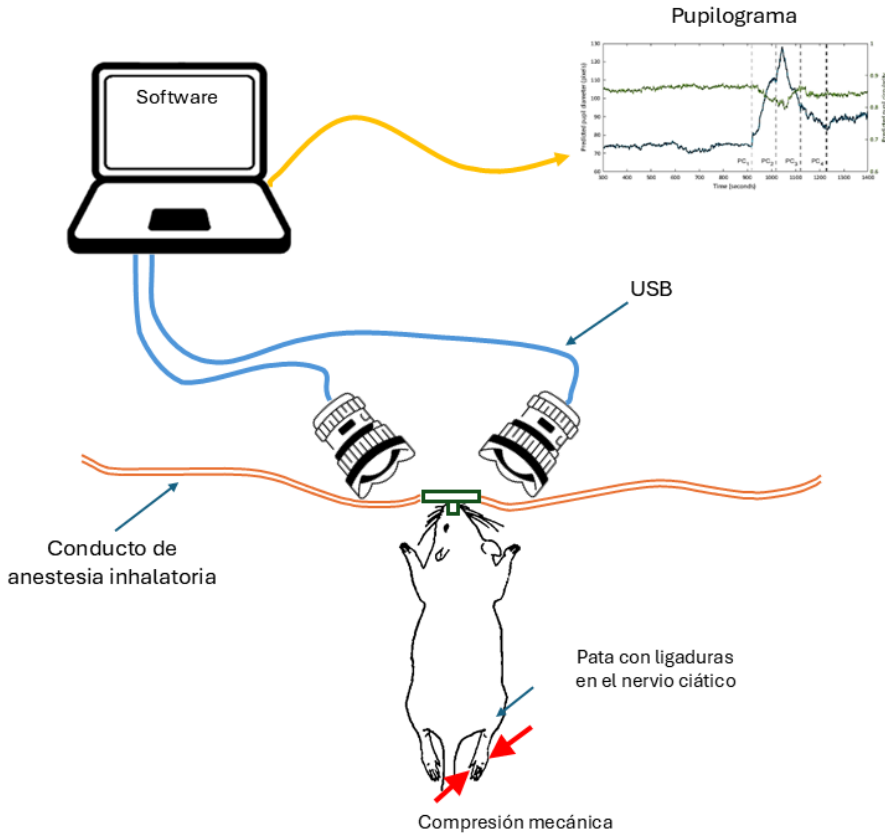


Figura 39. Vista esquemática del escenario experimental empleado.

5.2.4. Estimación del pupilograma

Se realizaron registros pupilares binoculares de los 21 sujetos experimentales. Como se describió en el Capítulo 3, la detección de la pupila se realizó empleando un modelo de aprendizaje profundo basado en la arquitectura SOLOv2, capaz de segmentar el área pupilar en cada fotograma. La tasa de video empleada fue de 10 fotogramas por segundo.

5.2.4.1. Procesado de las series temporales

Los pupilogramas generados mediante el modelo de aprendizaje automático fueron sometidos a técnicas de filtrado y reducción de ruido, siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.2.4.

5.2.5. Caracterización de la dinámica del pupilograma

Para caracterizar la dinámica de la respuesta pupilar ante los estímulos nociceptivos empleados en este estudio, se emplearon los siguientes índices, definidos exhaustivamente en la sección 4.2.5

- **Retardo (t_d):** mide el desfase en la respuesta pupilar entre ambos ojos.
- **Constante de tiempo (t_{63}):** describe la rapidez general del sistema pupilar ante un estímulo.
- **Tiempo de subida (t_{subida}):** caracteriza la velocidad de reacción inicial de la pupila, reflejando la activación del sistema nervioso responsable del cambio de diámetro.
- **Amplitud de pico (V_{max}):** evalúa la rapidez y sensibilidad con la que el sistema pupilar reacciona de forma máxima al estímulo. Como en el capítulo anterior, se utiliza para calcular la constante de tiempo y el tiempo de subida.
- **Respuestas máximas a 30 y 60 segundos (V_{max30} , V_{max60}):** cuantifican la capacidad máxima de reacción del sistema pupilar frente a un estímulo en un intervalo acotado, caracterizado su sensibilidad.
- **Tiempos de respuestas máximas a 30 y 60 segundos (t_{max30} , t_{max60}):** describen la rapidez y amplitud máxima del sistema dentro de un periodo específico.
- **Velocidades de respuestas máximas a 30 y 60 (Vel_{max30} , Vel_{max60}):** analizan la rapidez y eficiencia con que el sistema pupilar alcanza su amplitud máxima inicial, tanto a corto como a medio plazo.
- **Respuesta a 30, 60 y 90 segundos (V_{30} , V_{60} , V_{90}):** cuantifican la magnitud de la respuesta sostenida del sistema pupilar a medio y largo plazo, reflejando su dinámica de recuperación o estado estacionario en los intervalos temporales especificados.

5.2.6. Análisis estadístico

A partir de los pupilogramas obtenidos para el grupo experimental, se calcularon los índices propuestos para la cuantificación de la dinámica pupilar. Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM). Para cada ventana de estimulación se generó un pupilograma promedio, para reflejar la evolución temporal de la dilatación pupilar. La variabilidad en las respuestas individuales fue representada mediante

intervalos de confianza del 95%. Además, se utilizaron diagramas de violín para representar la distribución de las respuestas pupilares frente a cada estímulo. Estos diagramas proporcionaron una visión integral de la densidad de los datos.

Para garantizar la validez de los análisis estadísticos, se identificaron y eliminaron valores atípicos siguiendo el criterio del rango intercuartílico (IQR), según lo descrito en la sección 4.2.5. Para analizar las diferencias en las respuestas pupilares, se aplicaron distintos métodos estadísticos, según las variables de interés, como el ojo (derecho o izquierdo), el sexo (macho o hembra), los estímulos administrados (D_1 , D_2 , I_1 , I_2), y el grupo experimental (naïve y dolor crónico). Todos los análisis consideraron la estructura de datos repetidos.

Para la comparación entre ojos (derecho e izquierdo) se utilizó una prueba *t* de muestras dependientes (*t* pareada), adecuada para datos emparejados proporcionados por cada sujeto. Como hipótesis nula se consideró que no existían diferencias significativas entre las respuestas pupilares de ambos ojos. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Para verificar la normalidad de los datos, se empleó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. En los casos en que los datos no cumplieron con este supuesto, se recurrió a la prueba no paramétrica Wilcoxon Signed-Rank como alternativa.

Para la comparación entre estímulos nociceptivos se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) para evaluar diferencias en la respuesta pupilar frente a los diferentes estímulos administrados dentro del mismo grupo de sujetos. La hipótesis nula asumió la ausencia de diferencias significativas entre las condiciones. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas, se realizó un análisis post hoc para identificar diferencias. En función del número de comparación, se aplicaron las correcciones de Bonferroni o Tukey, siguiendo lo indicado en la sección 4.2.6.

Para evaluar la relación entre las medidas de interés, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r). Esta prueba se empleó debido a su capacidad para medir la fuerza y la dirección de una relación lineal entre dos variables cuantitativas. El análisis estadístico se realizó con el software MATLAB (Mathworks).

5.3. RESULTADOS

En primer lugar, se observa que la estimulación nociceptiva mediante la aplicación de la compresión de las patas traseras desencadena una respuesta de dilatación pupilar. No obstante, la dinámica y amplitud de esta respuesta pupilar difiere entre ojos, sexo y en condiciones de dolor neuropático a largo plazo. En este sentido, se muestran los resultados del análisis la respuesta pupilar ante los estímulos nociceptivos de los animales naïve (sin dolor) y los animales con dolor crónico a largo plazo (CCI) por separado, para posteriormente realizar una comparación entre ambos grupos experimentales.

5.3.1. Animales naïve

5.3.1.1. Comparativa entre ojos y sexo

Comparativa entre ojos en machos

En primer lugar, se realizó la comparación entre las respuestas del ojo derecho respecto al ojo izquierdo para cada estimulación.

La **Figura 40** muestra la respuesta pupilar de cada ojo a cada una de las 4 estimulaciones realizadas.

En la **Figura 41** se puede observar la distribución de los índices propuestos para cada ojo y los valores promedio y su error estándar de la media para cada ojo se detallan en la **Tabla 11**.

Los resultados muestran que en la primera estimulación en la pata derecha (D_1), no existen diferencias significativas entre ojos, aunque sí para las otras 3 estimulaciones.

En el segundo estímulo en la pata derecha (D_2) existen diferencias significativas en el inicio de la respuesta (retardo) siendo mayor en el ojo derecho y para los índices V_{60} y V_{90} . El retardo proporciona información sobre la lateralización de la respuesta inicial y los valores del diámetro, sobre la respuesta tardía. Como se puede observar en la **Figura 40**, el diámetro pupilar continúa aumentando tras la respuesta inicial, a diferencia de lo que ocurre tras la estimulación D_1 que regresa a un estado de equilibrio.

En ambas estimulaciones sobre la pata izquierda existe una diferencia significativa en las constantes de tiempo (t_{63}) siendo menores las del ojo izquierdo. Esto indica una respuesta más rápida de este ojo respecto al

derecho a la hora de alcanzar el valor máximo de la respuesta inicial. Además, en la estimulación I_1 las velocidades en alcanzar los máximos antes de los 30 y 60 segundos (Vel_{max30} , Vel_{max60}) son significativamente mayores en el ojo izquierdo.

Por otro lado, en la estimulación I_2 , el tiempo de subida es significativamente menor en el ojo izquierdo, indicando una mayor rapidez en la respuesta inicial.

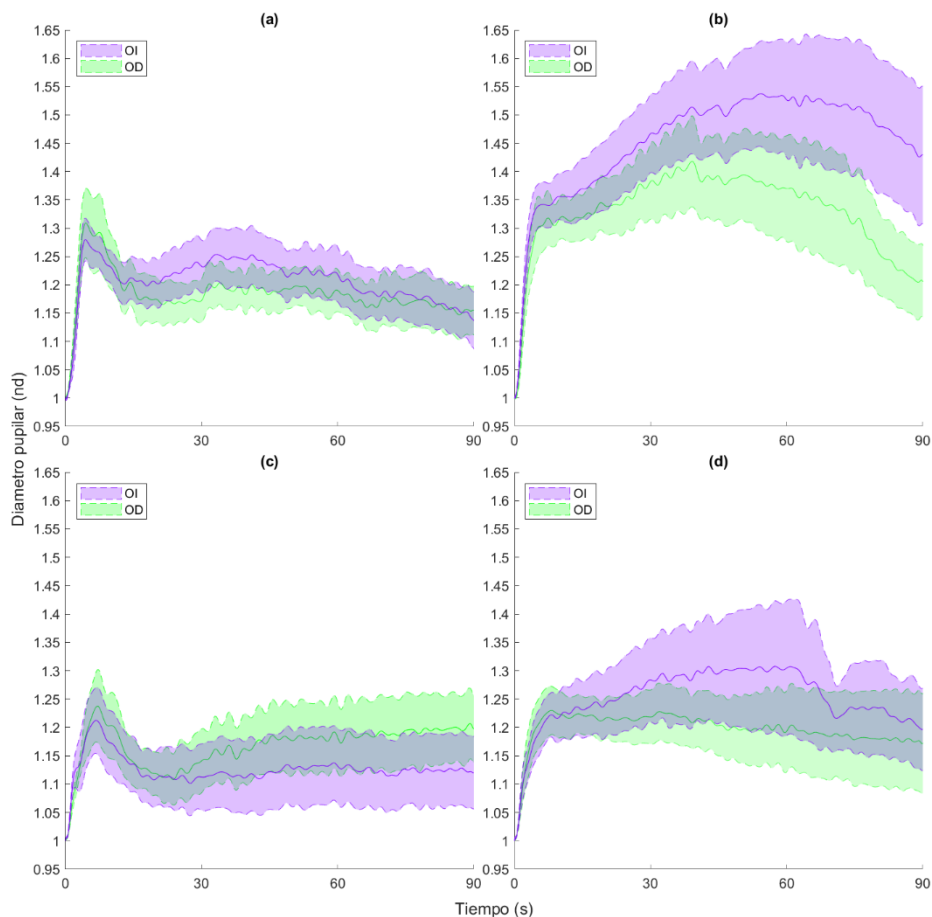


Figura 40. Respuesta pupilar del grupo de machos naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

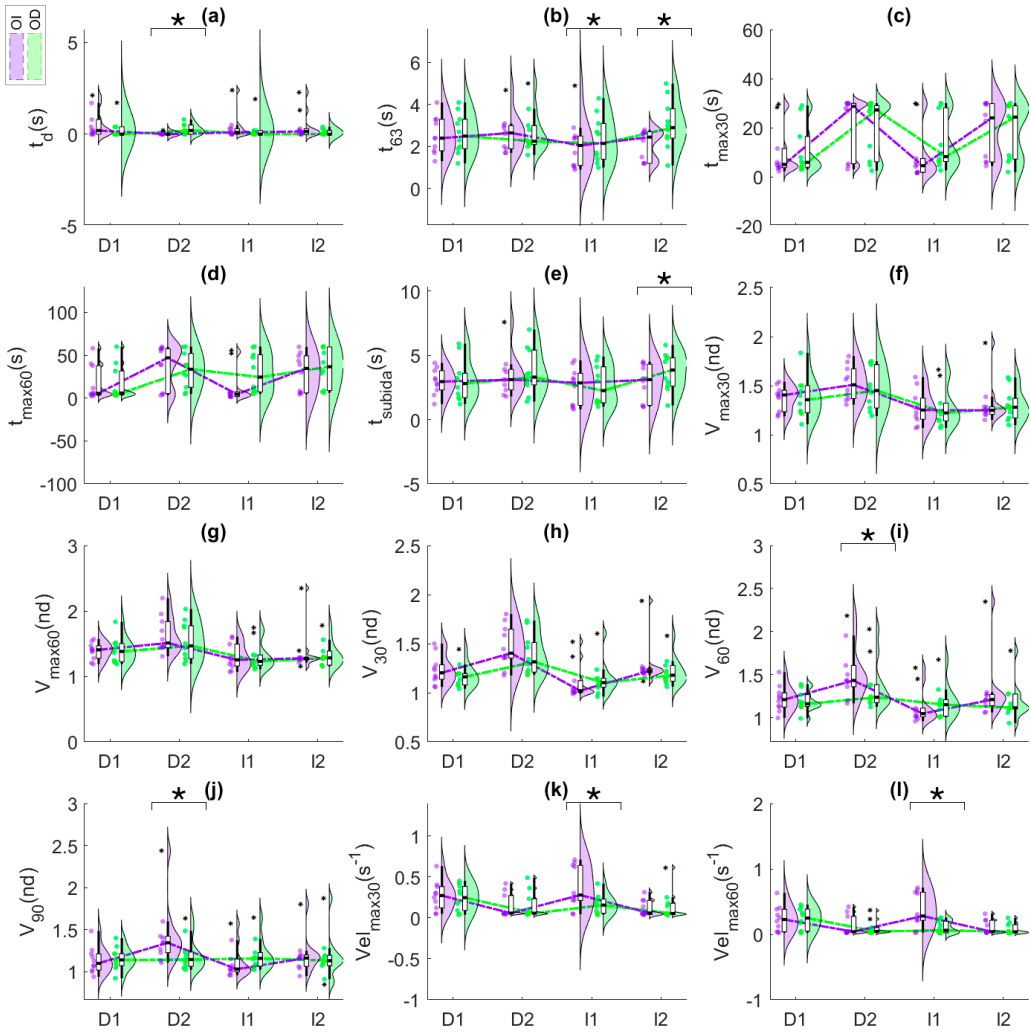


Figura 41. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de machos naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D₁); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D₂); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I₁); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I₂). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

La **Figura 42a** describe la significancia estadística asociada a las comparaciones entre ojos estimada con la prueba t pareada o la prueba no paramétrica de Wilcoxon Signed-Rank, según la normalidad de los datos. La **Figura 42b** muestra el coeficiente de correlación de Pearson entre las respuestas de ambos ojos.

Tabla 11. Promedios para cada ojo, estimados en machos naïve, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD
t _d (s)	0.42±0.33	0.10±0.07	0.00±0.00	0.29±0.10	0.10±0.05	0.05±0.03	0.04±0.04	0.11±0.06
t ₆₃ (s)	2.36±0.28	2.77±0.29	2.45±0.21	2.44±0.22	1.89±0.27	2.18±0.36	2.11±0.25	2.82±0.34
t _{max30} (s)	4.97±1.15	10.69±3.19	18.23±4.95	19.79±3.72	3.94±0.86	13.67±3.49	15.66±4.54	18.95±3.62
t _{max60} (s)	16.11±7.45	16.64±6.41	32.64±8.71	32.79±6.55	3.64±0.80	29.38±7.44	27.02±8.16	35.63±7.11
t _{subida} (s)	2.79±0.30	3.04±0.51	2.98±0.29	3.69±0.56	2.73±0.47	2.65±0.48	3.11±0.45	3.71±0.47
V _{max30} (nd)	1.37±0.04	1.34±0.05	1.49±0.05	1.40±0.06	1.24±0.05	1.18±0.03	1.25±0.02	1.26±0.05
V _{max60} (nd)	1.41±0.05	1.38±0.05	1.52±0.08	1.40±0.09	1.27±0.08	1.20±0.03	1.26±0.01	1.23±0.02
V ₃₀ (nd)	1.20±0.07	1.16±0.03	1.38±0.08	1.31±0.07	1.01±0.01	1.10±0.03	1.22±0.01	1.14±0.02
V ₆₀ (nd)	1.22±0.07	1.22±0.04	1.38±0.06	1.24±0.03	1.03±0.02	1.14±0.04	1.20±0.03	1.14±0.04
V ₉₀ (nd)	1.17±0.06	1.21±0.04	1.30±0.06	1.13±0.03	1.07±0.05	1.16±0.05	1.13±0.04	1.15±0.03
Vel _{tmax30} (s ⁻¹)	0.27±0.06	0.22±0.05	0.14±0.05	0.14±0.06	0.37±0.08	0.17±0.04	0.12±0.03	0.10±0.03
Vel _{tmax60} (s ⁻¹)	0.24±0.06	0.20±0.06	0.13±0.05	0.05±0.01	0.37±0.08	0.09±0.03	0.11±0.03	0.06±0.02

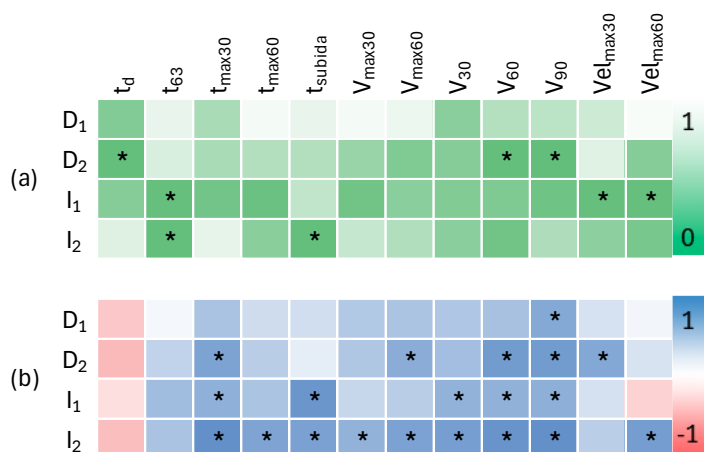


Figura 42. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en machos naïve para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$.

En cuanto a la correlación estimada, se aprecia una baja correlación entre ojos para las respuestas para la estimulación D_1 , excepto para la amplitud a los 90 segundos (V_{90}) cuyos índices presentan una correlación positiva fuerte.

Respecto a la estimulación D_2 , se manifiesta una correlación positiva fuerte entre ambas respuestas para la amplitud de la respuesta a los 60 y 90 segundos (V_{60} , V_{90}), el máximo antes de los 60 segundos ($V_{\max60}$), el tiempo en alcanzar el máximo antes de los 30 segundos ($t_{\max30}$) y la velocidad en alcanzar este último ($Vel_{\max30}$). Esto se ve reflejado en la **Figura 40b**, en la que la forma de las respuestas a partir de los 30 segundos parece proporcional siendo de mayor tamaño la amplitud de la respuesta del ojo izquierdo.

Se aprecia una correlación positiva moderada entre las respuestas de ambos ojos en la estimulación I_1 para los tiempos en alcanzar los máximos antes de los 30 segundos ($t_{\max30}$) y las amplitudes de respuesta V_{30} , V_{60} y V_{90} , así como una correlación positiva fuerte para los tiempos de subida de ambas respuestas. Este comportamiento se pone de manifiesto en la **Figura 40c**.

Según la **Figura 42b**, para la estimulación I_2 se evidencia una fuerte correlación positiva entre las respuestas de ambos ojos para el $t_{\max30}$, los valores de amplitud a los 60 y 90 segundos ($V_{\max30}$, $V_{\max60}$) y la velocidad para alcanzar el máximo antes de los 60 segundos ($Vel_{\max60}$), así como una correlación positiva moderada entre $t_{\max60}$, el tiempo de subida y los valores de amplitud de los máximos antes de los 30 y 60 segundos ($V_{\max30}$, $V_{\max60}$).

Comparativa entre ojos en hembras

La **Figura 43** muestra la respuesta pupilar de cada ojo a cada una de las 4 estimulaciones realizadas. En la **Figura 44** se puede observar la distribución de los índices propuestos para cada ojo y los valores promedio y su error estándar de la media para cada ojo se detallan en la **Tabla 12**.

La **Figura 45a** describe la significancia estadística asociada a las comparaciones entre ojos estimada con la prueba t pareada o la prueba no paramétrica de Wilcoxon Signed-Rank, según la normalidad de los datos, mientras que la **Figura 45b** muestra el mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en hembras.

En la **Figura 45a**, para la estimulación D_1 , se observa una diferencia significativa en el inicio de las respuestas de ambos ojos (t_d), siendo mayor el retardo del ojo contralateral a la estimulación (ojo izquierdo).

En las estimulaciones de la pata izquierda únicamente se observan diferencias significativas para la segunda estimulación en $t_{\max 30}$, siendo más rápida la respuesta del ojo izquierdo.

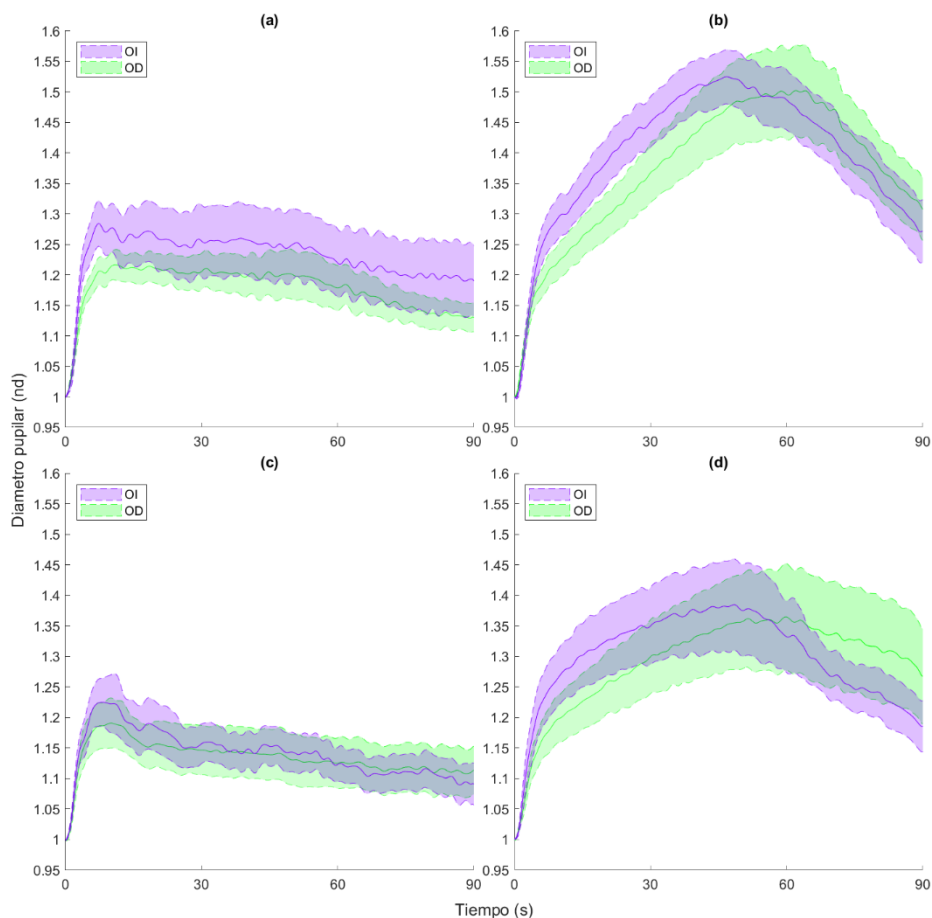


Figura 43. Respuesta pupilar del grupo de hembras naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Según la **Figura 45b**, que muestra el coeficiente de correlación de Pearson entre las respuestas de ambos ojos, las respuestas al estímulo D₁ presentan una correlación positiva fuerte en $V_{\max30}$, $V_{\max60}$, V_{30} y V_{60} . Esto indica una fuerte relación entre la amplitud de la respuesta en ambos ojos durante los primeros 60 segundos. Sugiere una alta sincronización en la respuesta inicial y sostenida a la primera estimulación en la pata derecha.

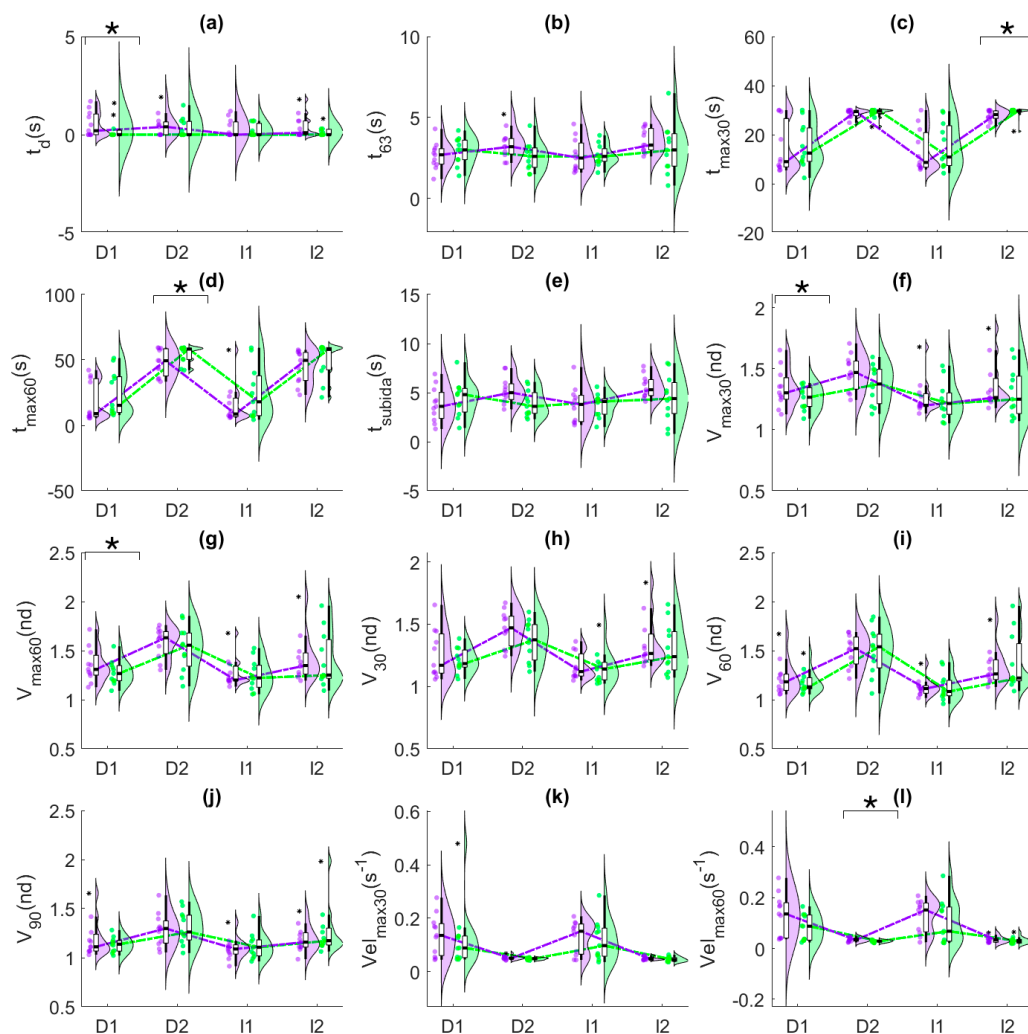


Figura 44. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de hembras naïve tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D₁); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D₂); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I₁); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I₂). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Tabla 12. Promedios para cada ojo, estimados en hembras naïve, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD
t _d (s)	0.39±0.21	0.04±0.04	0.31±0.14	0.29±0.12	0.33±0.16	0.21±0.11	0.32±0.14	0.07±0.04
t ₆₃ (s)	2.63±0.27	2.95±0.26	3.19±0.23	2.59±0.27	2.77±0.32	2.65±0.20	3.50±0.22	3.08±0.47
t _{max30} (s)	14.44±3.14	16.66±3.26	28.73±0.48	29.32±0.33	13.45±2.65	15.06±2.77	27.83±0.68	29.62±0.18
t _{max60} (s)	16.32±4.64	24.77±5.12	47.63±3.37	54.23±2.00	11.80±2.28	24.27±6.13	43.58±4.05	49.75±4.19
t _{subida} (s)	3.80±0.53	4.37±0.55	5.24±0.41	3.90±0.41	3.76±0.54	3.73±0.36	5.59±0.35	4.47±0.72
V _{max30} (nd)	1.32±0.05	1.26±0.03	1.45±0.04	1.37±0.05	1.23±0.02	1.24±0.05	1.32±0.04	1.31±0.06
V _{max60} (nd)	1.33±0.05	1.28±0.04	1.57±0.05	1.52±0.07	1.23±0.03	1.25±0.05	1.36±0.04	1.40±0.09
V ₃₀ (nd)	1.24±0.06	1.20±0.03	1.44±0.04	1.35±0.05	1.15±0.03	1.12±0.03	1.30±0.04	1.27±0.06
V ₆₀ (nd)	1.16±0.04	1.15±0.02	1.46±0.06	1.48±0.08	1.09±0.01	1.14±0.05	1.24±0.03	1.34±0.09
V ₉₀ (nd)	1.15±0.05	1.12±0.02	1.28±0.07	1.31±0.06	1.09±0.02	1.11±0.04	1.16±0.04	1.20±0.04
Vel _{tmax30} (s ⁻¹)	0.12±0.02	0.09±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00	0.13±0.02	0.12±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00
Vel _{tmax60} (s ⁻¹)	0.14±0.03	0.08±0.02	0.04±0.00	0.03±0.00	0.13±0.02	0.09±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00

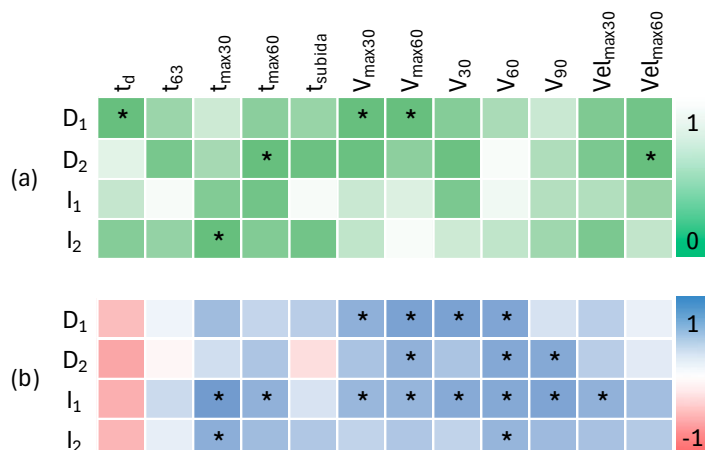


Figura 45. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en hembras naïve para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en hembras. Proporciona una representación visual de los coeficientes de correlación de Pearson entre el ojo izquierdo y el derecho en cada estímulo y para cada índice empleado. En la escala de color, 1.0 representa una correlación positiva perfecta, -1.0 una correlación negativa perfecta y 0 ninguna correlación. En todos los casos, se representan con * los valores con $p < 0,05$.

La **Figura 43b** representa la respuesta pupilar para la estimulación D_2 . En ella se observa una diferencia significativa en el tiempo en alcanzar la máxima amplitud de respuesta antes de los 60 segundos y la velocidad en alcanzarla ($t_{\max 60}$, $Vel_{\max 60}$), siendo la respuesta del ojo izquierdo más rápida y veloz.

Las respuestas pupilares ante la estimulación D_2 presenta una correlación positiva moderada-fuerte en la amplitud $V_{\max 60}$, V_{30} , V_{60} y V_{90} . La correlación con V_{60} que se mantiene de la anterior estimulación y la aparición de la correlación con V_{90} sugieren que las respuestas mantienen una alta sincronización durante más tiempo. Esto podría indicar un proceso de sensibilización o facilitación de la respuesta, donde la primera estimulación prepara al sistema para responder de manera más intensa y prolongada a estímulos posteriores, fenómeno que se puede observar en la **Figura 43b**.

Para la primera estimulación izquierda (I_1), las dinámicas pupilares de ambos ojos reflejan correlaciones positivas moderadas en $t_{\max 60}$, $V_{\max 30}$, $V_{\max 60}$, y $Vel_{\max 30}$ y correlaciones positivas fuertes en $t_{\max 30}$, V_{30} , V_{60} y V_{90} , indicando una alta linealidad en la amplitud y los máximos de las respuestas de ambos ojos.

Se aprecia una correlación positiva moderada la estimulación I_2 para los índices $t_{\max 30}$ y V_{60} . Aunque se observa cierta sincronización en las respuestas, se refleja claramente una dinámica más rápida en el ojo izquierdo en la respuesta inicial y en la recuperación.

5.3.1.2. Comparativa entre estimulaciones y sexo

Comparativa entre estimulaciones en machos

La **Tabla 13** detalla la comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos.

La **Figura 46(a, c)** muestra la significancia estadística asociada a las comparaciones entre estimulaciones para cada uno de los ojos (prueba ANOVA - Bonferroni) en el caso del grupo de machos. La **Figura 46(b, d)** muestra la correlación de Pearson entre estimulaciones en machos.

Para las respuestas del ojo derecho no se observan diferencias significativas excepto en 2 comparaciones. Entre las estimulaciones D_1 y D_2 se observa una diferencia significativa entre las velocidades en alcanzar el máximo antes de los 60 segundos ($Vel_{\max 60}$), siendo más veloz en D_1 . En las respuestas se observa como en D_1 tras la dilatación por el estímulo se

regresa al valor basal siendo el máximo la respuesta inicial, y en D2 la dilatación, aunque más intensa inicialmente, sigue creciendo durante un periodo más prolongado (**Tabla 13, Figura 43**).

También se aprecian diferencias significativas entre las estimulaciones D₂ e I₁ para los índices V_{max30} y V₃₀. La respuesta ante D₂ es mucho más intensa que ante I₁, pudiendo indicar una sensibilización previa a D₂ al ser la segunda estimulación en la misma pata.

Si se atiende a la significancia estadística asociada a las respuestas del ojo izquierdo (**Figura 46(a, c)**), se advierte que entre las estimulaciones D₂ e I₁ existen diferencias significativas en los índices t_{max30}, t_{max60}, V_{max30}, V₃₀, V₆₀, V₉₀, Vel_{max30} y Vel_{max60}. Esto refleja lo observado en la **Figura 40**, cómo las amplitudes de las respuestas son mayores en D₂, pero en I₁ se aprecia como el máximo de la respuesta que ocurre inmediatamente tras la estimulación y se regresa al estado basal.

Se observan diferencias significativas entre la amplitud de los máximos de las respuestas ante las estimulaciones D₂ e I₂ para el ojo izquierdo, siendo mayor en ambos casos para D₂.

También se identifican diferencias entre las estimulaciones de la pata izquierda (I₁ e I₂) para las velocidades en alcanzar los máximos antes de los 30 y 60 segundos siendo más veloz ante la primera de ellas.

En la **Figura 46b**, se aprecia la baja similitud entre las respuestas del ojo derecho con algunas excepciones. Las respuestas a las estimulaciones sobre la pata derecha (D₁ y D₂) presentan una correlación positiva fuerte en la constante de tiempo (t₆₃). Igualmente, se aprecia una correlación positiva fuerte entre las respuestas a D₁ e I₁ en t_{max60}, alcanzándolo antes en la estimulación D₁.

Al comparar las estimulaciones D₂ e I₂ se aprecia una correlación positiva fuerte para t_{max30} y Vel_{max30}, siendo el crecimiento de la respuesta más veloz a D₂, aunque tarda más en alcanzar dicho máximo. Por último, los tiempos de subida y las velocidades en alcanzar el máximo antes de los 60 segundos entre las estimulaciones I₁ e I₂ presentan una correlación positiva fuerte.

Tabla 13. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos naïve. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

OJO DERECHO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.10±0.07	0.29±0.10	0.10±0.07	0.05±0.03	0.10±0.07	0.11±0.06	0.29±0.10	0.05±0.03	0.29±0.10	0.11±0.06	0.05±0.03	0.11±0.06
t ₆₃ (s)	2.77±0.29	2.44±0.22	2.77±0.29	2.18±0.36	2.77±0.29	2.82±0.34	2.44±0.22	2.18±0.36	2.44±0.22	2.82±0.34	2.18±0.36	2.82±0.34
t _{max30} (s)	10.69±3.19	19.79±3.72	10.69±3.19	13.67±3.49	10.69±3.19	18.95±3.62	19.79±3.72	13.67±3.49	19.79±3.72	18.95±3.62	13.67±3.49	18.95±3.62
t _{max60} (s)	16.64±6.41	32.79±6.55	16.64±6.41	29.38±7.44	16.64±6.41	35.63±7.11	32.79±6.55	29.38±7.44	32.79±6.55	35.63±7.11	29.38±7.44	35.63±7.11
t _{subida} (s)	3.04±0.51	3.69±0.56	3.04±0.51	2.65±0.48	3.04±0.51	3.71±0.47	3.69±0.56	2.65±0.48	3.69±0.56	3.71±0.47	2.65±0.48	3.71±0.47
V _{max30} (nd)	1.34±0.05	1.40±0.06	1.34±0.05	1.18±0.03	1.34±0.05	1.26±0.05	1.40±0.06	1.18±0.03	1.40±0.06	1.26±0.05	1.18±0.03	1.26±0.05
V _{max60} (nd)	1.38±0.05	1.40±0.09	1.38±0.05	1.20±0.03	1.38±0.05	1.23±0.02	1.40±0.09	1.20±0.03	1.40±0.09	1.23±0.02	1.20±0.03	1.23±0.02
V ₃₀ (nd)	1.16±0.03	1.31±0.07	1.16±0.03	1.10±0.03	1.16±0.03	1.14±0.02	1.31±0.07	1.10±0.03	1.31±0.07	1.14±0.02	1.10±0.03	1.14±0.02
V ₆₀ (nd)	1.22±0.04	1.24±0.03	1.22±0.04	1.14±0.04	1.22±0.04	1.14±0.04	1.24±0.03	1.14±0.04	1.24±0.03	1.14±0.04	1.14±0.04	1.14±0.04
V ₉₀ (nd)	1.21±0.04	1.13±0.03	1.21±0.04	1.16±0.05	1.21±0.04	1.15±0.03	1.13±0.03	1.16±0.05	1.13±0.03	1.15±0.03	1.16±0.05	1.15±0.03
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.22±0.05	0.14±0.06	0.22±0.05	0.17±0.04	0.22±0.05	0.10±0.03	0.14±0.06	0.17±0.04	0.14±0.06	0.10±0.03	0.17±0.04	0.10±0.03
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.20±0.06	0.05±0.01	0.20±0.06	0.09±0.03	0.20±0.06	0.06±0.02	0.05±0.01	0.09±0.03	0.05±0.01	0.06±0.02	0.09±0.03	0.06±0.02
OJO IZQUIERDO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.42±0.33	0.00±0.00	0.42±0.33	0.10±0.05	0.42±0.33	0.04±0.04	0.00±0.00	0.10±0.05	0.00±0.00	0.04±0.04	0.10±0.05	0.04±0.04
t ₆₃ (s)	2.36±0.28	2.45±0.21	2.36±0.28	1.89±0.27	2.36±0.28	2.11±0.25	2.45±0.21	1.89±0.27	2.45±0.21	2.11±0.25	1.89±0.27	2.11±0.25
t _{max30} (s)	4.97±1.15	18.23±4.95	4.97±1.15	3.94±0.86	4.97±1.15	15.66±4.54	18.23±4.95	3.94±0.86	18.23±4.95	15.66±4.54	3.94±0.86	15.66±4.54
t _{max60} (s)	16.11±7.45	32.64±8.71	16.11±7.45	3.64±0.80	16.11±7.45	27.02±8.16	32.64±8.71	3.64±0.80	32.64±8.71	27.02±8.16	3.64±0.80	27.02±8.16
t _{subida} (s)	2.79±0.30	2.98±0.29	2.79±0.30	2.73±0.47	2.79±0.30	3.11±0.45	2.98±0.29	2.73±0.47	2.98±0.29	3.11±0.45	2.73±0.47	3.11±0.45
V _{max30} (nd)	1.37±0.04	1.49±0.05	1.37±0.04	1.24±0.05	1.37±0.04	1.25±0.02	1.49±0.05	1.24±0.05	1.49±0.05	1.25±0.02	1.24±0.05	1.25±0.02
V _{max60} (nd)	1.41±0.05	1.52±0.08	1.41±0.05	1.27±0.08	1.41±0.05	1.26±0.01	1.52±0.08	1.27±0.08	1.52±0.08	1.26±0.01	1.27±0.08	1.26±0.01
V ₃₀ (nd)	1.20±0.07	1.38±0.08	1.20±0.07	1.01±0.01	1.20±0.07	1.22±0.01	1.38±0.08	1.01±0.01	1.38±0.08	1.22±0.01	1.01±0.01	1.22±0.01
V ₆₀ (nd)	1.22±0.07	1.38±0.06	1.22±0.07	1.03±0.02	1.22±0.07	1.20±0.03	1.38±0.06	1.03±0.02	1.38±0.06	1.20±0.03	1.03±0.02	1.20±0.03
V ₉₀ (nd)	1.17±0.06	1.30±0.06	1.17±0.06	1.07±0.05	1.17±0.06	1.13±0.04	1.30±0.06	1.07±0.05	1.30±0.06	1.13±0.04	1.07±0.05	1.13±0.04
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.27±0.06	0.14±0.05	0.27±0.06	0.37±0.08	0.27±0.06	0.12±0.03	0.14±0.05	0.37±0.08	0.14±0.05	0.12±0.03	0.37±0.08	0.12±0.03
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.24±0.06	0.13±0.05	0.24±0.06	0.37±0.08	0.24±0.06	0.11±0.03	0.13±0.05	0.37±0.08	0.13±0.05	0.11±0.03	0.37±0.08	0.11±0.03

Caracterización de la respuesta pupilar ante estímulos nociceptivos y evaluación en dolor crónico a largo plazo

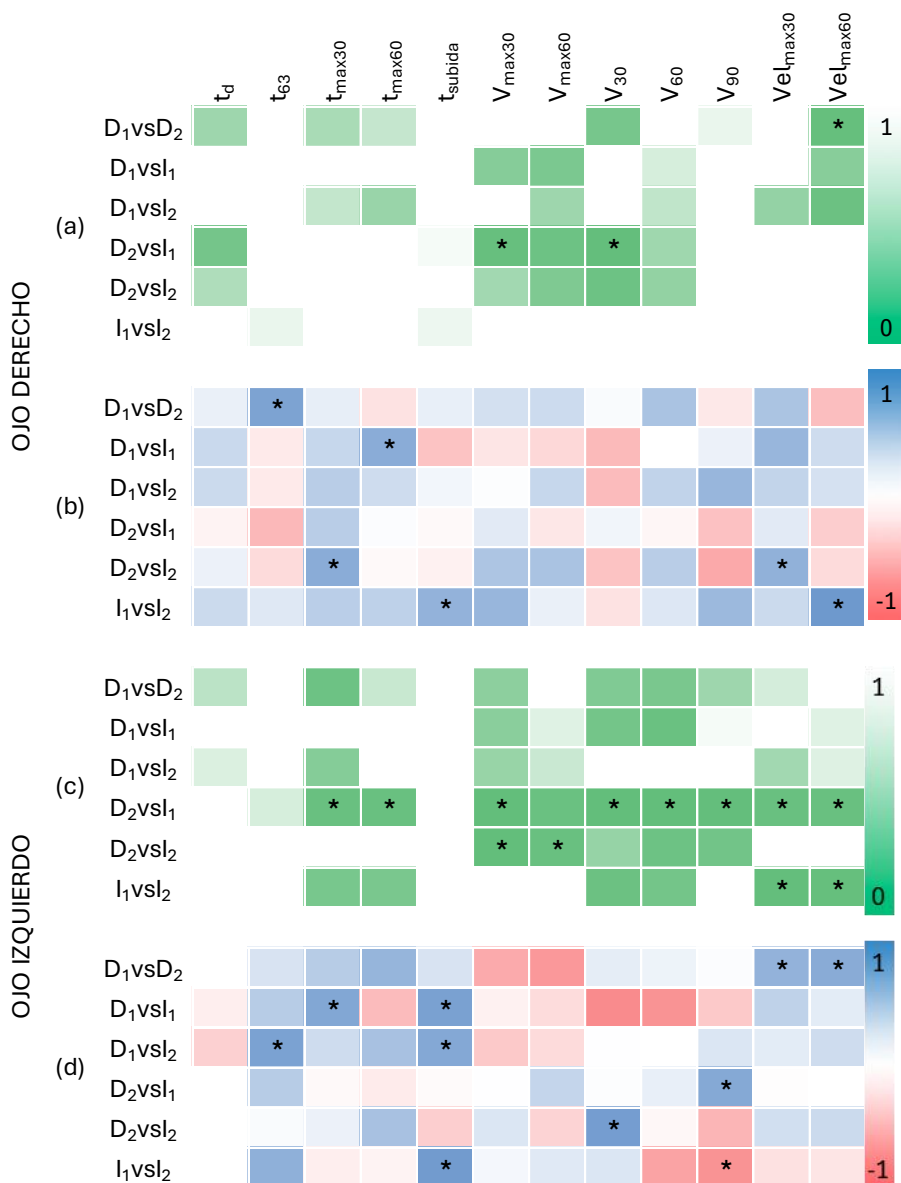


Figura 46. (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos naïve. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en machos.

Comparativa entre estimulaciones en hembras

La **Tabla 14** ilustra las diferencias entre los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación, para cada ojo y en el caso de las hembras.

La **Figura 47(a, c)** detalla la significancia estadística en las hembras asociada a las comparaciones entre estimulaciones para cada uno de los ojos según la prueba ANOVA – Bonferroni. La **Figura 47(b, d)** muestra los coeficientes de correlación de Pearson.

A diferencia de los machos, las hembras presentan un mayor número de índices con significancia estadística. En la **Figura 47(a, c)** se pueden observar diferencias significativas en $t_{\max 30}$ y $t_{\max 60}$ entre las primeras estimulaciones de una pata respecto a las segundas (D_1 vs D_2 e I_1 vs I_2) para ambos ojos. Las estimulaciones D_1 e I_1 son significativamente más rápidas en alcanzar dichos máximos. Esto podría ser debido a una sensibilización que cause una respuesta de mayor intensidad y duración ante el segundo estímulo. En el caso de las respuestas del ojo izquierdo, estas también presentan diferencias en las velocidades en alcanzar los máximos, siendo significativamente más veloces D_1 e I_1 . También se aprecian diferencias significativas en ambos ojos en las comparaciones D_1 vs I_2 y D_2 vs I_1 para los mismos índices. Esto se explica por la similitud entre las respuestas D_1 - I_1 y D_2 - I_2 (**Figura 43**).

Las respuestas del ojo derecho ante D_1 y D_2 presentan diferencias significativas en V_{60} y V_{90} , índices que proporcionan información relevante sobre la recuperación de la dilatación pupilar tras la respuesta inicial. Al observar la **Figura 43** se aprecia cómo la respuesta a D_1 retorna a valores cercanos a la basal, no así la respuesta a D_2 .

Según la **Figura 47b**, todas las respuestas del ojo derecho presentan una correlación positiva fuerte entre las amplitudes de los máximos antes de los 30 y 60 segundos (excepto D_1 frente a I_1 en este último). Por el contrario, las respuestas del ojo izquierdo no presentan dichas correlaciones entre ellas.

Tabla 14. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras naïve. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

OJO DERECHO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.04±0.04	0.29±0.12	0.04±0.04	0.21±0.11	0.04±0.04	0.07±0.04	0.29±0.12	0.21±0.11	0.29±0.12	0.07±0.04	0.21±0.11	0.07±0.04
t _{e3} (s)	2.95±0.26	2.59±0.27	2.95±0.26	2.65±0.20	2.95±0.26	3.08±0.47	2.59±0.27	2.65±0.20	2.59±0.27	3.08±0.47	2.65±0.20	3.08±0.47
t _{max30} (s)	16.66±3.26	29.32±0.33	16.66±3.26	15.06±2.77	16.66±3.26	29.62±0.18	29.32±0.33	15.06±2.77	29.32±0.33	29.62±0.18	15.06±2.77	29.62±0.18
t _{max60} (s)	24.77±5.12	54.23±2.00	24.77±5.12	24.27±6.13	24.77±5.12	49.75±4.19	54.23±2.00	24.27±6.13	54.23±2.00	49.75±4.19	24.27±6.13	49.75±4.19
t _{subida} (s)	4.37±0.55	3.90±0.41	4.37±0.55	3.73±0.36	4.37±0.55	4.47±0.72	3.90±0.41	3.73±0.36	3.90±0.41	4.47±0.72	3.73±0.36	4.47±0.72
V _{max30} (nd)	1.26±0.03	1.37±0.05	1.26±0.03	1.24±0.05	1.26±0.03	1.31±0.06	1.37±0.05	1.24±0.05	1.37±0.05	1.31±0.06	1.24±0.05	1.31±0.06
V _{max60} (nd)	1.28±0.04	1.52±0.07	1.28±0.04	1.25±0.05	1.28±0.04	1.40±0.09	1.52±0.07	1.25±0.05	1.52±0.07	1.40±0.09	1.25±0.05	1.40±0.09
V ₃₀ (nd)	1.20±0.03	1.35±0.05	1.20±0.03	1.12±0.03	1.20±0.03	1.27±0.06	1.35±0.05	1.12±0.03	1.35±0.05	1.27±0.06	1.12±0.03	1.27±0.06
V ₆₀ (nd)	1.15±0.02	1.48±0.08	1.15±0.02	1.14±0.05	1.15±0.02	1.34±0.09	1.48±0.08	1.14±0.05	1.48±0.08	1.34±0.09	1.14±0.05	1.34±0.09
V ₉₀ (nd)	1.12±0.02	1.31±0.06	1.12±0.02	1.11±0.04	1.12±0.02	1.20±0.04	1.31±0.06	1.11±0.04	1.31±0.06	1.20±0.04	1.11±0.04	1.20±0.04
Vel _{lmax30} (s ⁻¹)	0.09±0.01	0.05±0.00	0.09±0.01	0.12±0.02	0.09±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00	0.12±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00	0.12±0.02	0.05±0.00
Vel _{lmax60} (s ⁻¹)	0.08±0.02	0.03±0.00	0.08±0.02	0.09±0.02	0.08±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00	0.09±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00	0.09±0.02	0.03±0.00
OJO IZQUIERDO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.39±0.21	0.31±0.14	0.39±0.21	0.33±0.16	0.39±0.21	0.32±0.14	0.31±0.14	0.33±0.16	0.31±0.14	0.32±0.14	0.33±0.16	0.32±0.14
t _{e3} (s)	2.63±0.27	3.19±0.23	2.63±0.27	2.77±0.32	2.63±0.27	3.50±0.22	3.19±0.23	2.77±0.32	3.19±0.23	3.50±0.22	2.77±0.32	3.50±0.22
t _{max30} (s)	14.44±3.14	28.73±0.48	14.44±3.14	13.45±2.65	14.44±3.14	27.83±0.68	28.73±0.48	13.45±2.65	28.73±0.48	27.83±0.68	13.45±2.65	27.83±0.68
t _{max60} (s)	16.32±4.64	47.63±3.37	16.32±4.64	11.80±2.28	16.32±4.64	43.58±4.05	47.63±3.37	11.80±2.28	47.63±3.37	43.58±4.05	11.80±2.28	43.58±4.05
t _{subida} (s)	3.80±0.53	5.24±0.41	3.80±0.53	3.76±0.54	3.80±0.53	5.59±0.35	5.24±0.41	3.76±0.54	5.24±0.41	5.59±0.35	3.76±0.54	5.59±0.35
V _{max30} (nd)	1.32±0.05	1.45±0.04	1.32±0.05	1.23±0.02	1.32±0.05	1.32±0.04	1.45±0.04	1.23±0.02	1.45±0.04	1.32±0.04	1.23±0.02	1.32±0.04
V _{max60} (nd)	1.33±0.05	1.57±0.05	1.33±0.05	1.23±0.03	1.33±0.05	1.36±0.04	1.57±0.05	1.23±0.03	1.57±0.05	1.36±0.04	1.23±0.03	1.36±0.04
V ₃₀ (nd)	1.24±0.06	1.44±0.04	1.24±0.06	1.15±0.03	1.24±0.06	1.30±0.04	1.44±0.04	1.15±0.03	1.44±0.04	1.30±0.04	1.15±0.03	1.30±0.04
V ₆₀ (nd)	1.16±0.04	1.46±0.06	1.16±0.04	1.09±0.01	1.16±0.04	1.24±0.03	1.46±0.06	1.09±0.01	1.46±0.06	1.24±0.03	1.09±0.01	1.24±0.03
V ₉₀ (nd)	1.15±0.05	1.28±0.07	1.15±0.05	1.09±0.02	1.15±0.05	1.16±0.04	1.28±0.07	1.09±0.02	1.28±0.07	1.16±0.04	1.09±0.02	1.16±0.04
Vel _{lmax30} (s ⁻¹)	0.12±0.02	0.05±0.00	0.12±0.02	0.13±0.02	0.12±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00	0.13±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00	0.13±0.02	0.05±0.00
Vel _{lmax60} (s ⁻¹)	0.14±0.03	0.04±0.00	0.14±0.03	0.13±0.02	0.14±0.03	0.03±0.00	0.04±0.00	0.13±0.02	0.04±0.00	0.03±0.00	0.13±0.02	0.03±0.00

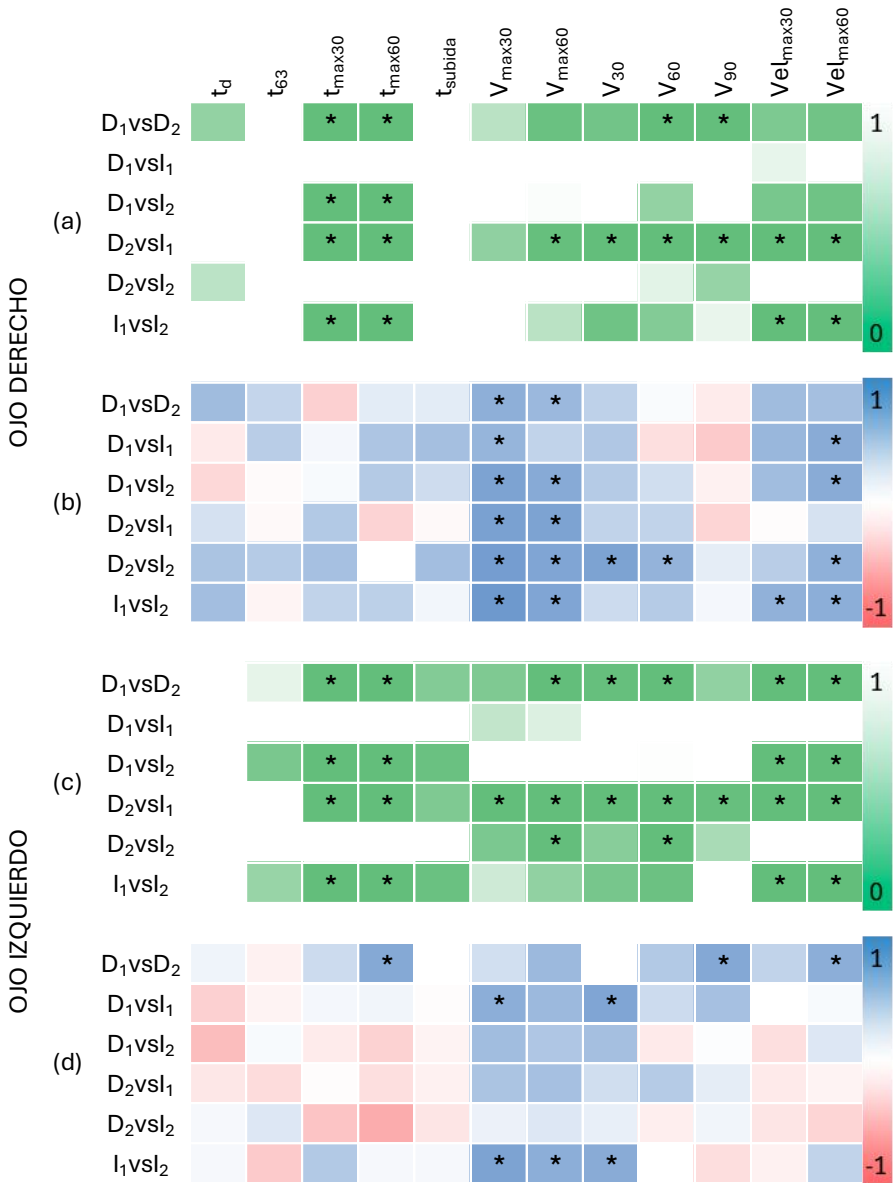


Figura 47. (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras naïve. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en hembras.

5.3.2. Animales con dolor crónico

5.3.2.1. Comparativa entre ojos y sexo

Se detallan a continuación los resultados obtenidos en el grupo de animales con dolor crónico a largo plazo, incidiendo en la comparativa de las respuestas pupilares entre ojos, y discriminando por sexo.

Comparativa entre ojos en machos

La **Figura 48** ilustra la respuesta pupilar de cada ojo en el grupo de machos CCI, tras cada uno de los cuatro estímulos.

En la **Figura 49** se observa la distribución de los índices propuestos para cada ojo y estímulo, y en la **Tabla 15** se detallan los valores promedio y su error estándar de la media para cada ojo.

La **Figura 50a** detalla la significancia estadística asociada a las comparaciones entre estimulaciones para cada uno de los ojos según la prueba ANOVA – Bonferroni. La **Figura 50b** muestra los coeficientes de correlación de Pearson.

Como se aprecia en la **Figura 50a**, solo existen diferencias significativas entre ojos en el primer y segundo estímulo a la pata derecha para el desfase temporal entre el inicio de la respuesta de ambos ojos (t_d), mayor en el ojo derecho, y en el primer estímulo en la pata derecha para la constante de tiempo t_{63} (sensiblemente mayor en el ojo izquierdo). No hay diferencias significativas en el resto de las ventanas de estimulación (**Figura 50a, Tabla 15**).

La constante de tiempo t_{63} proporciona una medida de la rapidez con la que el sistema pupilar evoluciona hacia su estado estacionario, y ayuda a identificando posibles retardos. La respuesta obtenida indica que, en el primer estímulo en la pata derecha, la dilatación transitoria en la pupila ipsilateral se produce con mayor velocidad que la contralateral.

En cuanto a la correlación, como ilustra la **Figura 50b**, se observa una correlación positiva fuerte entre la amplitud de la respuesta ($V_{\max30}$, $V_{\max60}$, V_{30} , V_{60} , V_{90}) de ambos ojos ante la estimulación D_1 .

También se aprecia una correlación positiva fuerte entre las respuestas ante las estimulaciones I_1 e I_2 , en este caso, para los índices de tiempo, $t_{\max30}$, $t_{\max60}$ y t_{subida} , y velocidad $Vel_{\max30}$ y $Vel_{\max60}$, siendo la respuesta del ojo izquierdo más rápida, aunque menos veloz lo que podría indicar una lateralización de la respuesta.

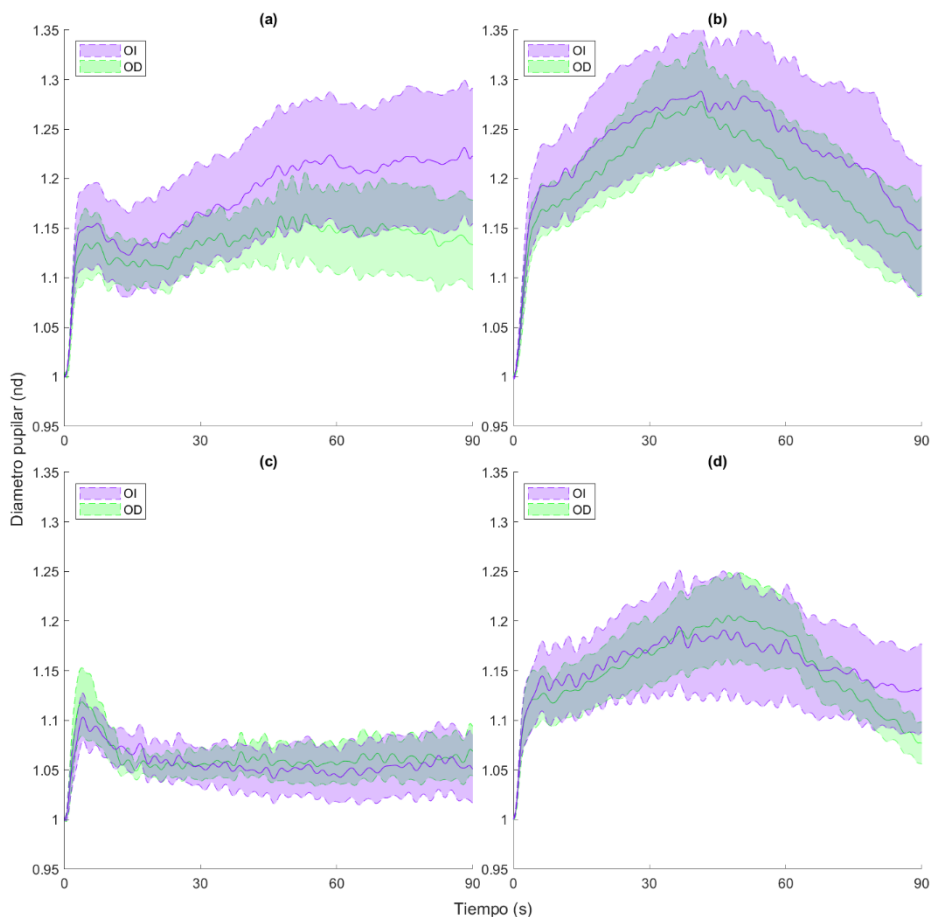


Figura 48. Respuesta pupilar del grupo de machos CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Caracterización de la respuesta pupilar ante estímulos nociceptivos y evaluación en dolor crónico a largo plazo

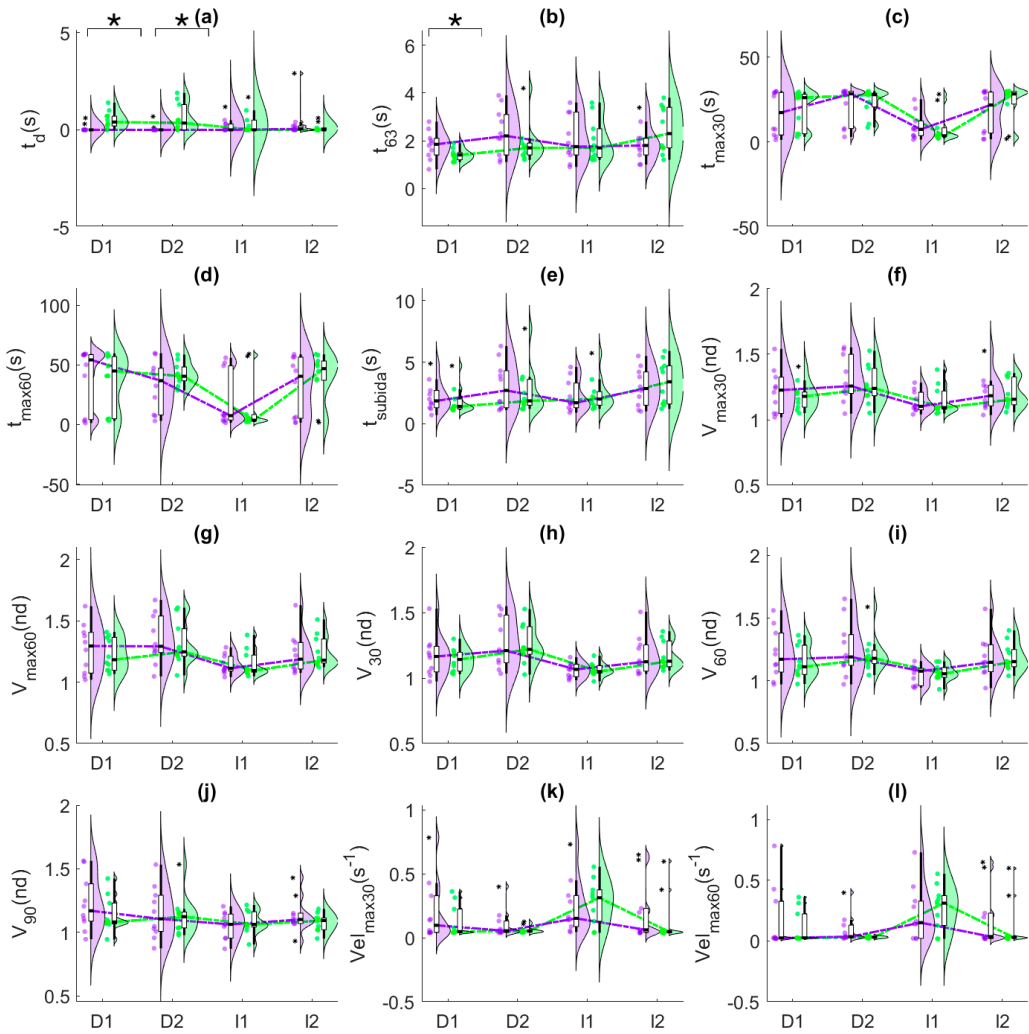


Figura 49. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de machos CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D₁); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D₂); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I₁); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I₂). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Tabla 15. Promedios para cada ojo, estimados en machos CCI, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD
t _d (s)	0.00±0.00	0.43±0.13	0.00±0.00	0.46±0.25	0.12±0.12	0.10±0.07	0.10±0.10	0.01±0.01
t ₆₃ (s)	1.73±0.19	1.37±0.08	2.32±0.35	1.62±0.10	2.08±0.34	2.03±0.31	1.73±0.19	2.31±0.31
t _{max30} (s)	16.88±4.08	13.48±4.59	21.69±3.48	21.45±3.84	9.27±2.46	4.62±0.79	17.73±3.97	28.80±0.54
t _{max60} (s)	39.35±8.16	25.22±9.71	32.55±6.74	46.55±3.62	19.24±7.29	4.62±0.79	31.77±7.91	49.12±2.83
t _{subida} (s)	1.91±0.29	1.45±0.20	2.73±0.55	2.14±0.37	2.13±0.44	2.00±0.28	3.00±0.55	3.43±0.67
V _{max30} (nd)	1.23±0.06	1.16±0.03	1.28±0.05	1.25±0.05	1.14±0.03	1.12±0.03	1.17±0.03	1.18±0.03
V _{max60} (nd)	1.27±0.06	1.23±0.04	1.35±0.06	1.31±0.06	1.14±0.02	1.15±0.03	1.23±0.05	1.24±0.04
V ₃₀ (nd)	1.17±0.05	1.14±0.03	1.27±0.06	1.25±0.05	1.06±0.02	1.06±0.02	1.18±0.05	1.17±0.03
V ₆₀ (nd)	1.22±0.06	1.17±0.04	1.25±0.07	1.17±0.02	1.05±0.02	1.08±0.02	1.19±0.05	1.17±0.03
V ₉₀ (nd)	1.25±0.09	1.16±0.04	1.16±0.09	1.09±0.03	1.05±0.03	1.10±0.02	1.10±0.01	1.09±0.02
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.15±0.05	0.17±0.06	0.08±0.02	0.05±0.00	0.20±0.05	0.24±0.06	0.09±0.03	0.04±0.00
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.11±0.06	0.13±0.05	0.07±0.02	0.03±0.00	0.19±0.05	0.22±0.05	0.07±0.03	0.03±0.00

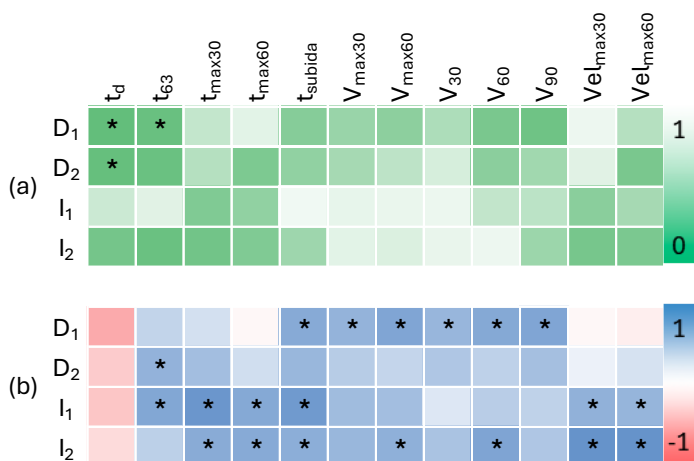


Figura 50. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en machos CCI para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en machos.

Comparativa entre ojos en hembras

La **Figura 51** muestra la respuesta pupilar de cada ojo en el grupo de hembras CCI, durante cada intervalo de estimulación.

La **Figura 52** ilustra la distribución de los índices de cuantificación de la dinámica temporal para cada ojo. La **Tabla 16** incluye los valores promedio de estos índices para cada ojo.

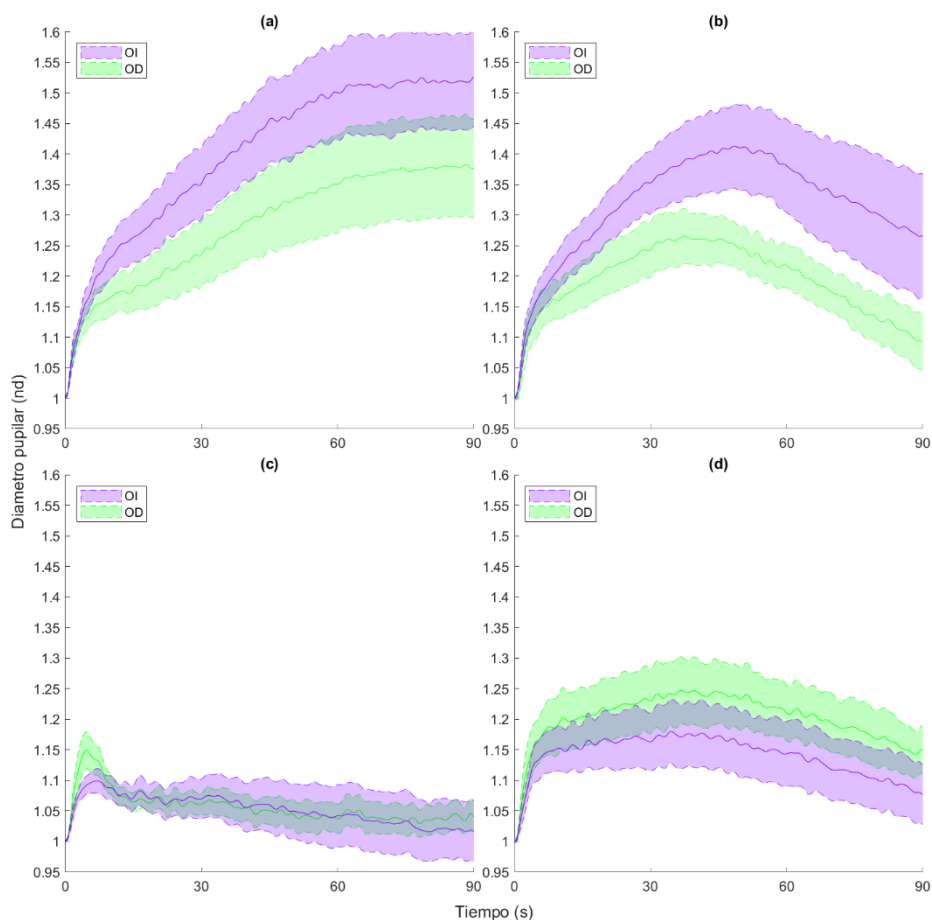


Figura 51. Respuesta pupilar del grupo de hembras CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

La **Figura 53a** describe la significancia estadística para las comparaciones entre ojos, y la **Figura 53b** detalla el mapa de calor de los coeficientes de correlación de Pearson.

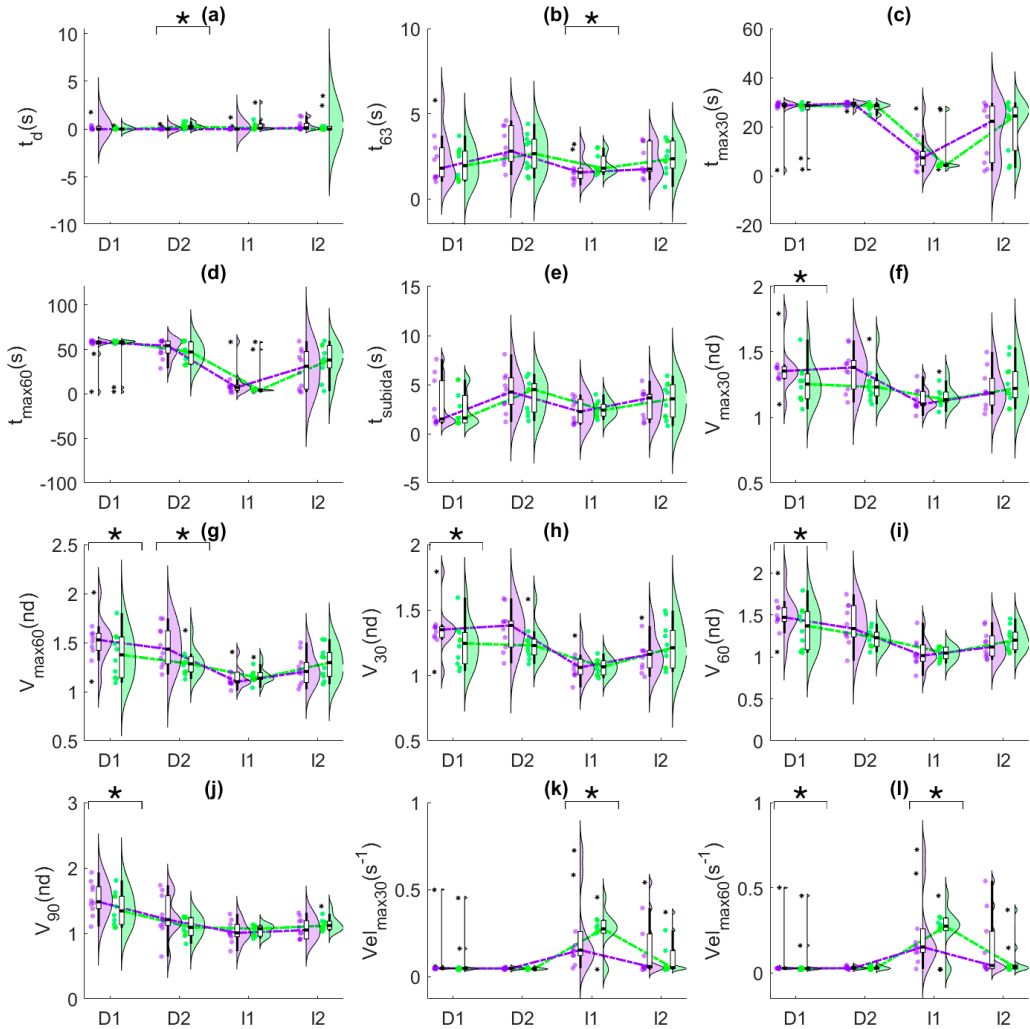


Figura 52. Distribución de los índices de la respuesta pupilar del grupo de hembras CCI tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta al primer estímulo en la pata derecha (D₁); (b) respuesta al segundo estímulo en la pata derecha (D₂); (c) respuesta al primer estímulo en la pata izquierda (I₁); (d) respuesta al segundo estímulo en la pata izquierda (I₂). OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Tabla 16. Promedios para cada ojo, estimados en hembras CCI, para los índices descriptivos de la dinámica pupilar en respuesta a los estímulos nociceptivos. Todos los valores se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (EEM). OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD
t _d (s)	0.06±0.06	0.01±0.01	0.00±0.00	0.31±0.10	0.04±0.02	0.21±0.14	0.30±0.28	0.09±0.06
t ₆₃ (s)	1.56±0.22	2.04±0.31	3.00±0.42	2.65±0.36	1.30±0.13	2.00±0.19	2.16±0.39	2.41±0.29
t _{max30} (s)	28.87±0.23	28.50±0.47	29.13±0.33	28.32±0.34	8.30±1.71	4.12±0.18	18.53±4.70	23.04±3.32
t _{max60} (s)	58.41±0.60	58.32±0.61	50.73±4.70	49.28±4.91	7.51±1.94	4.12±0.18	30.39±7.21	33.64±7.17
t _{subida} (s)	2.95±0.79	2.53±0.57	4.24±0.65	3.84±0.54	2.32±0.40	2.49±0.26	3.06±0.49	3.32±0.58
V _{max30} (nd)	1.35±0.02	1.25±0.06	1.37±0.06	1.22±0.03	1.13±0.03	1.14±0.03	1.18±0.04	1.22±0.05
V _{max60} (nd)	1.51±0.05	1.37±0.09	1.45±0.08	1.26±0.03	1.10±0.02	1.15±0.02	1.21±0.05	1.25±0.06
V ₃₀ (nd)	1.33±0.02	1.22±0.06	1.33±0.06	1.21±0.03	1.04±0.03	1.07±0.02	1.14±0.05	1.22±0.06
V ₆₀ (nd)	1.49±0.04	1.35±0.08	1.45±0.07	1.22±0.04	1.03±0.06	1.04±0.02	1.10±0.05	1.21±0.04
V ₉₀ (nd)	1.53±0.08	1.40±0.08	1.27±0.10	1.08±0.05	1.02±0.05	1.03±0.03	1.08±0.05	1.12±0.03
Vel _{tmax30} (s ⁻¹)	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00	0.11±0.02	0.29±0.02	0.15±0.06	0.07±0.02
Vel _{tmax60} (s ⁻¹)	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.11±0.02	0.29±0.02	0.14±0.06	0.03±0.01

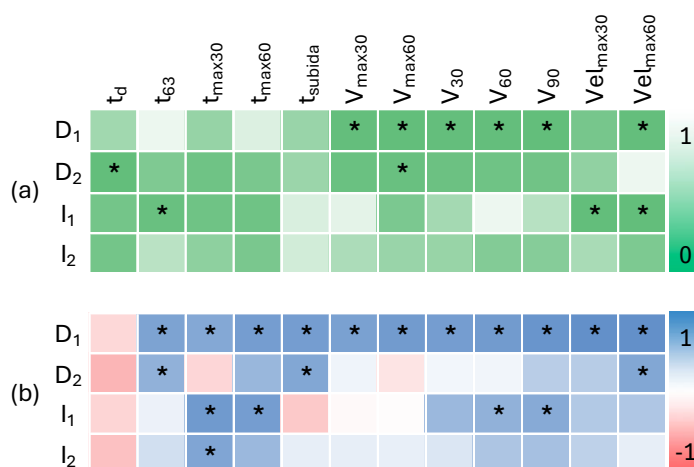


Figura 53. (a) Mapa de calor de la significancia estadística estimada (prueba t para muestras pareadas) en hembras CCI para los índices evaluados y para cada intervalo de estimulación. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson en la respuesta de ambos ojos en hembras.

Como se aprecia en la **Figura 53a**, existen mayores diferencias significativas entre ojos en los primeros estímulos a cada pata. En especial, la respuesta a la estimulación de la pata derecha presenta diferencias entre ojos en la intensidad ($V_{\max30}$, $V_{\max60}$, V_{30} , V_{60} , V_{90}), mayor en el ojo contralateral al estímulo (ojo izquierdo) y en la velocidad de la respuesta en el primer minuto ($V_{\max60}$).

En la segunda estimulación, las diferencias entre ojos se atenúan. Destacan solo las diferencias en el desfase temporal entre el inicio de la respuesta de ambos ojos (t_d), mayor en el ojo derecho, y en el valor máximo de amplitud pupilar alcanzado a los 60 segundos, mayor en el ojo izquierdo.

En el primer estímulo sobre la pata izquierda, solo la constante de tiempo (t_{63}) y las velocidades de respuesta a 30 y 60 segundos ($V_{\max30}$ y $V_{\max60}$) difieren significativamente entre ojos, siendo la dilatación transitoria en la pupila contralateral (derecha) más rápida. No hay diferencias significativas en la ventana I_2 de estimulación.

En cuanto a la correlación, ilustrada en la **Figura 53b**, es positiva y fuerte entre ambos ojos ante la estimulación D_1 en todos los parámetros de cuantificación, excepto en el retardo a la respuesta. De nuevo, en el segundo estímulo (D_2), las diferencias disminuyen, permaneciendo una respuesta diferente entre ojos en cuanto a la constante de tiempo (t_{63}), el tiempo de subida (t_{subida}) y la velocidad de respuesta a los 30 segundos ($V_{\max30}$).

También se aprecia una correlación positiva fuerte entre las respuestas ante las estimulaciones I_1 e I_2 para el índice de tiempo $t_{\max30}$. En la respuesta a la estimulación I_1 , la correlación entre ojos es también alta y probablemente no aleatoria para los índices $t_{\max60}$, V_{60} , V_{90} .

5.3.2.2. Comparativa entre estimulaciones y sexo

Comparativa entre estimulaciones en machos

La **Tabla 17** ilustra la comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos con dolor crónico.

La **Figura 54(a, c)** ilustra la significancia estadística para las comparaciones entre estimulaciones para cada ojo (prueba ANOVA - Bonferroni) en el caso del grupo de machos. La **Figura 54(b, d)** muestra la correlación de Pearson entre estimulaciones.

En el caso de la dinámica pupilar del ojo izquierdo se observa una diferencia significativa entre las estimulaciones D_2 e I_1 para la amplitud a los 30 segundos (V_{30}) siendo mayor para la estimulación D_2 .

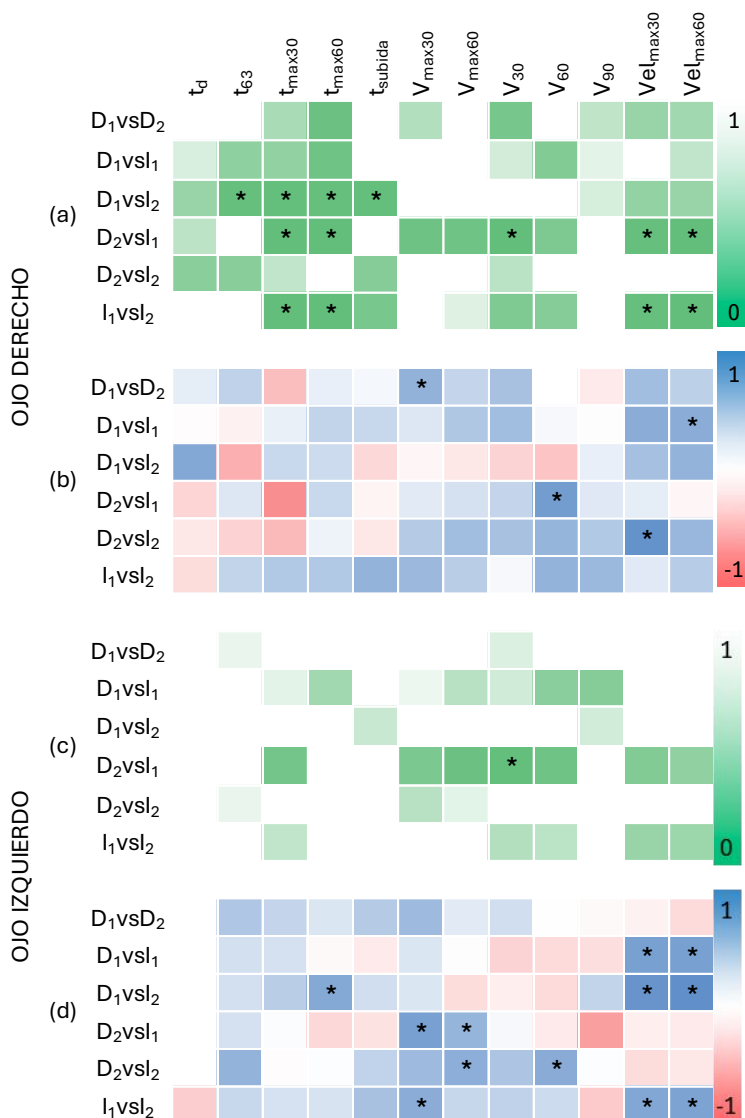


Figura 54. (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos CCI. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en machos.

Tabla 17. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en machos CCI. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

OJO DERECHO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.43±0.13	0.46±0.25	0.43±0.13	0.10±0.07	0.43±0.13	0.01±0.01	0.46±0.25	0.10±0.07	0.46±0.25	0.01±0.01	0.10±0.07	0.01±0.01
t ₆₃ (s)	1.37±0.08	1.62±0.10	1.37±0.08	2.03±0.31	1.37±0.08	2.31±0.31	1.62±0.10	2.03±0.31	1.62±0.10	2.31±0.31	2.03±0.31	2.31±0.31
t _{max30} (s)	13.48±4.59	21.45±3.84	13.48±4.59	4.62±0.79	13.48±4.59	28.80±0.54	21.45±3.84	4.62±0.79	21.45±3.84	28.80±0.54	4.62±0.79	28.80±0.54
t _{max60} (s)	25.22±9.71	46.55±3.62	25.22±9.71	4.62±0.79	25.22±9.71	49.12±2.83	46.55±3.62	4.62±0.79	46.55±3.62	49.12±2.83	4.62±0.79	49.12±2.83
t _{subida} (s)	1.45±0.20	2.14±0.37	1.45±0.20	2.00±0.28	1.45±0.20	3.43±0.67	2.14±0.37	2.00±0.28	2.14±0.37	3.43±0.67	2.00±0.28	3.43±0.67
V _{max30} (nd)	1.16±0.03	1.25±0.05	1.16±0.03	1.12±0.03	1.16±0.03	1.18±0.03	1.25±0.05	1.12±0.03	1.25±0.05	1.18±0.03	1.12±0.03	1.18±0.03
V _{max60} (nd)	1.23±0.04	1.31±0.06	1.23±0.04	1.15±0.03	1.23±0.04	1.24±0.04	1.31±0.06	1.15±0.03	1.31±0.06	1.24±0.04	1.15±0.03	1.24±0.04
V ₃₀ (nd)	1.14±0.03	1.25±0.05	1.14±0.03	1.06±0.02	1.14±0.03	1.17±0.03	1.25±0.05	1.06±0.02	1.25±0.05	1.17±0.03	1.06±0.02	1.17±0.03
V ₆₀ (nd)	1.17±0.04	1.17±0.02	1.17±0.04	1.08±0.02	1.17±0.04	1.17±0.03	1.17±0.02	1.08±0.02	1.17±0.02	1.17±0.03	1.08±0.02	1.17±0.03
V ₉₀ (nd)	1.16±0.04	1.09±0.03	1.16±0.04	1.10±0.02	1.16±0.04	1.09±0.02	1.09±0.03	1.10±0.02	1.09±0.03	1.09±0.02	1.10±0.02	1.09±0.02
Vel _{lmax30} (s ⁻¹)	0.17±0.06	0.05±0.00	0.17±0.06	0.24±0.06	0.17±0.06	0.04±0.00	0.05±0.00	0.24±0.06	0.05±0.00	0.04±0.00	0.24±0.06	0.04±0.00
Vel _{lmax60} (s ⁻¹)	0.13±0.05	0.03±0.00	0.13±0.05	0.22±0.05	0.13±0.05	0.03±0.00	0.03±0.00	0.22±0.05	0.03±0.00	0.03±0.00	0.22±0.05	0.03±0.00
OJO IZQUIERDO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.12±0.12	0.00±0.00	0.10±0.10	0.00±0.00	0.12±0.12	0.00±0.00	0.10±0.10	0.12±0.12	0.10±0.10
t ₆₃ (s)	1.73±0.19	2.32±0.35	1.73±0.19	2.08±0.34	1.73±0.19	1.73±0.19	2.32±0.35	2.08±0.34	2.32±0.35	1.73±0.19	2.08±0.34	1.73±0.19
t _{max30} (s)	16.88±4.08	21.69±3.48	16.88±4.08	9.27±2.46	16.88±4.08	17.73±3.97	21.69±3.48	9.27±2.46	21.69±3.48	17.73±3.97	9.27±2.46	17.73±3.97
t _{max60} (s)	39.35±8.16	32.55±6.74	39.35±8.16	19.24±7.29	39.35±8.16	31.77±7.91	32.55±6.74	19.24±7.29	32.55±6.74	31.77±7.91	19.24±7.29	31.77±7.91
t _{subida} (s)	1.91±0.29	2.73±0.55	1.91±0.29	2.13±0.44	1.91±0.29	3.00±0.55	2.73±0.55	2.13±0.44	2.73±0.55	3.00±0.55	2.13±0.44	3.00±0.55
V _{max30} (nd)	1.23±0.06	1.28±0.05	1.23±0.06	1.14±0.03	1.23±0.06	1.17±0.03	1.28±0.05	1.14±0.03	1.28±0.05	1.17±0.03	1.14±0.03	1.17±0.03
V _{max60} (nd)	1.27±0.06	1.35±0.06	1.27±0.06	1.14±0.02	1.27±0.06	1.23±0.05	1.35±0.06	1.14±0.02	1.35±0.06	1.23±0.05	1.14±0.02	1.23±0.05
V ₃₀ (nd)	1.17±0.05	1.27±0.06	1.17±0.05	1.06±0.02	1.17±0.05	1.18±0.05	1.27±0.06	1.06±0.02	1.27±0.06	1.18±0.05	1.06±0.02	1.18±0.05
V ₆₀ (nd)	1.22±0.06	1.25±0.07	1.22±0.06	1.05±0.02	1.22±0.06	1.19±0.05	1.25±0.07	1.05±0.02	1.25±0.07	1.19±0.05	1.05±0.02	1.19±0.05
V ₉₀ (nd)	1.25±0.09	1.16±0.09	1.25±0.09	1.05±0.03	1.25±0.09	1.10±0.01	1.16±0.09	1.05±0.03	1.16±0.09	1.10±0.01	1.05±0.03	1.10±0.01
Vel _{lmax30} (s ⁻¹)	0.15±0.05	0.08±0.02	0.15±0.05	0.20±0.05	0.15±0.05	0.09±0.03	0.08±0.02	0.20±0.05	0.08±0.02	0.09±0.03	0.20±0.05	0.09±0.03
Vel _{lmax60} (s ⁻¹)	0.11±0.06	0.07±0.02	0.11±0.06	0.19±0.05	0.11±0.06	0.07±0.03	0.07±0.02	0.19±0.05	0.07±0.02	0.07±0.03	0.19±0.05	0.07±0.03

Atendiendo a la dinámica pupilar del ojo derecho, existen diferencias significativas entre los tiempos en alcanzar los máximos antes de los 30 y 60 segundos ($t_{\max 30}$, $t_{\max 60}$) para las comparaciones entre las respuestas a los estímulos D_1 frente a I_2 , D_2 frente a I_1 e I_1 frente a I_2 , siendo más la rápida la respuesta al estímulo I_1 . También se aprecian diferencias significativas en las velocidades en alcanzar dichos máximos entre D_2 frente a I_1 e I_1 frente a I_2 , siendo muy superior las velocidades a la estimulación I_1 .

Respecto a la correlación, presentan una correlación positiva fuerte las comparaciones entre las respuestas a los estímulos D_1 frente a I_2 , D_2 frente a I_1 e I_1 frente a I_2 , para $Vel_{\max 30}$ y $Vel_{\max 60}$, siendo la más veloz I_1 , seguida de D_1 , y por último I_2 .

Comparación entre estimulaciones en hembras

La **Tabla 18** ilustra la comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras con dolor crónico.

La **Figura 55(a, c)** ilustra la significancia estadística para las comparaciones entre estimulaciones para cada ojo (prueba ANOVA - Bonferroni) en el caso del grupo de hembras. La **Figura 55(b, d)** muestra la correlación de Pearson entre estimulaciones.

En la **Figura 55(b, d)** se observa una baja correlación entre las estimulaciones de ambos ojos lo que sugiere una respuesta lateralizada.

En cambio, se aprecian múltiples diferencias significativas entre las respuestas de ambos ojos para las diferentes estimulaciones **Figura 55(a, c)**. Para el ojo derecho se observan diferencias en los índices de los máximos antes de los 30 y 60 segundos para las comparaciones entre las respuestas a los estímulos D_1 frente a I_1 , D_2 frente a I_2 e I_1 frente a I_2 , siendo más rápida y veloz la estimulación I_1 (**Tabla 18**). Este comportamiento también se observa para la respuesta del ojo izquierdo.

Respecto a la dinámica de las respuestas del ojo izquierdo ante las estimulaciones, se observan diferencias significativas en la amplitud ante las estimulaciones del lado izquierdo y derecho. Esto se refleja en $V_{\max 30}$, $V_{\max 60}$, V_{30} y V_{60} , siendo significativamente mayores las amplitudes antes las estimulaciones D_1 y D_2 .

Tabla 18. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre ventanas de estimulación para cada ojo en hembras CCI. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

OJO DERECHO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.01±0.01	0.31±0.10	0.01±0.01	0.21±0.14	0.01±0.01	0.09±0.06	0.31±0.10	0.21±0.14	0.31±0.10	0.09±0.06	0.21±0.14	0.09±0.06
t ₆₃ (s)	2.04±0.31	2.65±0.36	2.04±0.31	2.00±0.19	2.04±0.31	2.41±0.29	2.65±0.36	2.00±0.19	2.65±0.36	2.41±0.29	2.00±0.19	2.41±0.29
t _{max30} (s)	28.50±0.47	28.32±0.34	28.50±0.47	4.12±0.18	28.50±0.47	23.04±3.32	28.32±0.34	4.12±0.18	28.32±0.34	23.04±3.32	4.12±0.18	23.04±3.32
t _{max60} (s)	58.32±0.61	49.28±4.91	58.32±0.61	4.12±0.18	58.32±0.61	33.64±7.17	49.28±4.91	4.12±0.18	49.28±4.91	33.64±7.17	4.12±0.18	33.64±7.17
t _{subida} (s)	2.53±0.57	3.84±0.54	2.53±0.57	2.49±0.26	2.53±0.57	3.32±0.58	3.84±0.54	2.49±0.26	3.84±0.54	3.32±0.58	2.49±0.26	3.32±0.58
V _{max30} (nd)	1.25±0.06	1.22±0.03	1.25±0.06	1.14±0.03	1.25±0.06	1.22±0.05	1.22±0.03	1.14±0.03	1.22±0.03	1.22±0.05	1.14±0.03	1.22±0.05
V _{max60} (nd)	1.37±0.09	1.26±0.03	1.37±0.09	1.15±0.02	1.37±0.09	1.25±0.06	1.26±0.03	1.15±0.02	1.26±0.03	1.25±0.06	1.15±0.02	1.25±0.06
V ₃₀ (nd)	1.22±0.06	1.21±0.03	1.22±0.06	1.07±0.02	1.22±0.06	1.22±0.06	1.21±0.03	1.07±0.02	1.21±0.03	1.22±0.06	1.07±0.02	1.22±0.06
V ₆₀ (nd)	1.35±0.08	1.22±0.04	1.35±0.08	1.04±0.02	1.35±0.08	1.21±0.04	1.22±0.04	1.04±0.02	1.22±0.04	1.21±0.04	1.04±0.02	1.21±0.04
V ₉₀ (nd)	1.40±0.08	1.08±0.05	1.40±0.08	1.03±0.03	1.40±0.08	1.12±0.03	1.08±0.05	1.03±0.03	1.08±0.05	1.12±0.03	1.03±0.03	1.12±0.03
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.05±0.00	0.04±0.00	0.05±0.00	0.29±0.02	0.05±0.00	0.07±0.02	0.04±0.00	0.29±0.02	0.04±0.00	0.07±0.02	0.29±0.02	0.07±0.02
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.29±0.02	0.03±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.29±0.02	0.03±0.00	0.03±0.01	0.29±0.02	0.03±0.01
OJO IZQUIERDO												
Índice	D ₁ vsD ₂		D ₁ vsI ₁		D ₁ vsI ₂		D ₂ vsI ₁		D ₂ vsI ₂		I ₁ vsI ₂	
	D ₁	D ₂	D ₁	I ₁	D ₁	I ₂	D ₂	I ₁	D ₂	I ₂	I ₁	I ₂
t _d (s)	0.06±0.06	0.00±0.00	0.06±0.06	0.04±0.02	0.06±0.06	0.30±0.28	0.00±0.00	0.04±0.02	0.00±0.00	0.30±0.28	0.04±0.02	0.30±0.28
t ₆₃ (s)	1.56±0.22	3.00±0.42	1.56±0.22	1.30±0.13	1.56±0.22	2.16±0.39	3.00±0.42	1.30±0.13	3.00±0.42	2.16±0.39	1.30±0.13	2.16±0.39
t _{max30} (s)	28.87±0.23	29.13±0.33	28.87±0.23	8.30±1.71	28.87±0.23	18.53±4.70	29.13±0.33	8.30±1.71	29.13±0.33	18.53±4.70	8.30±1.71	18.53±4.70
t _{max60} (s)	58.41±0.60	50.73±4.70	58.41±0.60	7.51±1.94	58.41±0.60	30.39±7.21	50.73±4.70	7.51±1.94	50.73±4.70	30.39±7.21	7.51±1.94	30.39±7.21
t _{subida} (s)	2.95±0.79	4.24±0.65	2.95±0.79	2.32±0.40	2.95±0.79	3.06±0.49	4.24±0.65	2.32±0.40	4.24±0.65	3.06±0.49	2.32±0.40	3.06±0.49
V _{max30} (nd)	1.35±0.02	1.37±0.06	1.35±0.02	1.13±0.03	1.35±0.02	1.18±0.04	1.37±0.06	1.13±0.03	1.37±0.06	1.18±0.04	1.13±0.03	1.18±0.04
V _{max60} (nd)	1.51±0.05	1.45±0.08	1.51±0.05	1.10±0.02	1.51±0.05	1.21±0.05	1.45±0.08	1.10±0.02	1.45±0.08	1.21±0.05	1.10±0.02	1.21±0.05
V ₃₀ (nd)	1.33±0.02	1.33±0.06	1.33±0.02	1.04±0.03	1.33±0.02	1.14±0.05	1.33±0.06	1.04±0.03	1.33±0.06	1.14±0.05	1.04±0.03	1.14±0.05
V ₆₀ (nd)	1.49±0.04	1.45±0.07	1.49±0.04	1.03±0.06	1.49±0.04	1.10±0.05	1.45±0.07	1.03±0.06	1.45±0.07	1.10±0.05	1.03±0.06	1.10±0.05
V ₉₀ (nd)	1.53±0.08	1.27±0.10	1.53±0.08	1.02±0.05	1.53±0.08	1.08±0.05	1.27±0.10	1.02±0.05	1.27±0.10	1.08±0.05	1.02±0.05	1.08±0.05
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.11±0.02	0.05±0.00	0.15±0.06	0.05±0.00	0.11±0.02	0.05±0.00	0.15±0.06	0.11±0.02	0.15±0.06
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.11±0.02	0.03±0.00	0.14±0.06	0.03±0.00	0.11±0.02	0.03±0.00	0.14±0.06	0.11±0.02	0.14±0.06

Caracterización de la respuesta pupilar ante estímulos nociceptivos y evaluación en dolor crónico a largo plazo

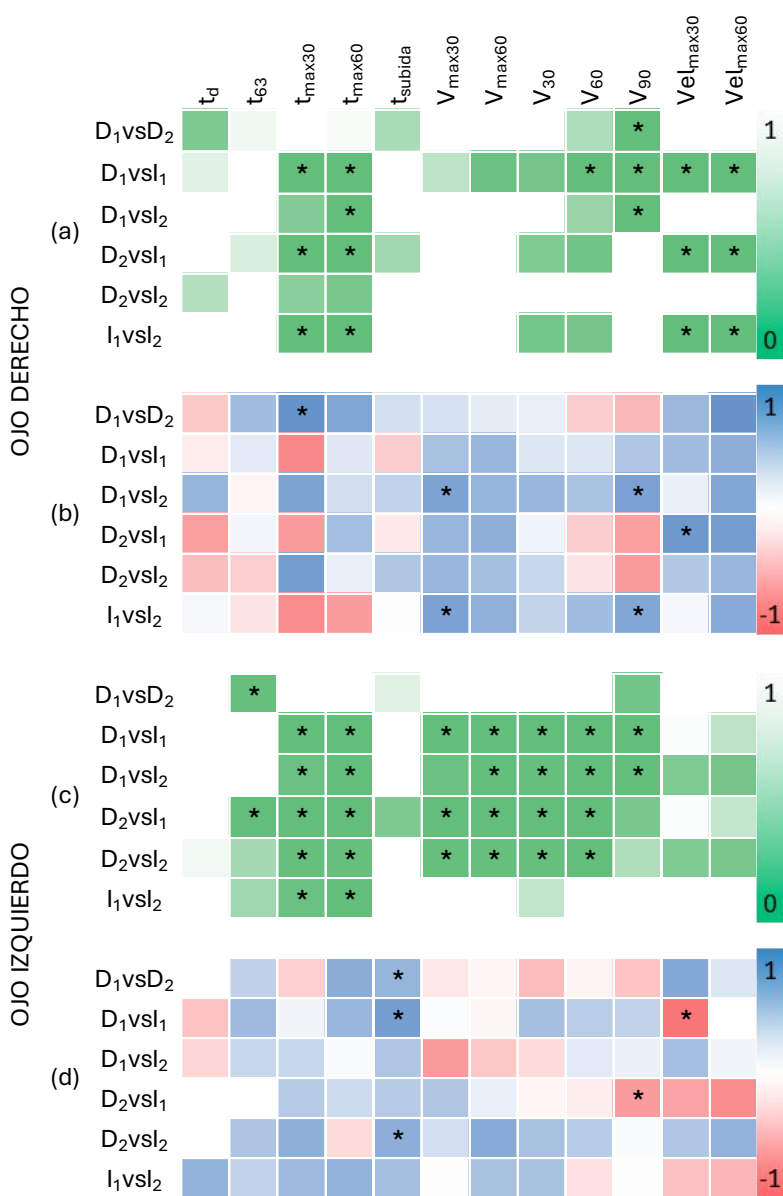


Figura 55. (a) Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras CCI. (b) Mapa de calor de la correlación de Pearson entre las ventanas de estimulación en hembras.

5.3.3. Comparativa entre animales naïve y con dolor crónico

5.3.3.1. Comparativa entre machos naïve y con dolor crónico

La **Figura 56** ilustra la respuesta pupilar de grupo de machos naïve y del grupo con dolor crónico tras cada uno de los cuatro estímulos.

La **Tabla 19** detalla la comparativa de los índices de respuesta pupilar entre los grupos, separando por ojos, mientras que la **Figura 57** muestra el mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para cada ventana de estimulación en machos (separando por ojo).

Tabla 19. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre los grupos naïve y CCI por ojo en machos. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

OJO DERECHO								
Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂	
	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI
t _d (s)	0.10±0.07	0.43±0.13	0.29±0.10	0.46±0.25	0.05±0.03	0.10±0.07	0.11±0.06	0.01±0.01
t ₆₃ (s)	2.77±0.29	1.37±0.08	2.44±0.22	1.62±0.10	2.18±0.36	2.03±0.31	2.82±0.34	2.31±0.31
t _{max30} (s)	10.69±3.19	13.48±4.59	19.79±3.72	21.45±3.84	13.67±3.49	4.62±0.79	18.95±3.62	28.80±0.54
t _{max60} (s)	16.64±6.41	25.22±9.71	32.79±6.55	46.55±3.62	29.38±7.44	4.62±0.79	35.63±7.11	49.12±2.83
t _{subida} (s)	3.04±0.51	1.45±0.20	3.69±0.56	2.14±0.37	2.65±0.48	2.00±0.28	3.71±0.47	3.43±0.67
V _{max30} (nd)	1.34±0.05	1.16±0.03	1.40±0.06	1.25±0.05	1.18±0.03	1.12±0.03	1.26±0.05	1.18±0.03
V _{max60} (nd)	1.38±0.05	1.23±0.04	1.40±0.09	1.31±0.06	1.20±0.03	1.15±0.03	1.23±0.02	1.24±0.04
V ₃₀ (nd)	1.16±0.03	1.14±0.03	1.31±0.07	1.25±0.05	1.10±0.03	1.06±0.02	1.14±0.02	1.17±0.03
V ₆₀ (nd)	1.22±0.04	1.17±0.04	1.24±0.03	1.17±0.02	1.14±0.04	1.08±0.02	1.14±0.04	1.17±0.03
V ₉₀ (nd)	1.21±0.04	1.16±0.04	1.13±0.03	1.09±0.03	1.16±0.05	1.10±0.02	1.15±0.03	1.09±0.02
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.22±0.05	0.17±0.06	0.14±0.06	0.05±0.00	0.17±0.04	0.24±0.06	0.10±0.03	0.04±0.00
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.20±0.06	0.13±0.05	0.05±0.01	0.03±0.00	0.09±0.03	0.22±0.05	0.06±0.02	0.03±0.00

OJO IZQUIERDO								
Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂	
	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI
t _d (s)	0.42±0.33	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.05	0.12±0.12	0.04±0.04	0.10±0.10
t ₆₃ (s)	2.36±0.28	1.73±0.19	2.45±0.21	2.32±0.35	1.89±0.27	2.08±0.34	2.11±0.25	1.73±0.19
t _{max30} (s)	4.97±1.15	16.88±4.08	18.23±4.95	21.69±3.48	3.94±0.86	9.27±2.46	15.66±4.54	17.73±3.97
t _{max60} (s)	16.11±7.45	39.35±8.16	32.64±8.71	32.55±6.74	3.64±0.80	19.24±7.29	27.02±8.16	31.77±7.91
t _{subida} (s)	2.79±0.30	1.91±0.29	2.98±0.29	2.73±0.55	2.73±0.47	2.13±0.44	3.11±0.45	3.00±0.55
V _{max30} (nd)	1.37±0.04	1.23±0.06	1.49±0.05	1.28±0.05	1.24±0.05	1.14±0.03	1.25±0.02	1.17±0.03
V _{max60} (nd)	1.41±0.05	1.27±0.06	1.52±0.08	1.35±0.06	1.27±0.08	1.14±0.02	1.26±0.01	1.23±0.05
V ₃₀ (nd)	1.20±0.07	1.17±0.05	1.38±0.08	1.27±0.06	1.01±0.01	1.06±0.02	1.22±0.01	1.18±0.05
V ₆₀ (nd)	1.22±0.07	1.22±0.06	1.38±0.06	1.25±0.07	1.03±0.02	1.05±0.02	1.20±0.03	1.19±0.05
V ₉₀ (nd)	1.17±0.06	1.25±0.09	1.30±0.06	1.16±0.09	1.07±0.05	1.05±0.03	1.13±0.04	1.10±0.01
Vel _{max30} (s ⁻¹)	0.27±0.06	0.15±0.05	0.14±0.05	0.08±0.02	0.37±0.08	0.20±0.05	0.12±0.03	0.09±0.03
Vel _{max60} (s ⁻¹)	0.24±0.06	0.11±0.06	0.13±0.05	0.07±0.02	0.37±0.08	0.19±0.05	0.11±0.03	0.07±0.03

Caracterización de la respuesta pupilar ante estímulos nociceptivos y evaluación en dolor crónico a largo plazo

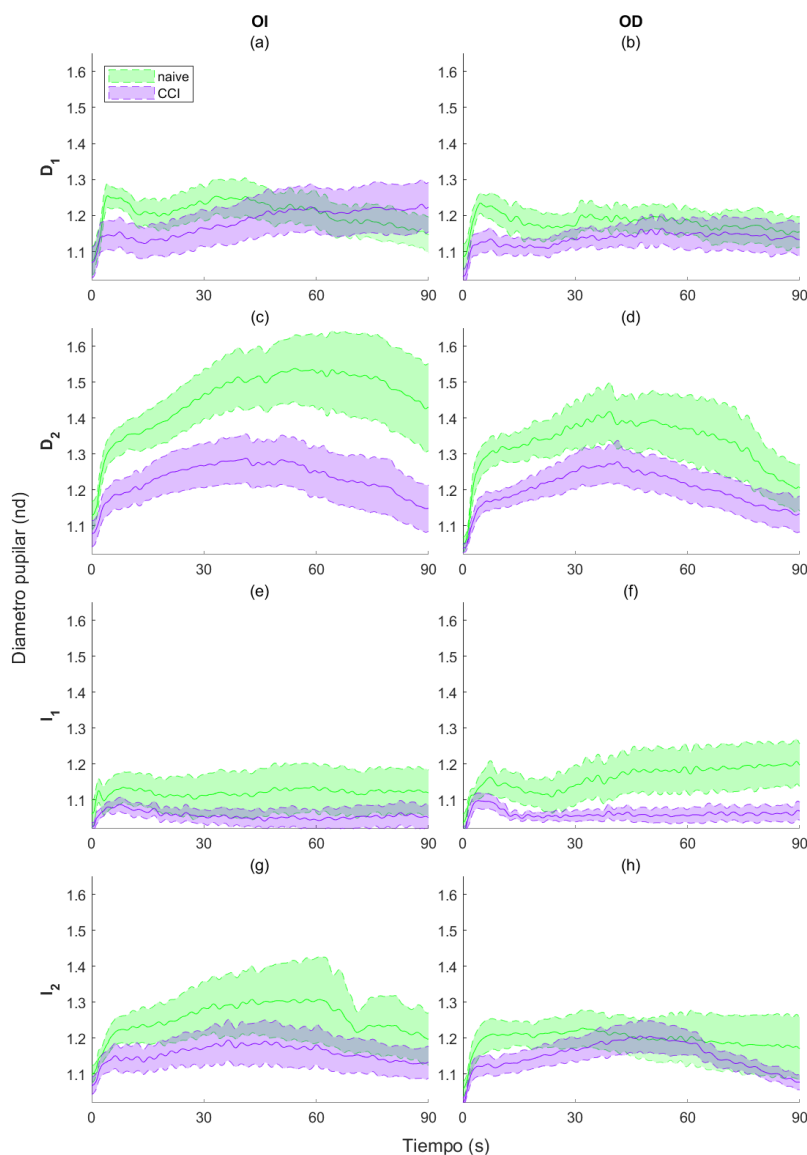


Figura 56. Respuesta pupilar de los grupos de machos tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (c) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (d) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (e) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (f) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (g) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2); (h) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2).

Según la **Figura 57a**, se aprecian diferencias en la constante de tiempo (t_{63}), el tiempo de subida (t_{subida}) y V_{max30} de las respuestas del ojo derecho ante los estímulos D_1 y D_2 , siendo más rápidas en el caso de los animales con dolor crónico y de mayor amplitud en los naïve.

También se observan diferencias significativas entre las respuestas ante los estímulos en el lado izquierdo para t_{max30} y t_{max60} . Ante la primera estimulación (I_1) los animales con dolor crónico alcanzan los máximos antes. Por el contrario, ante I_2 los alcanzan posteriormente.

Para la estimulación D_1 , la respuesta del ojo izquierdo es más rápida en los animales CCI, ya que presentan constantes de tiempo (t_{63}) y tiempos de subida significativamente inferiores, y, además, presentan una respuesta más sostenida en el tiempo (t_{max30}).

Las estimulaciones (D_2 , I_1 e I_2) presentan diferencias significativas en la amplitud de los máximos antes de los 30 segundos (V_{max30}), siendo la respuesta de los machos naïve mayor que la de aquellos con dolor crónico. Se aprecian diferencias significativas en V_{max60} para las estimulaciones D_2 e I_1 , siendo mayor la amplitud de la respuesta en los animales naïve.

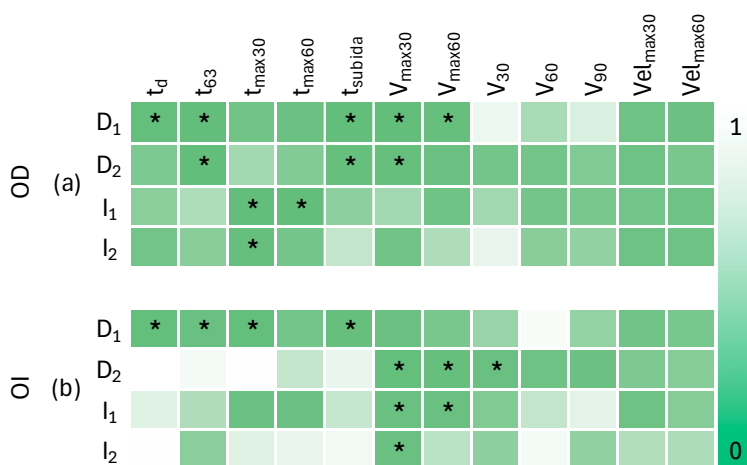


Figura 57. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en machos. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

5.3.3.2. Comparativa entre hembras naïve y con dolor crónico

La **Figura 58** detalla la respuesta pupilar de grupo de hembras naïve y del grupo con dolor crónico tras cada uno de los cuatro estímulos.

La **Tabla 20** incluye los detalles de los índices de dinámica pupilar entre los grupos, separando por ojos, y la **Figura 59(a, c)** representa los resultados de la prueba ANOVA-Bonferroni para cada ventana de estimulación y ojo en hembras.

Tabla 20. Comparación de los índices de respuesta pupilar entre los grupos naïve y CCI por ojo en hembras. Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). D_i: Estimulación pata derecha; I_i: estimulación pata izquierda.

OJO DERECHO									
Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂		CCI
	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI	
t _d (S)	0.04±0.04	0.01±0.01	0.29±0.12	0.31±0.10	0.21±0.11	0.21±0.14	0.07±0.04	0.09±0.06	
t ₆₃ (S)	2.95±0.26	2.04±0.31	2.59±0.27	2.65±0.36	2.65±0.20	2.00±0.19	3.08±0.47	2.41±0.29	
t _{max30} (S)	16.66±3.26	28.50±0.47	29.32±0.33	28.32±0.34	15.06±2.77	4.12±0.18	29.62±0.18	23.04±3.32	
t _{max60} (S)	24.77±5.12	58.32±0.61	54.23±2.00	49.28±4.91	24.27±6.13	4.12±0.18	49.75±4.19	33.64±7.17	
t _{subida} (S)	4.37±0.55	2.53±0.57	3.90±0.41	3.84±0.54	3.73±0.36	2.49±0.26	4.47±0.72	3.32±0.58	
V _{max30} (nd)	1.26±0.03	1.25±0.06	1.37±0.05	1.22±0.03	1.24±0.05	1.14±0.03	1.31±0.06	1.22±0.05	
V _{max60} (nd)	1.28±0.04	1.37±0.09	1.52±0.07	1.26±0.03	1.25±0.05	1.15±0.02	1.40±0.09	1.25±0.06	
V ₃₀ (nd)	1.20±0.03	1.22±0.06	1.35±0.05	1.21±0.03	1.12±0.03	1.07±0.02	1.27±0.06	1.22±0.06	
V ₆₀ (nd)	1.15±0.02	1.35±0.08	1.48±0.08	1.22±0.04	1.14±0.05	1.04±0.02	1.34±0.09	1.21±0.04	
V ₉₀ (nd)	1.12±0.02	1.40±0.08	1.31±0.06	1.08±0.05	1.11±0.04	1.03±0.03	1.20±0.04	1.12±0.03	
Vel _{max30} (S ⁻¹)	0.09±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00	0.12±0.02	0.29±0.02	0.05±0.00	0.07±0.02	
Vel _{max60} (S ⁻¹)	0.08±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.09±0.02	0.29±0.02	0.03±0.00	0.03±0.01	

OJO IZQUIERDO									
Índice	D ₁		D ₂		I ₁		I ₂		CCI
	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI	naïve	CCI	
t _d (S)	0.39±0.21	0.06±0.06	0.31±0.14	0.00±0.00	0.33±0.16	0.04±0.02	0.32±0.14	0.30±0.28	
t ₆₃ (S)	2.63±0.27	1.56±0.22	3.19±0.23	3.00±0.42	2.77±0.32	1.30±0.13	3.50±0.22	2.16±0.39	
t _{max30} (S)	14.44±3.14	28.87±0.23	28.73±0.48	29.13±0.33	13.45±2.65	8.30±1.71	27.83±0.68	18.53±4.70	
t _{max60} (S)	16.32±4.64	58.41±0.60	47.63±3.37	50.73±4.70	11.80±2.28	7.51±1.94	43.58±4.05	30.39±7.21	
t _{subida} (S)	3.80±0.53	2.95±0.79	5.24±0.41	4.24±0.65	3.76±0.54	2.32±0.40	5.59±0.35	3.06±0.49	
V _{max30} (nd)	1.32±0.05	1.35±0.02	1.45±0.04	1.37±0.06	1.23±0.02	1.13±0.03	1.32±0.04	1.18±0.04	
V _{max60} (nd)	1.33±0.05	1.51±0.05	1.57±0.05	1.45±0.08	1.23±0.03	1.10±0.02	1.36±0.04	1.21±0.05	
V ₃₀ (nd)	1.24±0.06	1.33±0.02	1.44±0.04	1.33±0.06	1.15±0.03	1.04±0.03	1.30±0.04	1.14±0.05	
V ₆₀ (nd)	1.16±0.04	1.49±0.04	1.46±0.06	1.45±0.07	1.09±0.01	1.03±0.06	1.24±0.03	1.10±0.05	
V ₉₀ (nd)	1.15±0.05	1.53±0.08	1.28±0.07	1.27±0.10	1.09±0.02	1.02±0.05	1.16±0.04	1.08±0.05	
Vel _{max30} (S ⁻¹)	0.12±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.13±0.02	0.11±0.02	0.05±0.00	0.15±0.06	
Vel _{max60} (S ⁻¹)	0.14±0.03	0	0.04±0.00	0.03±0.00	0.13±0.02	0.11±0.02	0.03±0.00	0.14±0.06	

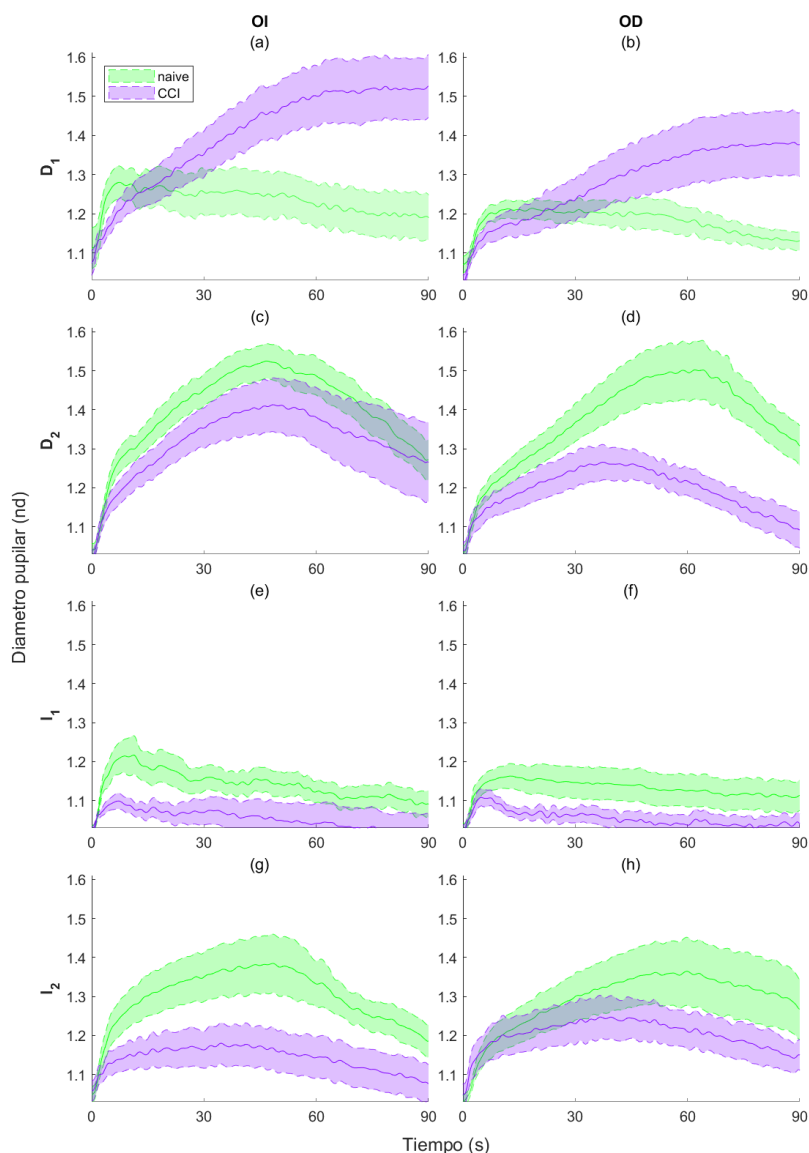


Figura 58. Respuesta pupilar de los grupos de hembras tras cada uno de los cuatro estímulos. (a) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (b) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata derecha (D_1); (c) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (d) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata derecha (D_2); (e) respuesta del ojo izquierdo al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (f) respuesta del ojo derecho al primer estímulo en la pata izquierda (I_1); (g) respuesta del ojo izquierdo al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2); (h) respuesta del ojo derecho al segundo estímulo en la pata izquierda (I_2).

La respuesta del ojo derecho de las hembras con dolor crónico es significativamente más rápida para las primeras estimulaciones en cada pata (D_1 e I_1), ya que presentan constantes de tiempo (t_{63}) y tiempos de subida menores (**Tabla 20**). También se aprecian diferencias entre ambos grupos en el comportamiento respecto a los índices de los máximos $t_{\max30}$, $t_{\max60}$, $Vel_{\max30}$ y $Vel_{\max60}$ para estas mismas estimulaciones. Mientras que para las respuestas a la estimulación D_1 los máximos los alcanzan antes y a mayor velocidad los animales naïve, para la estimulación I_1 , la respuesta de los animales con dolor crónico es más rápida y veloz.

Se aprecian diferencias significativas en la amplitud de la respuesta del ojo derecho ante el estímulo D_2 , siendo mayores las del grupo naïve ($V_{\max30}$, $V_{\max60}$, V_{30} , V_{60} , V_{90}).

Si se observa la comparativa de las respuestas del ojo izquierdo (**Figura 59b**), se aprecian múltiples diferencias significativas en todas las estimulaciones excepto en D_2 , que solo presenta diferencias en el retardo (t_d). Para la estimulación D_1 se observan diferencias significativas en t_{63} , t_{subida} , $t_{\max30}$, $t_{\max60}$, $Vel_{\max30}$ y $Vel_{\max60}$. Para este estímulo, la respuesta de las hembras con dolor crónico es más amplia y sostenida en el tiempo. Por el contrario, los estímulos sobre la pata izquierda (I_1 , I_2) son de menor amplitud y presentan una dinámica más rápida comparada con los animales naïve.

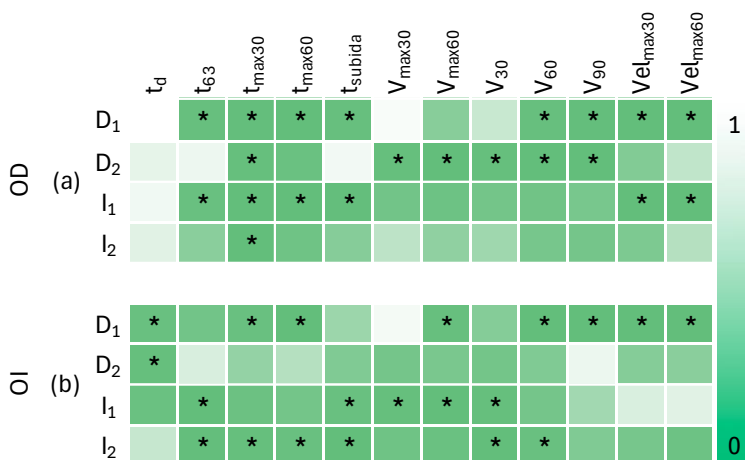


Figura 59. Mapa de calor de los valores p de la prueba ANOVA-Bonferroni para las comparaciones entre las ventanas de estimulación en hembras. OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

También se aprecian diferencias significativas en la comparación de las respuestas del ojo izquierdo ante el estímulo I_1 en los $V_{\max 30}$ y $V_{\max 60}$, y ante el estímulo D_1 en V_{60} , V_{90} , $Vel_{\max 30}$, $Vel_{\max 60}$.

Al finalizar dichos experimentos, se comprobó que los animales CCI presentaban dolor y que manifestaban sintomatología de tipo depresiva (**Anexo II**). Como era de esperar, los animales CCI presentaron dolor en la pata operada (derecha), mostrando un menor umbral nociceptivo que en la pata no operada (izquierda) en la prueba de von Frey (**Anexo II, Figura 76a**). Además, los animales mostraron un mayor tiempo de inmovilidad en la prueba TST que los animales naïve, lo que indica que muestran una conducta de tipo depresiva (**Anexo II, Figura 76b**), la cual suele desarrollarse en este modelo como consecuencia del dolor neuropático a largo plazo.

5.4. DISCUSIÓN

En este estudio se ha evaluado en profundidad la respuesta pupilar desencadenada por la estimulación nociceptiva repetida de las patas traseras en ratones macho y hembra. En general, la estimulación nociceptiva produce una respuesta de dilatación pupilar, como era de esperar en base a estudios en roedores y humanos previamente publicados [34], [79], [83], [192], [193], [194], la cual estaría mediada por la activación del LC y la subsecuente activación simpática e inhibición parasimpática ya descrita [37], [80], [82]. No obstante, en este capítulo se ha descrito la respuesta pupilar en base a todos los índices analizados con el objetivo de caracterizarla y evaluar posibles cambios en dolor crónico. Así, se han observado diferencias en la dinámica y amplitud de la respuesta pupilar en función al ojo monitorizado, el sexo del animal y en condiciones de dolor crónico a largo plazo.

5.4.1. Machos naïve

En los machos, no se observan diferencias en la respuesta pupilar entre ojos ante el primer estímulo en la pata trasera derecha (D_1), lo que indica que ambos ojos se comportan de manera similar ante una única compresión de la pata derecha. Además, se ha observado una fuerte correlación entre ojos para la amplitud a 90 segundos, lo que indica que ambos ojos presentan una alta sincronización en la respuesta tardía, la cual refleja un diámetro pupilar casi recuperado y estable en esta última fase.

Esta dinámica similar entre ambos ojos no concuerda con lo publicado por Liu et al., 2017, estudio en el que en una muy pequeña muestra de animales ($n=2$) observaron mayor respuesta de dilatación pupilar en el ojo ipsilateral al estímulo doloroso que podría ser atribuida a la activación del LC y la subsecuente proyección ipsilateral simpática y no a la parasimpática. No obstante, no encontraron una correlación significativa entre la respuesta pupilar y la actividad del LC por lo que sugieren que quizás haya otro mecanismo responsable de dicha lateralización. Asimismo, se ha descrito que las vías parasimpáticas del LC proyectan de manera inhibitoria tanto a las partes ipsilaterales como contralaterales del núcleo de Edinger-Westphal (EWN) para controlar los músculos esfínteres de la pupila, y no solo a las partes ipsilaterales como se pensaba anteriormente con el estudio de Liu et al., 2017 [197]. Además, el estímulo que utilizaban era de mayor intensidad al empleado en este estudio y quizás en este caso no sea suficiente para en una única estimulación observar la lateralización descrita, la cual sí que fue evidente tras la repetición de los estímulos, como se describe a continuación para las dos últimas estimulaciones (I_1 - I_2). Por tanto, estos resultados sugieren que la primera estimulación nociceptiva en la pata derecha activaría de forma bilateral los circuitos neurales involucrados en el control pupilar incluyendo el LC desencadenando una respuesta de dilatación pupilar similar en ambos ojos.

Por el contrario, en las estimulaciones de la pata izquierda (I_1 , I_2), los cambios observados en los índices analizados indican una respuesta más rápida del ojo izquierdo respecto al ojo derecho. Estos resultados indican una respuesta más rápida en el ojo ipsilateral al estímulo nociceptivo e iría en concordancia con los resultados de Liu et al., 2017. Por tanto, en animales macho naïve parece ser necesaria la estimulación nociceptiva repetida para que se haga evidente la lateralización del sistema nervioso simpático previamente descrita.

Los resultados en los índices $Vel_{\max 60}$ del ojo ipsilateral a la estimulación indican que los machos naïve existe un efecto de la repetición del estímulo con independencia de la pata estimulada (D_1 vs D_2 ; I_1 vs I_2), produciéndose una respuesta más rápida ante el primero de ellos. Este hallazgo podría explicarse por una mayor capacidad de respuesta del circuito neuronal activado, incluyendo el LC, ante el primer estímulo que se le aplica al animal o bien habiendo pasado un tiempo suficiente para la recuperación del sistema (entre la estimulación D_2 e I_1).

5.4.2. Hembras naïve

En hembras, las diferencias entre ojos en la respuesta pupilar desencadenada por los estímulos nociceptivos son mucho más sutiles que en machos. Ante la primera estimulación (D_1), la amplitud de la dilatación pupilar es mayor en el ojo izquierdo que en el derecho, lo que reflejaría una lateralización de la respuesta, como se había descrito previamente, sin ser necesaria la estimulación repetida como en el caso de los machos. Estos resultados nos sugieren que podría haber diferencias sexuales en algunos de los niveles del control simpático/parasimpático de la respuesta pupilar. Estas diferencias podrían ser las ya descritas para el propio LC, cuyas neuronas exhiben entre otras diferencias una mayor excitabilidad [169], o en sus proyecciones parasimpáticas inhibitorias hacia el núcleo EWN o en las simpáticas hacia el ganglio cervical superior. Para ello sería interesante estudiar la simetría de la respuesta, parámetro que se ha utilizado en estudios en humanos y nos podría aportar más información sobre la contribución lateralizada de dicho circuito de control pupilar [197], [198].

Los análisis entre estimulaciones en hembras indican que la respuesta pupilar de ambos ojos es más rápida ($t_{\max 30}$, $t_{\max 60}$) a la primera estimulación en la pata derecha o izquierda frente a las segundas estimulaciones, al igual que ocurre en machos. Esto indicaría que la respuesta pupilar de ambos ojos se comporta de manera similar ante la primera estimulación en cada pata y ante la estimulación repetida de la misma, con independencia de que se trate de la derecha o izquierda. Sin embargo, a diferencia de los machos, la respuesta al segundo de los estímulos en la pata derecha provoca una mayor dilatación pupilar tardía (V_{30} , V_{60}). Este resultado nos sugiere cierta sensibilización en la respuesta evocada tras las estimulaciones nociceptivas repetidas que facilitan una respuesta más sostenida en el tiempo dilatándose la pupila incluso en la fase tardía de la respuesta. La diferencia en esta respuesta podría explicarse por las diferencias descritas en el LC de hembras [68], [169], [199], en las cuales la mayor complejidad del LC le podría conferir cierta facilitación de la respuesta ante la repetición de los estímulos.

5.4.3. Machos con dolor crónico

Los machos con dolor crónico a largo plazo, en general, presentan una respuesta pupilar más lenta ($t_{\max 30}$) y de menor amplitud ($V_{\max 30}$, $V_{\max 60}$) que la de los animales naïve ante todas las estimulaciones. Dado que en dolor

crónico a largo plazo se sugiere un mayor grado de activación del LC [15], [18], este resultado podría deberse a una menor capacidad de activación o respuesta del LC, el cual ante un estímulo nociceptivo presentaría menor capacidad para desencadenar la respuesta de dilatación pupilar habitual. Sin embargo, este comportamiento no se presenta en la respuesta ante la primera estimulación en la pata no lesionada (I_1). Esta estimulación en el ojo derecho de los animales con dolor produce una respuesta más rápida y de menor amplitud que los animales naïve.

Al repetir la estimulación se observa una pérdida del efecto de la repetición, es decir, al repetir la estimulación en los animales naïve se observa un aumento de la amplitud (D_2 frente a D_1 e I_2 frente a I_1) pero en animales con dolor crónico a largo plazo, la repetición del estímulo no es capaz de producir una mayor respuesta pupilar, sino que es similar a la de los primeros estímulos en cada pata. Este resultado también pondría en evidencia una menor capacidad de respuesta de los circuitos implicados en la respuesta pupilar. Concretamente, sugiere un estado de agotamiento o desensibilización del LC siendo incapaz de desencadenar una mayor respuesta pupilar ante la repetición del estímulo como ocurría en animales naïve.

5.4.4. Hembras con dolor crónico

Al analizar la respuesta ante las estimulaciones en la pata lesionada de las hembras con dolor crónico se observa una respuesta pupilar exacerbada (V_{60} , V_{90} para ambos ojos y, además, V_{30} , $V_{\max30}$, $V_{\max60}$ para el ojo izquierdo o contralateral) y por tanto una mayor dilatación pupilar que en animales naïve. Cabe destacar, por tanto, que a diferencia de los machos que presentaban en líneas generales menor respuesta pupilar que los naïve, en hembras se observa un aumento considerable de dicha respuesta al estimular la pata con lesión nerviosa. Este comportamiento resalta las diferencias sexuales en las vías del procesamiento de la información dolorosa debidas al sexo, concretamente este resultado sugiere una sensibilización de la vía ascendente del dolor, la cual es capaz de activar al LC y producir una mayor respuesta pupilar. Las diferencias sexuales descritas en el LC de animales hembra, como una arborización dendrítica mayor o un nivel de excitabilidad mayor también podrían contribuir a que en dolor crónico a largo plazo, el LC de hembras exhiba una mayor capacidad de respuesta ante un estímulo nociceptivo en la pata con dolor, llevando a una respuesta pupilar aumentada. Sería interesante profundizar en el

estudio de esta respuesta pupilar ya que podría ser un biomarcador de la comorbilidad dolor crónico-sintomatología ansiodepresiva en hembras.

Sin embargo, al estimular la pata no lesionada (I_1), la respuesta pupilar el comportamiento es similar al de los machos con dolor crónico, la respuesta ante la primera estimulación es más rápida, pero de menor intensidad que las hembras naïve.

Con relación a la repetición del estímulo, los resultados indican que en hembras la repetición del estímulo no es capaz de tener un efecto acumulativo en estos animales como ocurre en los naïve, teniendo una respuesta pupilar similar o incluso menor a estos. En este sentido, quizás la activación del LC ante la primera estimulación ya alcance un efecto techo y no sea capaz de aumentar en las subsecuentes estimulaciones.

Es importante destacar como una de las limitaciones de este estudio, que al no medir directamente la actividad del LC, no puede establecer una relación causal entre la respuesta pupilar observada y la actividad de este núcleo. Sin embargo, al analizar cuidadosamente la dinámica de la respuesta pupilar a la estimulación nociceptiva y al investigar las diferencias sexuales en esta respuesta, este estudio puede sentar las bases para futuras investigaciones que, mediante técnicas optogenéticas, puedan manipular directamente la actividad del LC y determinar su influencia en la respuesta pupilar al dolor.

En este estudio se ha realizado un análisis de la respuesta pupilar desde un punto de vista de la ingeniería de control, adaptando los índices que comúnmente se emplean para describir y analizar el comportamiento transitorio de sistemas dinámicos [162] a la respuesta pupilar, al igual que se ha realizado en otros estudios para otras respuestas fisiológicas [163], [164]. Estos índices han permitido caracterizar la respuesta de dilatación pupilar ante estimulaciones nociceptivas, pero también han permitido evaluar aspectos de la dinámica de esta respuesta, como la cinética, que no se han evaluado anteriormente para la respuesta pupilar en investigación preclínica con modelos animales. El carácter novedoso del estudio de estos índices para la respuesta pupilar hace que todavía sean necesarios más estudios para comprender su relación con las alteraciones descritas en el sistema noradrenérgico-LC en dolor crónico pero asientan las bases necesarias para hacer extensivo el estudio de la respuesta de dilatación pupilar no solo en la comorbilidad dolor crónico-trastornos afectivos, sino en otras patologías en las que la funcionalidad del sistema

noradrenérgico-LC se encuentre alterada. En este sentido, el estudio de la respuesta pupilar podría contribuir a la identificación de nuevos biomarcadores diagnósticos y de respuesta al tratamiento que gracias al potencial traslacional de esta técnica no invasiva podrían emplearse en clínica en un futuro.

CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL LC Y LA RESPUESTA PUPILAR ANTE ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS

6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL LC Y LA RESPUESTA PUPILAR ANTE ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS

6.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en secciones anteriores, el LC por su naturaleza noradrenérgica, juega un papel importante en funciones cerebrales, incluyendo la respuesta al estrés y la atención, y participa en funciones cerebrales normales y patológicas. Como se ha comprobado en los estudios realizados en el marco de esta tesis doctoral, la pupilometría proporciona una lectura indirecta de la actividad del LC, tanto en roedores, primates y humanos [82], [200].

Estudios recientes demuestran que la actividad del LC está acompañada de fluctuaciones en el diámetro de la pupila [143]. Dado que la actividad del LC está acompañada de fluctuaciones en el diámetro de la pupila, la pupilometría puede proporcionar una estimación no invasiva de la actividad del LC. Más específicamente, en los últimos años se ha descrito como los estímulos nociceptivos evocan una respuesta de dilatación de la pupila junto con la activación del LC [79].

Por lo tanto, y en el contexto de este estudio, la medición del diámetro de la pupila puede servir como un indicador indirecto de la actividad del LC en respuesta a estímulos dolorosos. La medición de los potenciales de campo local (LFP) en el LC junto con el diámetro de la pupila durante la estimulación nociceptiva puede proporcionar información valiosa sobre la relación entre la actividad del LC y la respuesta pupilar al dolor.

En este estudio, se registraron simultáneamente los LFP en el LC izquierdo y derecho, y el diámetro de la pupila durante la estimulación nociceptiva. La estimulación se aplicó mediante compresiones en las patas traseras derecha e izquierda por separado, con dos estimulaciones consecutivas en cada lado. Este diseño experimental permitió la comparación de la actividad del LC y la respuesta pupilar entre los lados y entre estimulaciones repetidas.

Los datos de LFP del LC y de diámetro de la pupila se analizaron para describir la relación entre estas dos variables en respuesta a los estímulos nociceptivos repetidos.

6.1.1. Potenciales de campo locales

Los potenciales de campo locales (LFP, del inglés *Local Field Potentials*) son oscilaciones eléctricas registradas en el cerebro, generadas por la actividad sincronizada de poblaciones neuronales locales [201]. Estas señales reflejan principalmente corrientes sinápticas en las dendritas de las neuronas, aunque también pueden incluir contribuciones de corrientes activas, como las generadas por potenciales de acción y flujos iónicos.

En su origen, los LFP surgen de la suma espacial y temporal de potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios que se producen en las neuronas circundantes a un electrodo de registro. Estas señales tienen una resolución espacial intermedia entre los potenciales de acción (actividad de una sola neurona) y las oscilaciones macroscópicas observadas en electroencefalogramas (EEG), y se originan de la actividad sincrónica de un grupo neural en concreto. Esta señal electrofisiológica se origina de la actividad sincrónica de un grupo neural en concreto y ha sido caracterizado en varias regiones cerebrales incluyendo la corteza prefrontal [202].

Las fases de los LFP oscilatorios están involucradas en el procesamiento cognitivo, perceptivo y motor [203]. El registro y análisis de LFP se ha utilizado ampliamente para caracterizar varios trastornos cerebrales, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (EP) [204], [205].

Los LFP representan principalmente actividad a baja frecuencia (≤ 300 Hz), lo que incluye oscilaciones locales relacionadas con funciones cerebrales específicas. En general, la clasificación de los LFP en bandas de frecuencia se ha adoptado de la literatura sobre EEG, y se fundamenta en la fuerte correlación de cada banda con un estado conductual distinto:

- Delta (1-4 Hz): Asociada a procesos de sueño profundo y consolidación de memoria.
- Theta (4-8 Hz): Importante en navegación espacial y aprendizaje.
- Alfa (8-12 Hz): Relacionada con procesos atencionales.
- Beta (12-30 Hz): Relacionada con la preparación y planificación motora, y con el procesamiento de información endógena en la memoria de trabajo.
- Gamma (30-90 Hz): Relacionada con la atención, memoria y procesamiento cognitivo.

Los LFP son modulados por la actividad de redes neuronales y también están influidos por entradas aferentes, estados conductuales y también por neuromoduladores, como la noradrenalina y la dopamina.

Para registrar LFP, se utilizan electrodos intracraneales que se colocan cerca de las estructuras de interés (**Figura 60**). En roedores, los registros en el LC requieren electrodos de alta precisión debido a su pequeño tamaño y ubicación profunda. Estos electrodos suelen ser de alambre, matrices multielectrodo, o de silicio.

La señal registrada con estos electrodos incluye tanto LFP como potenciales de acción. Los primeros se aíslan aplicando filtros pasa-bajas que eliminan las frecuencias altas (>300 Hz).

En los modelos animales con roedores, los LFP se han utilizado para investigar, entre otras cuestiones, las oscilaciones relacionadas con memoria y aprendizaje en el hipocampo, dinámicas corticales durante estados de atención y sueño, y la modulación por neurotransmisores como la noradrenalina, que regula la excitabilidad neuronal y sincronización de redes.

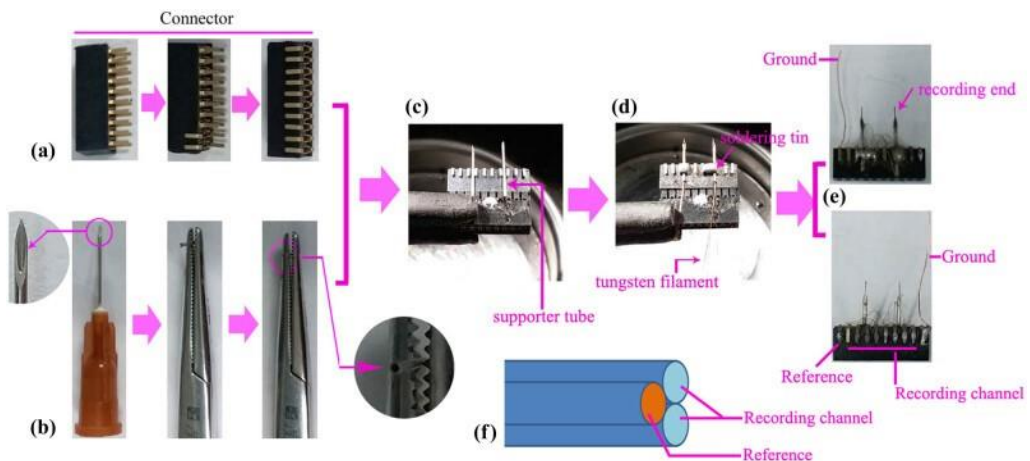


Figura 60. Electrodo de registro de bajo coste para registrar el potencial de campo local del cerebro de una rata en movimiento libre [203].

Los estudios de LFP en el LC han mostrado oscilaciones relacionadas con estados conductuales (vigilia, sueño), con respuestas a estímulos externos, como sonidos o luz y cambios en la actividad oscilatoria asociados a la liberación de noradrenalina [206], [207], [208].

El LC desempeña un papel fundamental en la modulación del dolor a través de la vía descendente de control nociceptivo. La noradrenalina liberada por el LC actúa en la médula espinal para inhibir o amplificar las señales de dolor, dependiendo del contexto.

Estudios que registran LFP en el LC han revelado patrones oscilatorios asociados a la percepción y modulación del dolor, incluyendo oscilaciones en la banda theta, relacionadas con la atención hacia los estímulos dolorosos; y cambios en el ritmo gamma, asociados con la liberación de noradrenalina durante estados de analgesia o hiperexcitabilidad.

Los LFP en el LC también muestran respuestas fásicas a estímulos nociceptivos, lo que indica su participación en la detección y procesamiento inicial del dolor. Estos datos son esenciales para comprender los mecanismos de regulación del dolor y desarrollar tratamientos basados en la modulación del LC.

Por tanto, los LFP son herramientas clave para entender la dinámica de redes neuronales locales. En estudios con roedores, y particularmente en el LC, los LFP permiten explorar cómo esta región modula la actividad cerebral a través de oscilaciones relacionadas con estados conductuales y neurotransmisión. Su registro y análisis matemático son fundamentales para avanzar en nuestra comprensión del cerebro y sus funciones.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Animales

Se emplearon ratones adultos macho de la cepa C57BL/6J, con un rango de peso comprendido entre 20 y 35 gramos. Como se describió en capítulos anteriores, los animales fueron alojados en jaulas transparentes de plexiglás y bajo condiciones controladas de laboratorio: temperatura constante de 22 °C, ciclo luz/oscuridad de 12 horas, y acceso a alimento y agua de manera ad libitum.

Todos los procedimientos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz, cumpliendo con las disposiciones establecidas por la Directiva 2010/63/EU de la Comisión Europea y el Real Decreto 53/2013 que regula el uso de animales en investigación científica en España.

6.2.2. Anestesia y condiciones de experimentación

Los animales fueron retirados del animalario al menos 30 minutos antes del inicio del experimento y trasladados a una sala con iluminación controlada a 15 lux, permitiéndoles habituarse a estas condiciones lumínicas y a una temperatura ambiental de 20-22 °C. Al comienzo del procedimiento experimental, los ratones fueron anestesiados en una cámara de inducción utilizando isoflurano al 4% en volumen. Posteriormente, se colocaron en un sistema de estereotaxia (David Kopf Instruments) acoplado a las cámaras de pupilometría (**Figura 61**), donde se mantuvo la anestesia con isoflurano al 2-2.5%, ajustado según el peso de cada animal, durante el resto del experimento.

6.2.3. Electrodo de registro de LFP

El electrodo de registro se elaboró a partir de una micropipeta de vidrio de un solo canal con filamento interno (World Precision Instruments) estirada mediante un estirador de pipetas o *puller* vertical (52 A de intensidad; PE-21, Narishige Group) y rellena con una solución conductora al 2 % de Pontamina Sky Blue disuelta en 0.5 % de acetato sódico (**Figura 62**).



Figura 61. Montaje de sistema de pupilometría integrado al sistema de estereotaxia para el posicionamiento del electrodo de registro de las señales LFP en las coordenadas de cada LC.

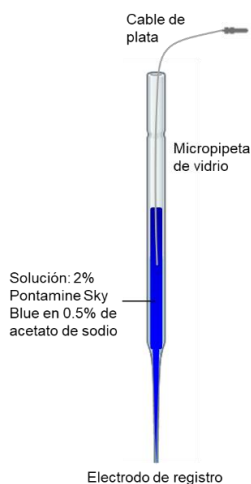


Figura 62. Representación gráfica del electrodo de registro de LFP consistente en una micropipeta de vidrio rellena de una solución conductora de color azul (2 % de Pontamina Sky Blue disuelta en 0.5 % de acetato sódico) en el cual se inserta un cable de plata conectado al sistema de registro electrofisiológico para la amplificación y filtrado de las señales electrofisiológicas y adquisición de LFP.

Antes del registro, se rompió el extremo ciego del electrodo bajo control visual mediante el objetivo 40x de un microscopio óptico (Leitz, Alemania) hasta obtener una punta de 1.0-2.0 μm de diámetro, óptima para el registro de señales electrofisiológicas.

6.2.4. Registro de LFP en el LC

El electrodo fue posicionado en cada LC en las coordenadas estereotáxicas desde bregma: -5.5 anterior-posterior (AP), ± 1.00 medial-lateral (ML), -3.6 mm dorsal-ventral (DV) [156]. Las señales electrofisiológicas se registraron a través del electrodo con una velocidad de muestreo de 25 KHz, se amplificaron con un amplificador de alta impedancia de entrada ($\times 20000$; AE-3, Cibertec SA) y se filtraron (0.3-100Hz; 64AC, Cibertec SA). La conversión analógico digital se realizó mediante la interfaz Micro1401 CED (Cambridge Electronic Design), y las señales digitales se almacenaron mediante el software Spike2 (v.5.19, Cambridge Electronic Design). Al finalizar el registro, se extrajeron los cerebros de cada animal para la verificación histológica de la correcta localización del electrodo en el LC derecho e izquierdo (**Anexo III**). Sólo se incluyó en este capítulo el análisis de los datos procedentes del animal para el que se confirmó la localización del electrodo de registro en el LC (**Anexo III, Figura 77**).

6.2.4.1. Pupilómetro

Para llevar a cabo la pupilometría bilateral durante el registro electrofisiológico del LC, se utilizó un sistema de estereotaxia acoplada a parte de los componentes del subsistema de pupilometría bilateral, tal y como se muestra en la **Figura 61**.

6.2.5. Sincronización entre señales

Como se ha indicado anteriormente, el registro de LFP se realizó mediante el software Spike2 que se ejecutaba en un ordenador diferente al empleado para el registro de la pupilometría binocular. Con el fin de sincronizar las señales de LFP y el registro de la pupila se optó por emular el mismo método que el utilizado por los usuarios del Spike2 en experimentos previos, la introducción de etiquetas mediante el teclado. Para ello se desarrolló un dispositivo de emulación de un teclado convencional, empleando herramientas de prototipado rápido, como la tarjeta Arduino Nano. Este dispositivo se conectó al ordenador empleado para el registro de LFP y al sistema de pupilometría mediante un conversor USB-puerto serie (CP2102, Silicon Labs, Estados Unidos). Al iniciar o finalizar la grabación se insertaba automáticamente una etiqueta que, posteriormente, se empleaba para recortar el segmento de datos de interés registrado durante el experimento, todo ello mediante una pieza de código desarrollada en MATLAB, para facilitar el procesado y análisis posterior. En la **Figura 63** se puede observar ambos sistemas ejecutándose de forma simultánea.

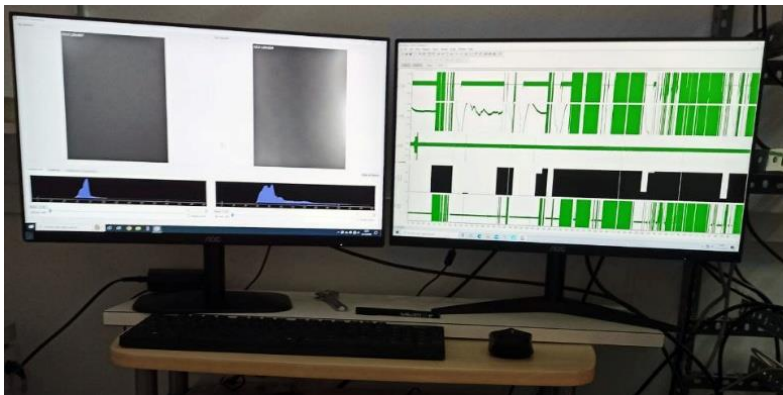


Figura 63. Interfaz de registro de pupilometría (izquierda) y pantalla mostrando el registro electrofisiológico a través del software Spike2 (Cambridge Electronic Design) en el equipo secundario (derecha).

6.2.6. Protocolo de registro simultáneo de los LFP y el diámetro pupilar ante estimulaciones nociceptivas

Se realizó el registro binocular de las pupilas de 4 machos naïve de forma simultánea al registro de la señal LFP en cada LC (izquierdo y derecho). Una vez posicionado el electrodo en el LC correspondiente siguiendo las coordenadas ya descritas, el registro de LFP y de las pupilas comenzó con una fase inicial de 400 segundos (periodo basal) en los que los animales permanecieron bajo anestesia sin recibir ningún estímulo. Posteriormente, se sometieron a cuatro estimulaciones mecánicas nociceptivas consistentes en aplicar una compresión en una de las patas traseras con unas pinzas con puntas blandas durante 1s. Se aplicaron dos estimulaciones de la pata derecha (D_1 y D_2) separadas entre ellas 100 segundos. Tras 200 segundos, se realizaron dos estimulaciones de la pata izquierda (I_1 e I_2), también separadas por 100 segundos.

6.2.7. Estimación del pupilograma

6.2.7.1. Procesado de las series temporales

Los pupilogramas estimados mediante el modelo de aprendizaje automático fueron sometidos a técnicas de filtrado y reducción de ruido, siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.2.4.

6.2.8. Procesado y análisis de los LFP

El análisis de los LFP incluye varias etapas. La etapa de preprocesamiento contempla el filtrado para eliminar artefactos (p. ej., ruido eléctrico, movimiento) y la corrección de artefactos por movimiento o respiración.

A continuación, se puede analizar la señal en el dominio temporal, para la extracción de características como amplitud, potencia media y latencia, que puede ir acompañado de la identificación de eventos específicos como "*sharp waves*" o "*spindle bursts*". Es habitual realizar un análisis en el dominio espectral, empleando la transformada de Fourier para obtener la distribución de potencia en distintas bandas de frecuencia, y/o un análisis de coherencia para evaluar la conectividad funcional entre regiones. Otras técnicas de análisis incluyen el uso de *wavelets*, o representaciones tiempo-frecuencia para evaluar dinámicas temporales, y un modelado estadístico o el uso de aprendizaje automático para clasificar patrones de actividad neuronal.

En este estudio, se disminuyó la tasa de muestreo de las señales LFP registradas por el dispositivo de amplificación a 1250 Hz, se filtraron mediante un filtro de paso alto de Butterworth de 4 orden con frecuencia de corte de 1 Hz. Se aplicó entonces un filtro de eliminación de la tendencia y otro de reducción de ruido mediante descomposición con el filtro *wavelet* Symlet 4, umbralización de los coeficientes, y reconstrucción de la señal limpia de ruido [209].

La señal LFP resultante se dividió en épocas de 1 segundo de duración. Se llevo entonces a cabo un análisis espectral utilizando el método *multitaper* [210]. El método *multitaper* tiene por objetivo reducir el sesgo y/o la varianza de las estimaciones espectrales mediante la premultiplicación de la señal con *tapers* ortogonales conocidos como funciones de *Slepian*. El método contempla la elección de un parámetro de ancho de banda medio W , para que funciones de ventana se concentren dentro de $[-W, W]$. El parámetro W debe ser superior a $1/T$, siendo T la duración temporal. Para este análisis se empleó la librería para MATLAB Chronux [211]. El espectro y el espectrograma se calcularon utilizando las funciones “*mtspectrumc*” y “*mtspecgramc*”, respectivamente. En este estudio, se seleccionó el producto de tiempo y ancho de banda (TW) igual a 3, siendo $K = 2 \times TW - 1 = 5$ el número de *tapers*.

Se empleo el segmento de la señal LFP comprendido entre $[-10, 10]$ s, donde 0 denota el inicio de cada estimulación, con objeto de calcular la densidad espectral de potencia y su espectrograma. Con ello, se estimó la densidad espectral de potencia durante el periodo basal anterior a la estimulación, y durante el periodo posterior, integrando la potencia en el rango de frecuencias característico de la banda delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (12-30 Hz) y gamma (30-90 Hz).

El análisis se limitó a la banda $[0-90]$ Hz], una ventana móvil de 0.5 segundo con un paso incremental de 50 ms (solape), y relleno con ceros (en inglés, *zero-padding*) para mejorar la resolución en frecuencia. La potencia en cada banda se promedió a lo largo de las épocas para obtener un valor acumulado. Se calculó la ratio de potencia, para estimar la potencia relacionada respecto del período basal en cada estimulación. Una ratio superior a 1 indica un aumento de la potencia en la banda de frecuencia afectada.

Para evaluar la relación temporal entre la potencia de la banda gamma del LFP y las variaciones en el pupilograma, se empleó la correlación cruzada entre estas dos señales discretas. La correlación cruzada permite identificar el grado de similitud entre las dos señales en función de diferentes desfases temporales (τ). Ambas señales fueron normalizadas y alineadas temporalmente, asegurando una resolución de muestreo común. Dado que las señales no fueron registradas a la misma frecuencia de muestreo, el pupilograma se sobremuestreó a 1250 Hz.

La correlación cruzada se calculó utilizando la ecuación:

$$R_{xy}(\tau) = \sum_n x(n) \cdot y(n + \tau)$$

donde $x(n)$ es la señal LFP, $y(n)$ es el pupilograma, y τ es el desfase temporal.

Se identificó el desfase temporal (τ_{\max}) que correspondía al valor máximo de la correlación cruzada, y este fue utilizado para determinar la sincronía temporal entre las señales. Valores de correlación cruzada cercanos a 1 indicaron una fuerte relación lineal entre las señales, mientras que valores más bajos sugirieron una relación débil.

6.2.9. Software

Para facilitar el análisis de los datos resultantes de una sesión experimental, se desarrolló una interfaz de MATLAB (**Figura 64**). La interfaz permitía seleccionar qué técnicas de preprocesado se deseaban aplicar a la señal LFP, el tamaño de las épocas para la segmentación, y los instantes iniciales y finales de la señal para definir el intervalo a analizar. La interfaz empleaba funciones de Chronux, para las que era necesario determinar el intervalo de frecuencias a estudiar, el tipo de *padding*, y los parámetros de definición de los *tapers*.

A su salida, la interfaz generaba diversas representaciones gráficas y datos sobre la densidad espectral de potencia en cada banda (definida en la propia interfaz), y otros estadísticos espectrales de primer y segundo orden.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se ha analizado la respuesta pupilar binocular y de actividad oscilatoria bilateral del LC (LFP) ante estimulaciones nociceptivas

en ambas patas traseras, con el objetivo de evaluar la relación entre la actividad del LC y la respuesta de dilatación pupilar ante estímulos nociceptivos.

Se describen a continuación los resultados obtenidos de los experimentos del registro simultáneo de la actividad electrofisiológica (LFP) en el LC izquierdo y derecho en animales sanos.

Las **Figura 65 a Figura 68** ilustran la respuesta a la estimulación en la pata trasera derecha (D1 y D2) y en la pata trasera izquierda (I1 e I2). Se muestra la señal LFP registrada en el LC derecho, tras su preprocesamiento, y se ilustra la respuesta pupilar ante cada estímulo para ambos ojos.

Las **Figura 69 a Figura 72** muestran idéntica información para el caso de la señal LFP registrada en el LC izquierdo. Todas las representaciones se circunscriben a los 10 segundos anteriores y posteriores al estímulo nociceptivo. En todas las figuras se representa espectrograma de la señal de LFP, y la correlación cruzada entre esta señal LFP y el pupilograma.

Como se aprecia en la **Figura 65**, la primera estimulación nociceptiva ipsilateral (D₁) desencadena un incremento de actividad en el LC derecho (**Figura 65d y e**) y una dilatación en la pupila de ambos ojos (**Figura 65b**).

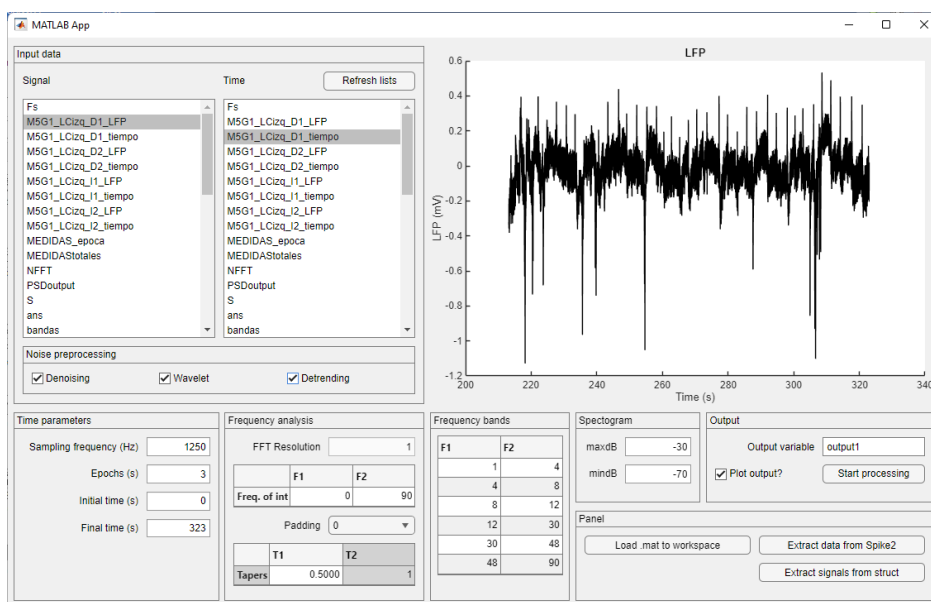


Figura 64. Interfaz en MATLAB desarrollada para el procesamiento de las señales de potenciales de campo locales registradas en las sesiones experimentales.

La correlación cruzada máxima es 0.6 (**Figura 65c**), se alcanza para un retardo nulo, e indica una relación moderada entre la potencia de la señal LFP y los cambios pupilares en tiempo real. Aunque la relación no tiene un desfase temporal significativo, la correlación es lo suficientemente alta como para sugerir una interacción entre las dos señales en el mismo momento.

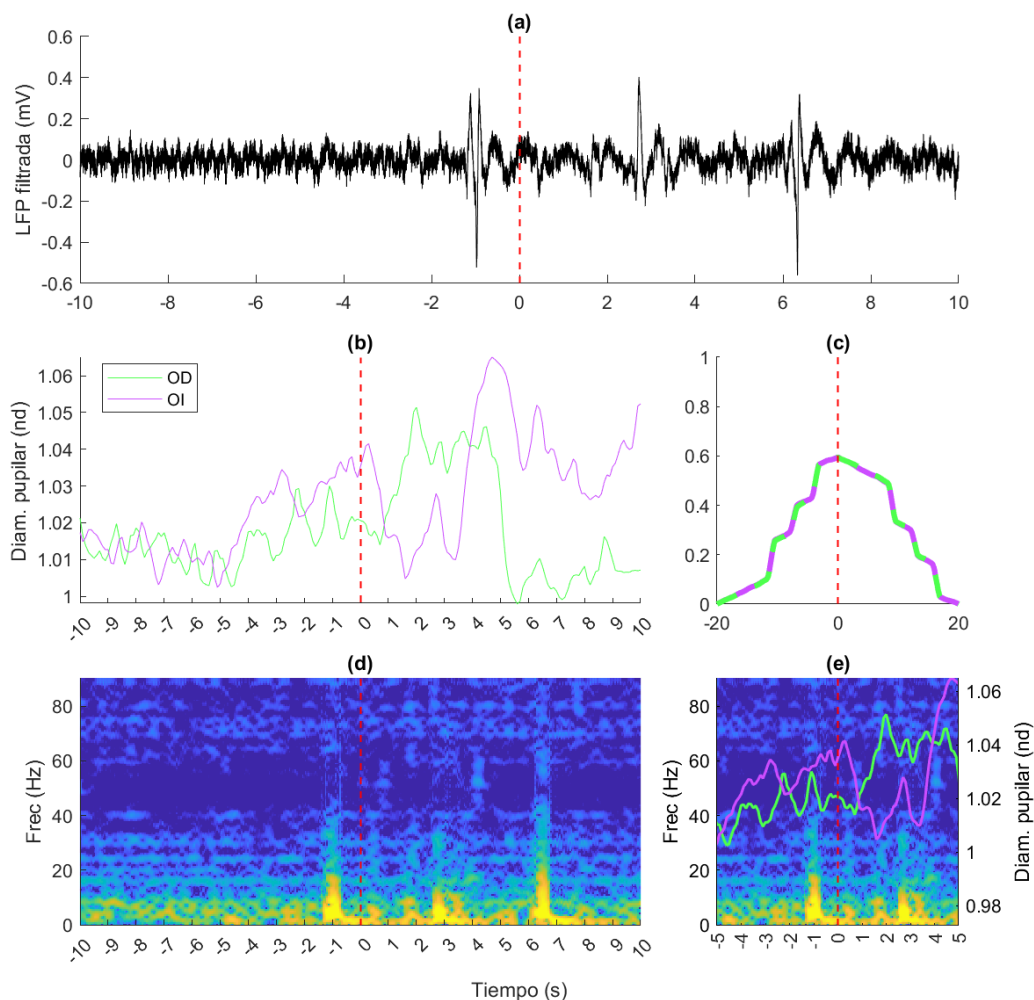


Figura 65. Representación temporal de las señales ante la estimulación D_1 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

Estos hallazgos están presentes en la respuesta a la segunda estimulación nociceptiva ipsilateral (D_2 , **Figura 66**), con una correlación cruzada superior (0.65), aunque con un aumento poco marcado de la potencia en el periodo postestimulación (**Figura 66d**) y una respuesta del ojo derecho de menor intensidad que la del izquierdo.

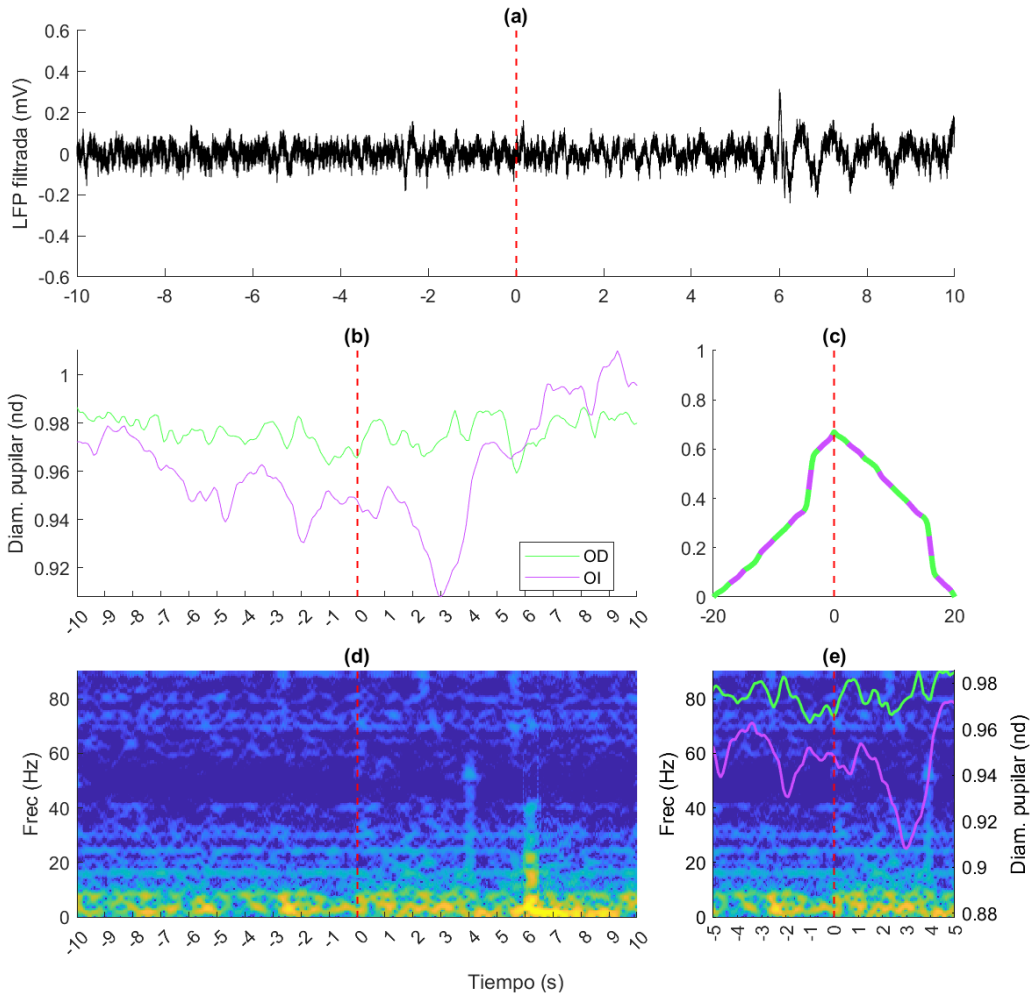


Figura 66. Representación temporal de las señales ante la estimulación D_2 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

En la respuesta a la estimulación nociceptiva contralateral (I_1), la correlación cruzada es moderada (0.53), como se aprecia en la **Figura 67c**, y el aumento en la actividad del LC derecho es significativo tras la estimulación (**Figura 67d**).

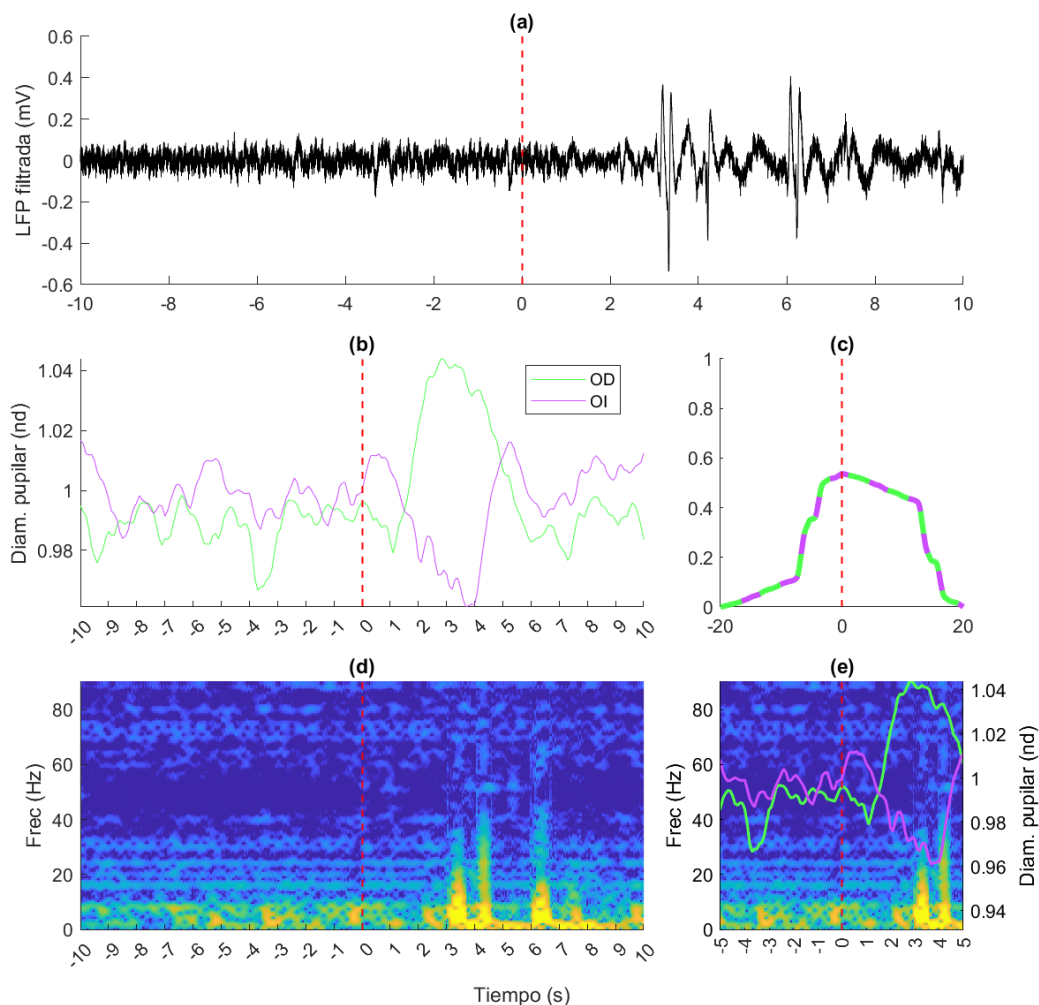


Figura 67. Representación temporal de las señales ante la estimulación I_1 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

La actividad en esta región del LC decrece en la segunda estimulación contralateral (I_2), como se aprecia en la **Figura 68d**, siendo la correlación cruzada entre la potencia de la señal LFP (LC derecho) y el pupilograma de 6.3, es decir moderadamente alta.

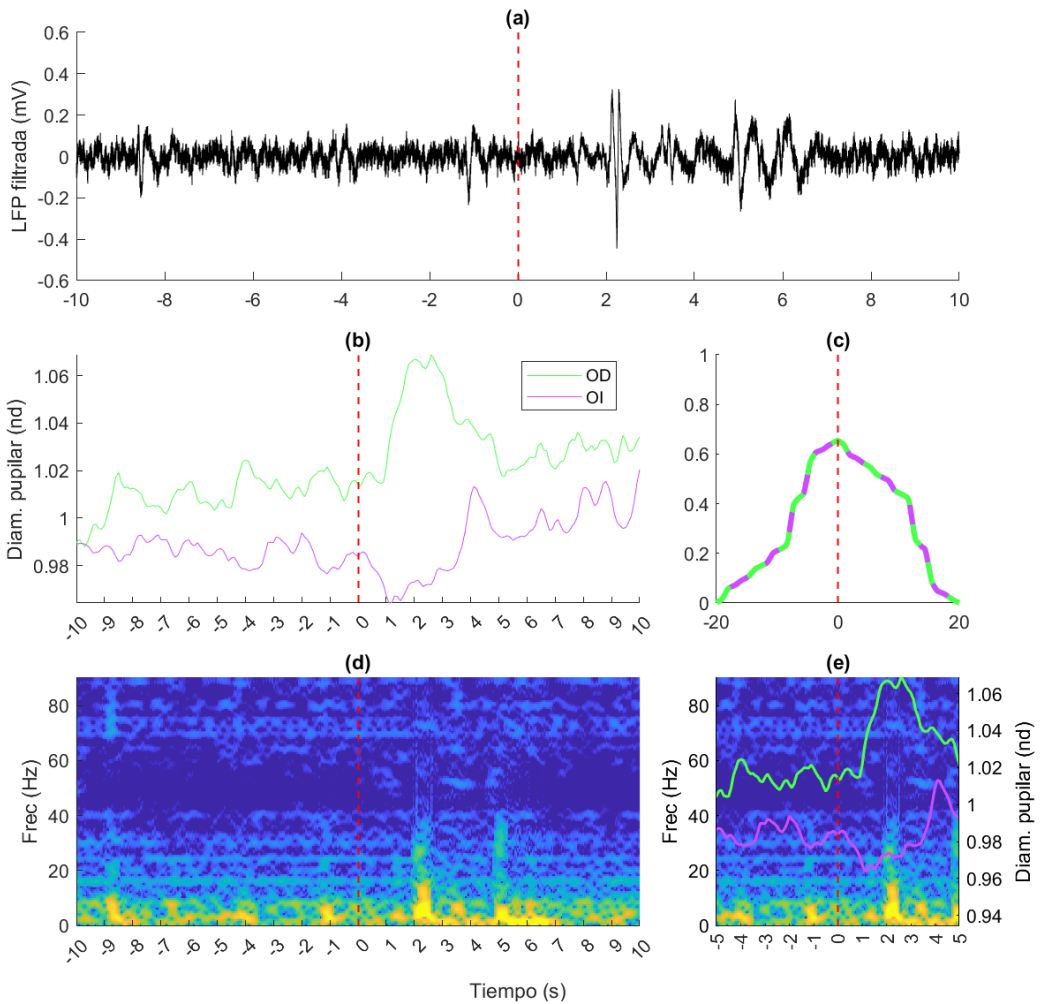


Figura 68. Representación temporal de las señales ante la estimulación I_2 durante la grabación del LFP en el LC derecho. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

En el LC izquierdo, los resultados obtenidos son similares. La respuesta a la estimulación contralateral (D_1) conlleva la dilatación de ambas pupilas (**Figura 69b**) y un marcado aumento en la actividad del LC (**Figura 69d**).

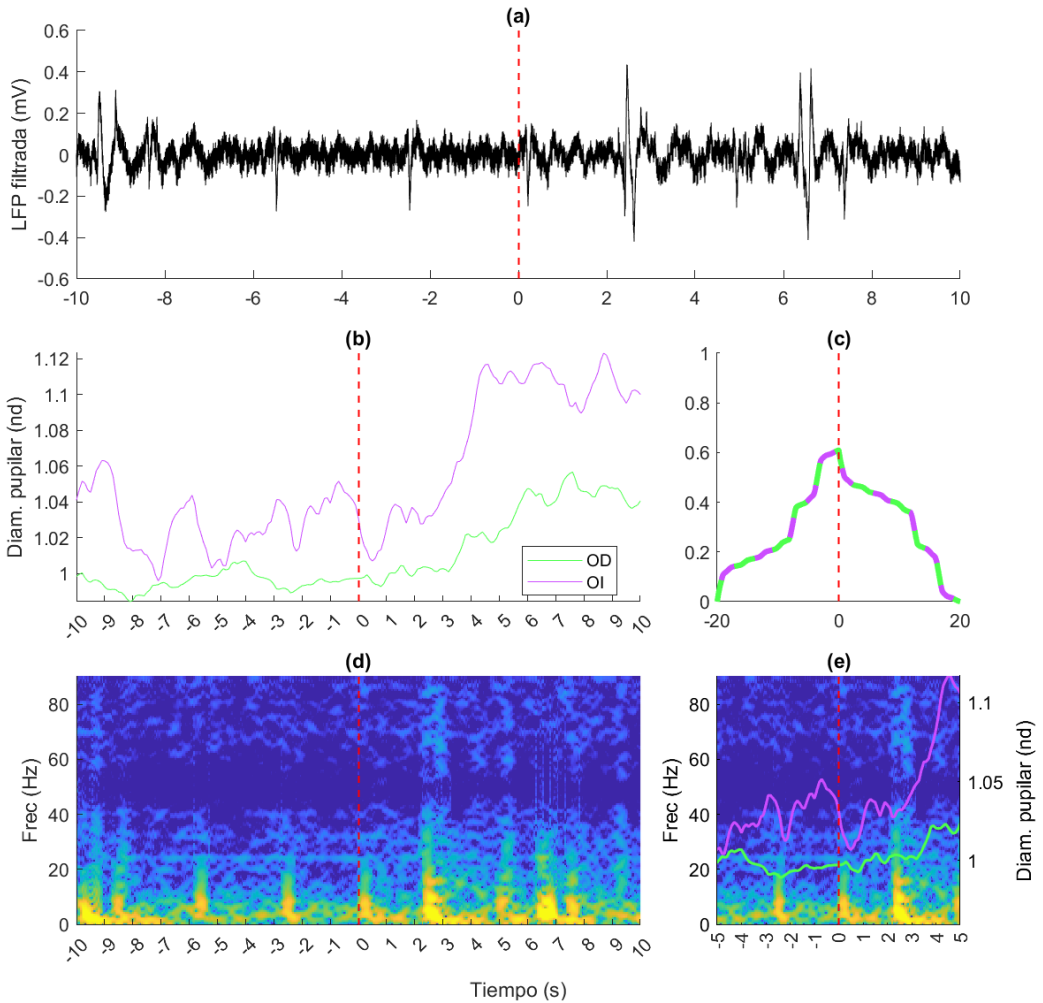


Figura 69. Representación temporal de las señales ante la estimulación D_1 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

En la segunda estimulación contralateral (D_2), la intensidad de la respuesta pupilar es alta (**Figura 70b**), pero el cambio en la actividad del LC no es significativo (**Figura 70d**). En ambos casos, la correlación cruzada alcanza valores significativos (0.6).

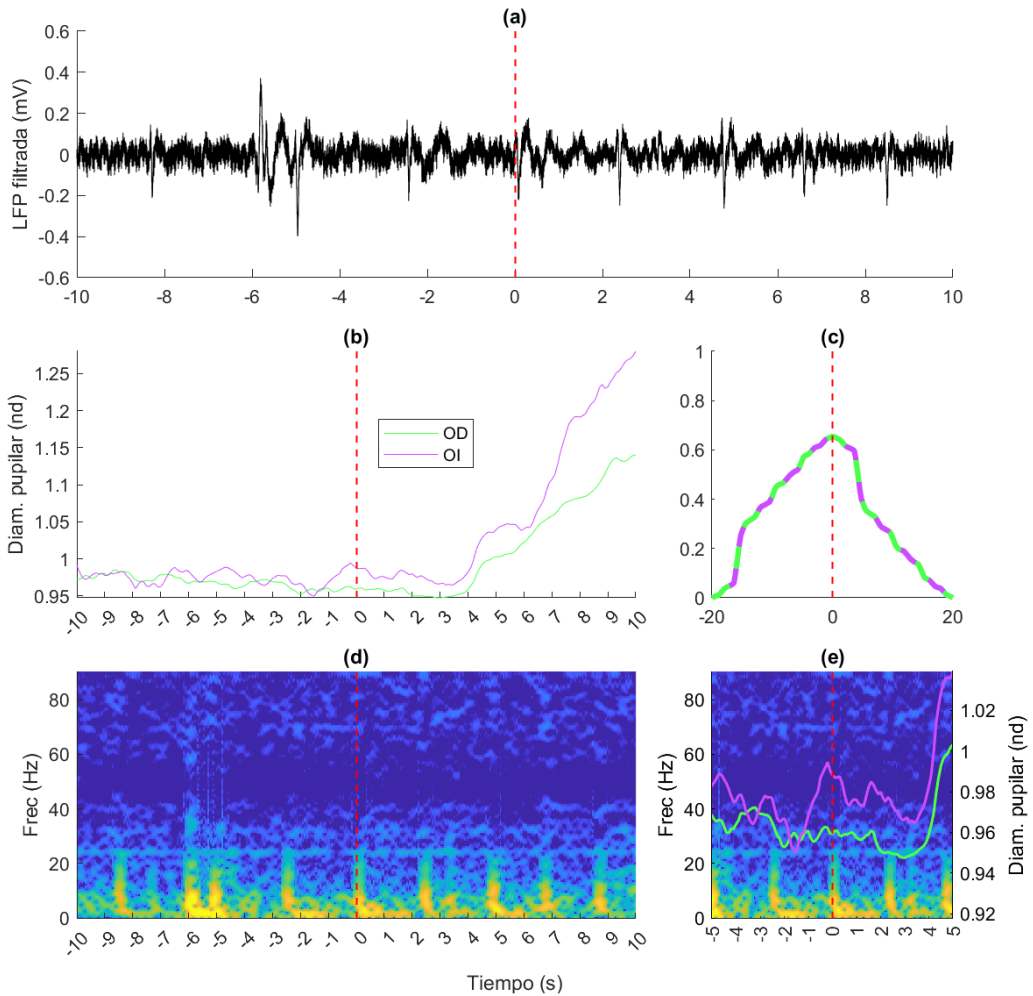


Figura 70. Representación temporal de las señales ante la estimulación D_2 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

En la primera estimulación ipsilateral (I_1), se produce la respuesta de dilatación en ambas pupilas (**Figura 71b**), y un aumento notable de la actividad en el LC izquierdo (**Figura 71e**). La correlación cruzada disminuye y a valores cercanos a 0.5.

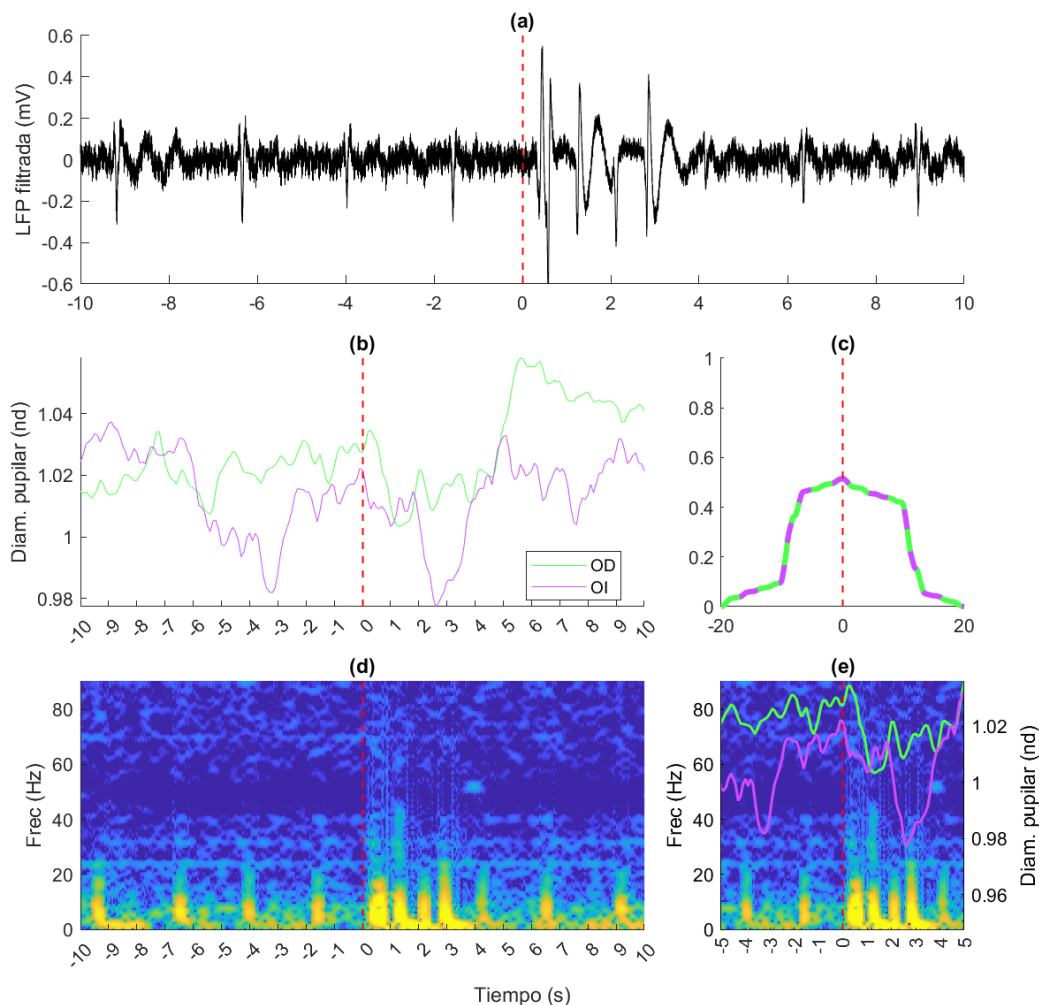


Figura 71. Representación temporal de las señales ante la estimulación I_1 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

Finalmente, en la segunda estimulación ipsilateral (I_2), de nuevo se genera una respuesta de dilatación en las pupilas (**Figura 72b**), y un aumento menos marcado de la actividad en el LC izquierdo (**Figura 72e**). La correlación cruzada se sitúa en valores cercanos a 0.6.

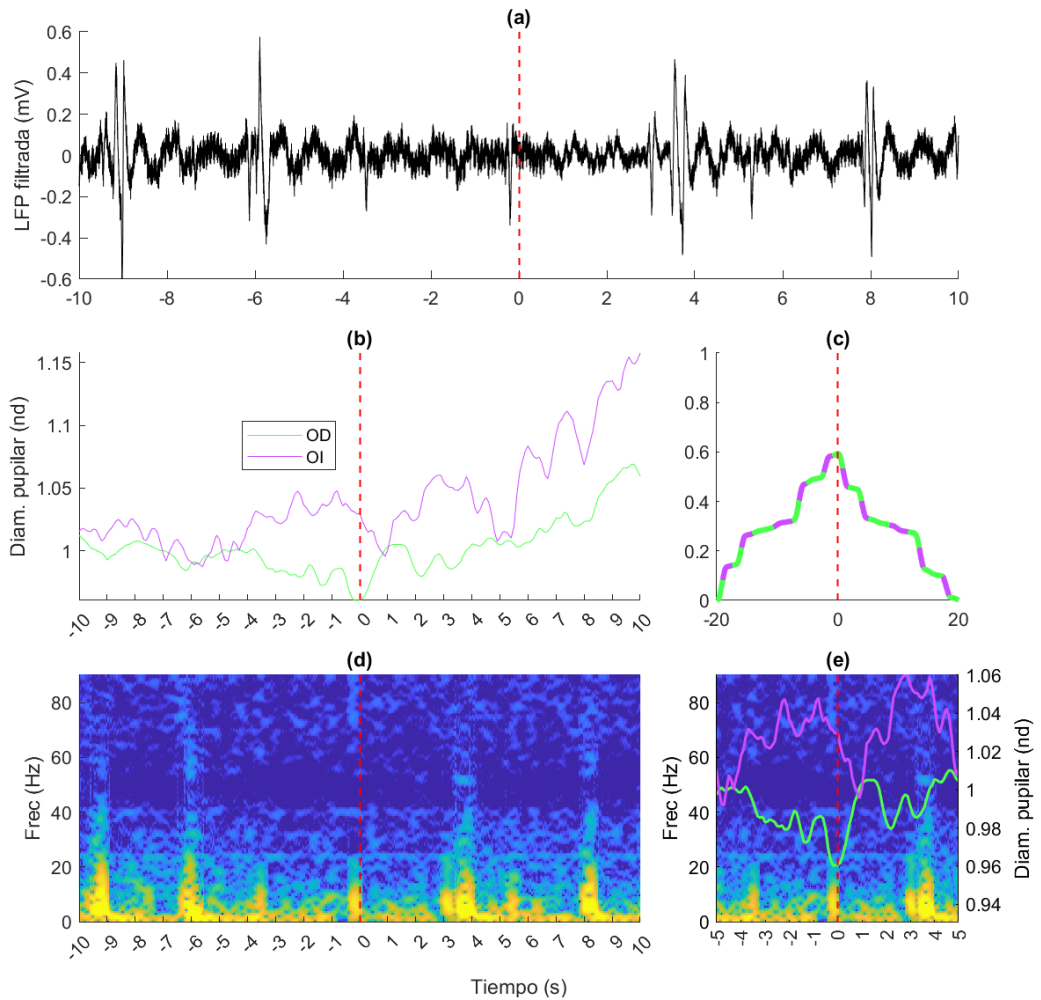


Figura 72. Representación temporal de las señales ante la estimulación I_2 durante la grabación del LFP en el LC izquierdo. (a) Diagrama temporal de la señal LFP; (b) respuesta pupilar ante el estímulo para ambos ojos; (c) Correlación cruzada para el LFP y la respuesta pupilar; (d) espectrograma de la señal de LFP entorno al instante de la estimulación nociceptiva; (e) grafica comparativa entre el espectrograma con la respuesta pupilar de ambos ojos.

En todos los casos se aprecia una dilatación pupilar en ambos ojos en respuesta a la estimulación dolorosa en cualquiera de las patas. En efecto, la actividad del LC aumenta en respuesta al dolor [143], y está asociada con una dilatación pupilar [80]. Ello corrobora que la dilatación pupilar es un indicador confiable de la activación del LC, incluso bajo anestesia, y que las respuestas fisiológicas del LC también se pueden medir mediante pupilometría [82].

Además, se aprecia la estimulación dolorosa repetida en la misma pata podría llevar a la habituación de la respuesta pupilar y de la actividad del LC. Esto se manifiesta como una disminución en la magnitud de la dilatación pupilar y en los cambios en la potencia de LFP en las estimulaciones posteriores.

La **Figura 73** y la **Figura 74** ilustran las ratios de la densidad espectral de potencia estimada en la señal LFP (potenciales de campo locales) registrada en el LC derecho e izquierdo respectivamente. Estas ratios consideran la potencia espectral en los 10 segundos anteriores al estímulo nociceptivo referida a la potencia espectral en los 10 segundos previos, considerados como representativos del periodo basal. Se ilustra la ratio para cada estímulo y banda espectral.

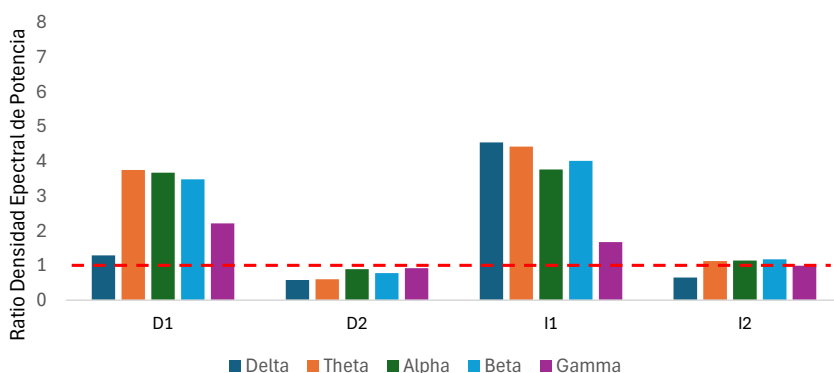


Figura 73. Densidad espectral de potencia estimada en la señal LFP (potenciales de campo locales) registrada en el LC izquierdo en los 10 segundos posteriores al estímulo nociceptivo referida a los 10 segundos anteriores. Se ilustra la ratio para cada estímulo y banda espectral. D₁: primera estimulación nociceptiva en la pata derecha; D₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata derecha. I₁: primera estimulación nociceptiva en la pata izquierda; I₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata izquierda.

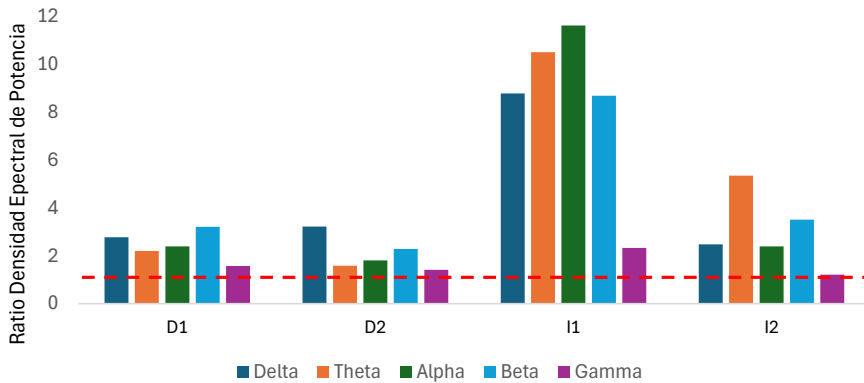


Figura 74. Relación entre la densidad espectral de potencia estimada en la señal LFP (potenciales de campo locales) registrada en el LC derecho en los 10 segundos posteriores al estímulo nociceptivo respecto de los 10 segundos anteriores. Se ilustra la ratio para cada estímulo y banda espectral. D₁: primera estimulación nociceptiva en la pata derecha; D₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata derecha. I₁: primera estimulación nociceptiva en la pata izquierda; I₂: segunda estimulación nociceptiva en la pata izquierda.

La respuesta del LC al dolor puede ser compleja y multifacética, implicando cambios en diferentes bandas de frecuencia. En efecto, se detectan cambios en el espectrograma de las señales LFP en cada región del LC registrada (**Figura 73** y **Figura 74**), inducidos por la estimulación dolorosa, que se refleja en la alteración de la potencia en varias bandas de frecuencia.

En todos los casos, a excepción del de la respuesta del LC izquierdo a la estimulación contralateral D₂, se observa un aumento la banda theta. Este aumento es más importante en las primeras estimulaciones de cada pata, y mayor en el LC derecho ante la estimulación contralateral. Algunos estudios sugieren que la potencia en la banda theta puede aumentar en respuesta al dolor, particularmente en el contexto del dolor crónico. Esto puede reflejar la participación de la banda theta en la codificación de la información nociceptiva [101].

Es importante tener en cuenta que la respuesta de la banda theta puede depender de factores como la intensidad del dolor, la cronicidad y el área cortical específica que se está registrando.

Aunque la potencia total en la banda delta crece en los 10 segundos posteriores al estímulo, se observa una disminución transitoria en la

potencia durante el aumento de la dilatación pupilar, seguida de un rápido retorno a la línea base después del período de estimulación. Esta disminución podría reflejar una supresión de la actividad de baja frecuencia asociada con un estado de mayor alerta y atención al estímulo nociceptivo. No obstante, el LC puede exhibir actividad oscilatoria intrínseca en la banda delta, incluso en ausencia de estímulos externos.

Se aprecia un incremento de la actividad en la banda alfa, aunque de nuevo, la anestesia ligera puede estar atenuando la respuesta en el animal anestesiado.

La banda beta se ha relacionado con el procesamiento activo de la información y la atención. Algunos estudios han reportado una disminución en la potencia beta después de la exposición al estrés, lo que sugiere que el dolor, como un factor estresante, también podría inducir una disminución en la potencia beta. Sin embargo, la respuesta del animal incluye un aumento en la actividad de la banda beta en todos los casos. En los experimentos con animal anestesiado en el marco de este estudio se obtuvieron valores relativamente bajos de potencia espectral de las bandas analizadas. Posiblemente por ello, la estimulación nociceptiva sea capaz de inducir pequeños incrementos en la potencia, que, dado la baja potencia basal, se detectan como incrementos notables. En cualquier caso, se necesitan más investigaciones para comprender completamente cómo la actividad de la banda beta en el LC responde a la estimulación dolorosa.

Se ha descrito un aumento en potencia de la banda gamma, que se ha asociado con estados de alerta y procesamiento de información sensorial y atención [176]. Este aumento se ha producido con carácter general en todas las respuestas a estímulos, excepto en el caso de D₂. El aumento en la potencia gamma refleja la respuesta del LC a la información nociceptiva y su papel en la mediación de la respuesta de alerta al dolor.

Es importante destacar las limitaciones que presenta este estudio, que deben ser consideradas a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

En primer lugar, cabe resaltar que los resultados presentados han sido obtenidos con una muestra de un solo animal. En este sentido, el tamaño muestral analizado en este estudio impide el estudio de la variabilidad individual en la respuesta a la anestesia y al dolor o estimulación nociceptiva, que puede ser significativa. Extendidos a una muestra más amplia, estos hallazgos podrían proporcionar información fidedigna sobre

el papel del LC en la respuesta nociceptiva y podrían tener implicaciones para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del dolor.

Por otro lado, es relevante conocer que la respuesta en las diferentes bandas de frecuencia puede variar según el individuo, el tipo de estímulo doloroso y las condiciones experimentales, como si el animal se encuentra despierto o bajo los efectos de un anestésico. De hecho, el uso de anestesia en este estudio supone una de las limitaciones del mismo, la cual estaría enmascarando los cambios fisiológicos reales ante una estimulación nociceptiva, aliviando las diferencias que se observan en la actividad de LFP en el LC. Asimismo, la magnitud de los cambios en la respuesta de dilatación pupilar a la estimulación nociceptiva también podría estar amortiguada ya que el nivel de anestesia empleado en este experimento tuvo que ser superior al empleado en el capítulo 5 dado el carácter invasivo del propio procedimiento estereotáxico en el animal. A pesar de los resultados observados que indican de forma general una respuesta de dilatación pupilar y aumento de la actividad oscilatoria del LC ante estímulos nociceptivos, el plano anestésico mayor podría contribuir negativamente a las fluctuaciones en la respuesta pupilar y electrofisiológica en el LC desencadenada por la estimulación nociceptiva.

Los resultados derivados de estudios en los que el electrodo de registro quede implantado previamente y el nivel de anestesia sea el mismo a los estudios de pupilometría previos o bien incluir el estudio de la actividad eléctrica de neuronas del LC (espigas o potenciales de acción), podrían esclarecer la respuesta estudiada entre el estímulo nociceptivo, la actividad del LC y la respuesta pupilar. Asimismo, dada las diferencias sexuales descritas en el LC y en dolor, sería interesante conocer las posibles diferencias con relación al sexo en esta relación.

Por tanto, serían necesarias más investigaciones para determinar completamente la relación entre los cambios en la actividad del LC y la respuesta pupilar al dolor, que podría proporcionar información adicional sobre los circuitos neuronales involucrados en la respuesta al dolor.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

En este capítulo se discuten las principales contribuciones alcanzadas y presentadas en capítulos previos.

Como se describe en el capítulo 3, se ha desarrollado y evaluado un sistema de pupilometría, incluyendo una novedosa herramienta basada en DL para detectar y medir cambios en el tamaño pupilar en tiempo real en ratones ligeramente anestesiados. El rendimiento del sistema se evaluó utilizando un conjunto de prueba externo, resultando en un IoU de 0.93 y un MAPE del diámetro pupilar estimado del 1.89%. Estos resultados demuestran la capacidad de la arquitectura propuesta para superar a otros métodos de referencia de última generación, ya sea basados en segmentación por instancias, como Mask R-CNN, segmentación semántica, como SegNet y DeepLabv3+ con diferentes redes troncales o *backbones* (Xception, ResNet-50, ResNet-18 y MobileNetV2), o en técnicas clásicas de procesamiento de imágenes. Además, el análisis de Bland-Altman mostró un gran nivel de acuerdo. Además, el tiempo de procesamiento por fotograma resultante fue menor que la tasa de fotogramas, lo que asegura la capacidad del sistema en tiempo real.

El modelo de segmentación evaluado mostró un buen rendimiento en cuanto a métricas de segmentación ampliamente utilizadas y tasas de éxito. Esto es de particular relevancia dado que los conjuntos de datos incluían imágenes pupilares con alta variabilidad en tamaños, intensidad de luz y artefactos oculares. En este sentido, no se incluyeron etapas de preprocesamiento para convertir las imágenes de color en escala de grises antes del proceso de segmentación, lo que significa que el modelo de segmentación basado en DL entrenado parece ser consistente con las no uniformidades que pueden surgir entre las imágenes, como variaciones de intensidad o distancia al animal durante el proceso de grabación. Estos resultados indican que tanto el uso combinado del equipo mecánico diseñado, la interfaz de usuario y el método basado en inteligencia artificial y soportado por DL, permiten la detección de cambios pupilares espontáneos y provocados y, por lo tanto, pueden usarse para monitorizar el estado de actividad del LC del ratón durante experimentos con animales ligeramente anestesiados.

Este estudio tiene algunas limitaciones. La robustez del sistema podría mejorarse potencialmente agregando etapas de preprocesamiento o

enriqueciendo el conjunto de entrenamiento para que el sistema pueda gestionar eventos como vibrisas, áreas desenfocadas o reflejos de luz. La búsqueda de hiperparámetros óptimos para la red DL propuesta queda por explorar por su potencial para mejorar los resultados. Además, las imágenes utilizadas en esta investigación se adquirieron bajo las mismas condiciones experimentales, por el mismo experimentador y utilizando los mismos parámetros de adquisición. Aumentar el conjunto de entrenamiento con imágenes adicionales de otras fuentes podría contribuir a lograr una mejor generalización de los resultados.

Los resultados de las herramientas de hardware y software propuestas revelan que la estrategia presentada proporciona una segmentación directa por instancias y ofrece resultados de última generación con una menor carga computacional, independientemente del tamaño pupilar, la intensidad de la luz o cualquier otra característica típica del proceso de grabación en ratones anestesiados. Aunque este estudio se realizó para evaluar indirectamente la función del sistema noradrenérgico del LC en roedores anestesiados, el marco presentado podría utilizarse como una herramienta de análisis precisa en cualquier estudio neurofisiológico en el que el animal esté ligeramente anestesiado o tenga la cabeza fija.

El capítulo 4 describe el estudio realizado sobre la respuesta pupilar inducida por la estimulación optogenética repetida de las neuronas noradrenérgicas del LC en ratones macho y hembras a los que se les inyectó un vector viral para expresar la opsina canalrodopsina-2 en las neuronas del LC. Se implantaron fibras ópticas para la fotoestimulación de las neuronas noradrenérgicas. Se utilizó un protocolo optogenético tónico de baja frecuencia (5 Hz) para activar el LC, pero con periodos de activación y reposo. La respuesta pupilar se registró mediante un sistema de pupilometría binocular. La respuesta pupilar se registró mediante un sistema de pupilometría binocular descrito en el capítulo 3.

El análisis de la respuesta pupilar ha sido ampliamente utilizado en la investigación biomédica y neurocientífica para estudiar la dinámica del sistema nervioso autónomo. Sin embargo, las metodologías tradicionales suelen centrarse en métricas simples, como el diámetro máximo alcanzado o el tiempo de respuesta inicial, dejando de lado parámetros más complejos que reflejen de manera integral las fases tempranas, intermedias y tardías de la dilatación pupilar. En este estudio se proponen diferentes métricas de cuantificación de la dinámica pupilar.

Los índices propuestos —incluyendo T_d , V_{30} , V_{60} , V_{90} , $t_{\max30}$, $Vel_{\max30}$, entre otros— representan una contribución novedosa al campo, al permitir una caracterización más granular y dinámica de la respuesta pupilar en diferentes contextos experimentales. Por ejemplo, $Vel_{\max30}$ y $t_{\max30}$ proporcionan información sobre la fase inicial y la dinámica rápida de la respuesta, mientras que parámetros como V_{90} y V_{120} evalúan la estabilización tardía, habitualmente ignorada en análisis convencionales. Esta aproximación multidimensional permite identificar diferencias entre grupos y explorar la relación entre diferentes fases de la respuesta.

Este estudio reveló diferencias significativas asociadas al sexo. Se confirmó que la fotoactivación del LC genera un aumento rápido y transitorio del diámetro pupilar, acorde con estudios previos de optogenética y pupilometría [101] [168]. Además, se observaron asimetrías en la dilatación pupilar entre el ojo ipsilateral y contralateral al LC estimulado, particularmente marcadas en los machos durante la primera estimulación, mientras que las hembras muestran esta lateralización en la tercera estimulación, lo que sugiere un dimorfismo sexual en las dinámicas de respuesta.

En machos, la respuesta ipsilateral al LC estimulado se atenuó con la repetición de los estímulos, lo que indica desensibilización del sistema simpático o habituación neuronal. Por el contrario, en hembras, la respuesta pupilar no presenta atenuación, y parece mantenerse consistente, sugiriendo una mayor plasticidad neuronal o sensibilización a la estimulación repetida. De nuevo, estas diferencias podrían estar relacionadas con el dimorfismo sexual en la morfología y función del LC, así como con la influencia de las hormonas sexuales en las vías LC-pupila [71], [169].

Los resultados destacan por tanto la relevancia de las diferencias sexuales en la regulación autonómica del tamaño pupilar. En machos, las correlaciones positivas en las métricas pupilares sugieren una sincronización inicial entre ambos ojos, mientras que, en hembras, la respuesta inicial no lateralizada contrasta con la estabilización diferencial observada en estímulos posteriores. Las divergencias podrían estar vinculadas a diferencias en la funcionalidad de receptores adrenérgicos y mecanismos inhibitorios opioides en el LC [170], [173], [174], que podrían ser menos eficientes en hembras.

El estudio concluye que la optogenética es una herramienta valiosa para investigar la función del LC y su influencia en la dinámica pupilar. Los hallazgos subrayan el impacto del sexo en la respuesta del LC a estímulos repetidos, con implicaciones en la comprensión de las diferencias sexuales en la adaptación al estrés, la ansiedad y el dolor. La sensibilización observada en hembras podría relacionarse con una respuesta autonómica más prolongada frente a estímulos estresantes, posiblemente modulada por factores hormonales y diferencias estructurales en el LC [71], [169].

La aproximación multidimensional propuesta proporcionó valor añadido a la investigación, y por ello fue aplicada en el estudio sobre la dinámica de la respuesta pupilar en respuesta a estímulos nociceptivos, descrita en el capítulo 5.

En el capítulo 5 se describe el estudio completado para evaluar la respuesta pupilar a la estimulación nociceptiva repetida en ratones macho y hembra, tanto en condiciones normales como en un modelo de dolor crónico a largo plazo. En general, la estimulación nociceptiva desencadena una dilatación pupilar en línea con estudios previos en roedores. Esta respuesta estaría mediada por la activación del LC y la subsecuente activación simpática e inhibición parasimpática.

Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas en la dinámica y amplitud de la respuesta pupilar según el ojo analizado, el sexo del animal y la presencia de dolor crónico. En machos naïve, la respuesta pupilar a la primera estimulación es similar en ambos ojos, pero con estimulaciones repetidas, el ojo ipsilateral al estímulo responde más rápido. Este hallazgo sugiere que la estimulación repetida es necesaria para que se manifieste la lateralización del sistema simpático en machos.

En contraste, en hembras naïve, el ojo ipsilateral responde más rápido desde la primera estimulación. Además, en hembras, la respuesta al segundo estímulo en la pata derecha muestra una dilatación pupilar tardía mayor, sugiriendo una sensibilización tras estimulaciones repetidas. Estas diferencias entre machos y hembras podrían explicarse por las diferencias en la estructura y excitabilidad del LC en hembras [71], [169].

En animales con dolor crónico a largo plazo, la respuesta pupilar difirió notablemente entre machos y hembras. En machos con dolor crónico, la respuesta pupilar es generalmente más lenta y de menor amplitud que en

los animales naïve, lo que podría indicar una menor capacidad de respuesta del LC, posiblemente por agotamiento o desensibilización.

En hembras con dolor crónico, la respuesta es más compleja. Al estimular la pata lesionada, se observa una respuesta pupilar exacerbada, sugiriendo una sensibilización de la vía ascendente del dolor. Sin embargo, al estimular la pata no lesionada, la respuesta es similar a la de los machos con dolor crónico. Estas diferencias en la respuesta pupilar en hembras con dolor crónico podrían deberse a la mayor complejidad y excitabilidad del LC en hembras, que podría resultar en una mayor capacidad de respuesta ante estímulos nociceptivos en la pata lesionada.

Es crucial destacar que este estudio no midió directamente la actividad del LC. Si bien los hallazgos sugieren una fuerte relación entre la actividad del LC y la respuesta pupilar, se necesitan futuros estudios que manipulen directamente la actividad del LC para confirmar una relación causal. A pesar de esta limitación, este estudio ha caracterizado con detalle la respuesta pupilar a la estimulación nociceptiva en ratones, identificando diferencias sexuales y cambios en la respuesta en un modelo de dolor crónico. Los hallazgos sugieren que la pupilometría podría ser una herramienta valiosa para el estudio del dolor y su comorbilidad con trastornos afectivos, abriendo nuevas vías para la investigación y el desarrollo de biomarcadores.

Finalmente, en el capítulo 6 se presenta el estudio en el que se registraron simultáneamente los LFP en el LC izquierdo y derecho, y el diámetro de la pupila durante la estimulación nociceptiva. La estimulación nociceptiva se administró mediante compresiones en las patas traseras derecha e izquierda por separado, con dos estimulaciones consecutivas en cada lado. Este diseño experimental permitió la comparación de la actividad del LC y la respuesta pupilar entre los lados y entre estimulaciones repetidas.

Se observó una interacción simultánea significativa entre las señales LFP y los cambios pupilares, lo que indica que las respuestas del LC y de las pupilas están estrechamente relacionadas en el contexto del dolor.

La primera estimulación nociceptiva derecha (D1) incrementó la actividad en el LC derecho (ipsilateral) y dilató ambas pupilas, con una correlación cruzada que indicaba la interacción simultánea entre ambas señales. En la segunda estimulación ipsilateral (D2), la correlación aumentó, aunque con una respuesta pupilar y de potencia de LFP menos marcada. La

estimulación contralateral mostró respuestas similares y mayor actividad inicial del LC, decreciendo en la segunda estimulación.

En el LC izquierdo, las respuestas a la estimulación ipsilateral y contralateral siguieron patrones parecidos, con aumentos de actividad más pronunciados en las primeras estimulaciones. En todos los casos se observó dilatación pupilar y aumentos en actividad del LC asociados al dolor, confirmando la pupilometría como indicador de activación del LC.

En general, las respuestas decrecientes en las estimulaciones repetidas sugieren un efecto de habituación. Este fenómeno podría reflejar la adaptación del sistema nervioso central a estímulos nociceptivos recurrentes.

Por otro lado, los análisis en bandas de frecuencia revelan respuestas específicas relacionadas con el dolor: la banda theta destaca en las primeras estimulaciones y en las respuestas contralaterales, lo que sugiere su implicación en la codificación de la información nociceptiva; la banda delta presenta fluctuaciones asociadas a estados de alerta, con una supresión transitoria durante los picos de dilatación pupilar; la banda gamma muestra un aumento generalizado, indicando su relación con la integración sensorial y la atención al estímulo doloroso. Las bandas alfa y beta reflejan modulaciones vinculadas al dolor y los efectos de la anestesia, aunque su papel requiere mayor exploración.

La actividad registrada en el LC y la dilatación pupilar confirman su papel como indicadores consistentes de la respuesta al dolor, incluso en condiciones de anestesia. Esto refuerza la utilidad de la pupilometría como herramienta para estudiar la activación del LC en contextos experimentales. La interacción simultánea entre las señales LFP y los cambios pupilares observada en el estudio sugiere una relación estrecha entre ambas respuestas en el procesamiento del dolor.

La muestra de estudio se redujo a un solo sujeto, por los defectos encontrados en la calidad de los datos experimentales recogidos para el resto de los animales, por lo que los resultados resaltan la necesidad de más investigaciones para entender el papel del LC en la respuesta al dolor y su potencial en el desarrollo de estrategias de tratamiento.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Se detallan a continuación las contribuciones y conclusiones más relevantes derivadas de la presente Tesis Doctoral:

- Se ha diseñado, desarrollado y evaluado un nuevo sistema de pupilometría binocular automática que emplea técnicas de aprendizaje profundo, y que ha sido creado con el propósito de evaluar indirectamente, en tiempo real, la función del sistema noradrenérgico-LC en roedores anestesiados.
- Se ha realizado un estudio en profundidad de los algoritmos de detección de pupila más utilizados en la actualidad, y se ha entrenado y validado un nuevo modelo de aprendizaje profundo para la segmentación rápida de la pupila basada en instancias SOLOv2. El modelo mejora en rendimiento los métodos descritos en el estado del arte, y muestra una excelente concordancia según el análisis de Bland-Altman. El sistema es, por tanto, adecuado para el seguimiento del tamaño de la pupila en tiempo real, independientemente de la intensidad de la luz o cualquier característica típica del proceso de registro en ratones anestesiados. El sistema podría usarse en cualquier estudio neurofisiológico tanto con animales anestesiados como despiertos utilizando un sistema de fijación de la cabeza que permita la monitorización pupilar.
- Se ha diseñado e implementada una interfaz que permite parametrizar el entorno experimental e integrar el control de un amplificador de optogenética en el sistema de pupilometría, posibilitando el registro sincronizado de imagen y estimulación. Tanto la plataforma como la interfaz se están empleando de forma cotidiana en las sesiones experimentales del grupo CTS-510.
- Se han definido métricas específicas para capturar tanto la magnitud como la velocidad de la dilatación pupilar en intervalos temporales definidos. Esta aproximación multidimensional se ha empleado para identificar diferencias entre grupos, y para explorar la relación entre diferentes fases de la respuesta, comparar entre ojos y caracterizar la respuesta a estímulos repetidos y laterales, con el fin de arrojar luz sobre los mecanismos fisiológicos subyacentes. Hasta donde sabe el autor, esta fue la primera vez que se describieron y analizaron

estos índices para el análisis de la respuesta pupilar ante estimulación optogenética o nociceptiva mecánica en roedores.

- Se ha estudiado la correlación del tamaño de la pupila con la actividad del LC, evaluando los cambios en la primera tras la activación del LC mediante una aproximación optogenética. Los resultados comprobaron que la fotoactivación de las neuronas noradrenérgicas del LC, mediante el uso del subsistema optogenético, produjo una respuesta de dilatación pupilar significativa en ambos ojos en animales sanos. Además, existieron diferencias sexuales en la respuesta pupilar a la estimulación optogenética del LC.
- Se ha estudiado la correlación del tamaño de la pupila con la actividad del LC y estimulación nociceptiva, evaluando la respuesta pupilar ante la estimulación nociceptiva mecánica en animales sanos y en animales con dolor neuropático a largo plazo causado por una lesión nerviosa.
- Se han diseñado los medios para realizar, desde la plataforma de pupilometría desarrollada, el registro simultáneo de la actividad electrofisiológica en el LC.
- Se ha evaluado, en un animal sano, la relación entre la respuesta pupilar y la actividad en el LC ante estimulaciones nociceptivas, cuantificada a través de los cambios en los potenciales de campo locales.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- [1] International Association on the Study of Pain (IASP), «IASP Terminology», <http://www.iasp-pain.org/terminology> .
- [2] A. C. D. C. Williams, «What can evolutionary theory tell us about chronic pain?», *Pain*, vol. 157, n.º 4, pp. 788-790, abr. 2016, doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000000464.
- [3] C. B. Johannes, T. K. Le, X. Zhou, J. A. Johnston, y R. H. Dworkin, «The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey», *J Pain*, vol. 11, n.º 11, pp. 1230-1239, nov. 2010, doi: 10.1016/J.JPAIN.2010.07.002.
- [4] O. Van Hecke, N. Torrance, y B. H. Smith, «Chronic pain epidemiology and its clinical relevance», *Br J Anaesth*, vol. 111, n.º 1, pp. 13-18, 2013, doi: 10.1093/BJA/AET123.
- [5] S. F. Lerman, Z. Rudich, S. Brill, H. Shalev, y G. Shahar, «Longitudinal associations between depression, anxiety, pain, and pain-related disability in chronic pain patients», *Psychosom Med*, vol. 77, n.º 3, pp. 333-341, abr. 2015, doi: 10.1097/PSY.0000000000000158.
- [6] M. J. Bair, R. L. Robinson, W. Katon, y K. Kroenke, «Depression and Pain Comorbidity», *Arch Intern Med*, vol. 163, n.º 20, p. 2433, nov. 2003, doi: 10.1001/archinte.163.20.2433.
- [7] G. S. Ginsburg, M. A. Riddle, y M. Davies, «Somatic Symptoms in Children and Adolescents With Anxiety Disorders», *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, vol. 45, n.º 10, pp. 1179-1187, oct. 2006, doi: 10.1097/01.CHI.0000231974.43966.6E.
- [8] S. A. Hofflich, A. A. Hughes, y P. C. Kendall, «Somatic complaints and childhood anxiety disorders», *International Journal of Clinical and Health Psychology*, vol. 6, n.º 2, pp. 229-242, 2006, Accedido: 8 de diciembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33760201>
- [9] P. Knaster, H. Karlsson, A. M. Estlander, y E. Kalso, «Psychiatric disorders as assessed with SCID in chronic pain patients: the anxiety disorders precede the onset of pain», *Gen Hosp Psychiatry*, vol. 34, n.º 1, pp. 46-52, ene. 2012, doi: 10.1016/J.GENHOSPPSYCH.2011.09.004.
- [10] W. M. Hooten, «Chronic Pain and Mental Health Disorders: Shared Neural Mechanisms, Epidemiology, and Treatment», *Mayo Clin Proc*, vol. 91, n.º 7, pp. 955-970, jul. 2016, doi: 10.1016/J.MAYOCP.2016.04.029.

- [11] L. Bravo, C. Alba-Delgado, S. Torres-Sanchez, J. A. Mico, F. L. Neto, y E. Berrocoso, «Social stress exacerbates the aversion to painful experiences in rats exposed to chronic pain: The role of the locus coeruleus», *Pain*, vol. 154, n.º 10, pp. 2014-2023, oct. 2013, doi: 10.1016/j.pain.2013.06.021.
- [12] L. Bravo, J. A. Mico, R. Rey-Brea, B. Pérez-Nievas, J. C. Leza, y E. Berrocoso, «Depressive-like States Heighten the Aversion to Painful Stimuli in a Rat Model of Comorbid Chronic Pain and Depression», *Anesthesiology*, vol. 117, n.º 3, pp. 613-625, sep. 2012, doi: 10.1097/ALN.0b013e3182657b3e.
- [13] L. Bravo, S. Torres-Sanchez, C. Alba-Delgado, J. A. Mico, y E. Berrocoso, «Pain exacerbates chronic mild stress-induced changes in noradrenergic transmission in rats», *European Neuropsychopharmacology*, vol. 24, n.º 6, pp. 996-1003, jun. 2014, doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.01.011.
- [14] I. Yalcin, F. Barthas, y M. Barrot, «Emotional consequences of neuropathic pain: Insight from preclinical studies», 2014, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.08.002.
- [15] C. Alba-Delgado *et al.*, «Chronic Pain Leads to Concomitant Noradrenergic Impairment and Mood Disorders», *Biol Psychiatry*, vol. 73, n.º 1, pp. 54-62, ene. 2013, doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.033.
- [16] M. Ennis, G. Aston-Jones, y R. Shiekhhattar, «Activation of locus coeruleus neurons by nucleus paragigantocellularis or noxious sensory stimulation is mediated by intracoerulear excitatory amino acid neurotransmission», *Brain Res*, vol. 598, n.º 1-2, pp. 185-195, dic. 1992, doi: 10.1016/0006-8993(92)90182-9.
- [17] S. Prieto-Soler, «Desarrollo postnatal de medidas fisiológicas (Consumo de oxígeno) y electrofisiológicas (ECG, EMG) en ratones con alteraciones en el sistema noradrenérgico», 2014. doi: 10.13140/RG.2.2.12900.63366.
- [18] M. Llorca-Torralba, G. Borges, F. Neto, J. A. Mico, y E. Berrocoso, «Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation», 3 de diciembre de 2016, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.05.057.
- [19] P. W. Howorth, A. G. Teschemacher, y A. E. Pickering, «Retrograde adenoviral vector targeting of nociresponsive pontospinal noradrenergic neurons in the rat in vivo», *Journal of Comparative Neurology*, vol. 512, n.º 2, pp. 141-157, ene. 2009, doi: 10.1002/CNE.21879.
- [20] S. L. Jones y G. F. Gebhart, «Quantitative characterization of ceruleospinal inhibition of nociceptive transmission in the rat», *J Neurophysiol*, vol. 56, n.º 5, pp. 1397-1410, 1986, doi: 10.1152/JN.1986.56.5.1397.
- [21] L. Jasmin, A. Boudah, y P. T. Ohara, «Long-term effects of decreased noradrenergic central nervous system innervation on pain behavior and opioid antinociception», *J Comp Neurol*, vol. 460, n.º 1, pp. 38-55, may 2003, doi: 10.1002/CNE.10633.

- [22] M. Tsuruoka, K. Matsutani, y T. Inoue, «Coeruleospinal inhibition of nociceptive processing in the dorsal horn during unilateral hindpaw inflammation in the rat», *Pain*, vol. 104, n.º 1-2, pp. 353-361, 2003, doi: 10.1016/S0304-3959(03)00042-3.
- [23] R. J. Bodnar, R. F. Ackermann, D. D. Kelly, y M. Glusman, «Elevations in nociceptive thresholds following locus coeruleus lesions», *Brain Res Bull*, vol. 3, n.º 2, pp. 125-130, 1978, doi: 10.1016/0361-9230(78)90037-0.
- [24] M. Llorca-Torralba *et al.*, «Pain and depression comorbidity causes asymmetric plasticity in the locus coeruleus neurons», *Brain*, vol. 145, n.º 1, pp. 154-167, ene. 2022, doi: 10.1093/BRAIN/AWAB239.
- [25] C. Camarena-Delgado *et al.*, «Nerve injury induces transient locus coeruleus activation over time: Role of the locus coeruleus-dorsal reticular nucleus pathway», *Pain*, vol. 163, n.º 5, pp. 943-954, may 2022, doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000002457.
- [26] S. L. Jones y G. F. Gebhart, «Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation», *Brain Res*, vol. 460, n.º 2, pp. 281-296, sep. 1988, doi: 10.1016/0006-8993(88)90373-3.
- [27] H. Viisanen y A. Pertovaara, «Influence of peripheral nerve injury on response properties of locus coeruleus neurons and coeruleospinal antinociception in the rat», *Neuroscience*, vol. 146, n.º 4, pp. 1785-1794, jun. 2007, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2007.03.016.
- [28] S. Hirschberg, Y. Li, A. Randall, E. J. Kremer, y A. E. Pickering, «Functional dichotomy in spinal- vs prefrontal-projecting locus coeruleus modules splits descending noradrenergic analgesia from ascending aversion and anxiety in rats», *Elife*, vol. 6, oct. 2017, doi: 10.7554/ELIFE.29808.
- [29] A. Pertovaara, «Noradrenergic pain modulation», *Prog Neurobiol*, vol. 80, n.º 2, pp. 53-83, oct. 2006, doi: 10.1016/J.PNEUROBIO.2006.08.001.
- [30] M. Yoshimura y H. Furue, «Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord», *J Pharmacol Sci*, vol. 101, n.º 2, pp. 107-117, 2006, doi: 10.1254/JPHS.CRJ06008X.
- [31] F. Farahani, H. Azizi, M. Janahmadi, V. Seutin, y S. Semnanian, «Formalin-induced inflammatory pain increases excitability in locus coeruleus neurons», *Brain Res Bull*, vol. 172, pp. 52-60, jul. 2021, doi: 10.1016/J.BRAINRESBULL.2021.04.002.
- [32] H. Imbe *et al.*, «Activation of ERK in the locus coeruleus following acute noxious stimulation», *Brain Res*, vol. 1263, pp. 50-57, mar. 2009, doi: 10.1016/j.brainres.2009.01.052.

- [33] L. Hickey *et al.*, «Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats», *J Neurosci*, vol. 34, n.º 12, pp. 4148-4160, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4835-13.2014.
- [34] C. R. Chapman, D. H. Bradshaw, G. W. Donaldson, R. C. Jacobson, y Y. Nakamura, «Central noradrenergic mechanisms and the acute stress response during painful stimulation», <http://dx.doi.org/10.1177/0269881114543718>, vol. 28, n.º 12, pp. 1135-1142, ago. 2014, doi: 10.1177/0269881114543718.
- [35] O. Borodovitsyna, M. D. Flamini, y D. J. Chandler, «Acute Stress Persistently Alters Locus Coeruleus Function and Anxiety-like Behavior in Adolescent Rats», *Neuroscience*, vol. 373, pp. 7-19, mar. 2018, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.01.020.
- [36] M. A. Hebert, L. I. Serova, y E. L. Sabban, «Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus», *J Neurochem*, vol. 95, n.º 2, pp. 484-498, oct. 2005, doi: 10.1111/J.1471-4159.2005.03386.X.
- [37] V. Zerbi *et al.*, «Rapid Reconfiguration of the Functional Connectome after Chemogenetic Locus Coeruleus Activation», *Neuron*, vol. 103, n.º 4, pp. 702-718.e5, 2019, doi: 10.1016/j.neuron.2019.05.034.
- [38] J. G. McCall *et al.*, «CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety», *Neuron*, vol. 87, n.º 3, pp. 605-620, 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.002.
- [39] A. Uematsu *et al.*, «Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states», *Nat Neurosci*, vol. 20, n.º 11, pp. 1602-1611, nov. 2017, doi: 10.1038/nn.4642.
- [40] D. Seo y M. R. Bruchas, «Polymorphic computation in locus coeruleus networks», *Nat Neurosci*, vol. 20, n.º 11, pp. 1517-1519, nov. 2017, doi: 10.1038/nn.4663.
- [41] J. J. Bonica y J. F. Hoffman, «The Management of Pain with Special Emphasis on the Use of Analgesic Blocks in Diagnosis, Prognosis, and Therapy.», *Anesth Analg*, vol. 34, n.º 5, pp. 57-58, 1954.
- [42] K. I. Hayashida, H. Obata, K. Nakajima, y J. C. Eisenach, «Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain», *Volume 109, Issue 6, Pages 1077 - 1084*, vol. 109, n.º 6, pp. 1077-1084, 2008, doi: 10.1097/ALN.0b013e31818dac9c.
- [43] C. Alba-Delgado, J. A. Mico, P. Sánchez-Blázquez, y E. Berrocoso, «Analgesic antidepressants promote the responsiveness of locus coeruleus neurons to noxious stimulation: Implications for neuropathic pain», *Pain*, vol. 153, n.º 7, pp. 1438-1449, jul. 2012, doi: 10.1016/J.PAIN.2012.03.034.

- [44] B. K. Taylor y K. N. Westlund, «The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator», *J Neurosci Res*, vol. 95, n.º 6, pp. 1336-1346, jun. 2017, doi: 10.1002/JNR.23956.
- [45] J. S. Mogil, «Animal models of pain: progress and challenges», *Nature Reviews Neuroscience* 2009 10:4, vol. 10, n.º 4, pp. 283-294, mar. 2009, doi: 10.1038/nrn2606.
- [46] K. A. Sluka y K. N. Westlund, «Spinal projections of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the Harlan and the Sasco Sprague-Dawley rat», *Brain Res*, vol. 579, n.º 1, pp. 67-73, may 1992, doi: 10.1016/0006-8993(92)90742-R.
- [47] M. De Felice *et al.*, «Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain», *Pain*, vol. 152, n.º 12, pp. 2701-2709, dic. 2011, doi: 10.1016/J.PAIN.2011.06.008.
- [48] J. J. Brightwell y B. K. Taylor, «Noradrenergic neurons in the locus coeruleus contribute to neuropathic pain», *Neuroscience*, vol. 160, n.º 1, pp. 174-185, abr. 2009, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.02.023.
- [49] R. Kaushal *et al.*, «GABA-A receptor activity in the noradrenergic locus coeruleus drives trigeminal neuropathic pain in the rat; contribution of NAd1 receptors in the medial prefrontal cortex», *Neuroscience*, vol. 334, pp. 148-159, oct. 2016, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.08.005.
- [50] S. W. Hughes, L. Hickey, R. P. Hulse, B. M. Lumb, y A. E. Pickering, «Endogenous analgesic action of the pontospinal noradrenergic system spatially restricts and temporally delays the progression of neuropathic pain following tibial nerve injury», *Pain*, vol. 154, n.º 9, pp. 1680-1690, 2013, doi: 10.1016/J.PAIN.2013.05.010.
- [51] I. Martins y I. Tavares, «Reticular formation and pain: The past and the future», *Volume 11*, vol. 11, ene. 1951, doi: 10.3389/fnana.2017.00051.
- [52] I. Martins *et al.*, «Increased noradrenergic neurotransmission to a pain facilitatory area of the brain is implicated in facilitation of chronic pain», *Volume 123, Issue 3, Pages 642 - 653*, vol. 123, n.º 3, pp. 642-653, sep. 2015, doi: 10.1097/ALN.0000000000000749.
- [53] S. Hughes, L. Hickey, L. F. Donaldson, B. M. Lumb, y A. E. Pickering, «Intrathecal reboxetine suppresses evoked and ongoing neuropathic pain behaviours by restoring spinal noradrenergic inhibitory tone», *Pain*, vol. 156, n.º 2, pp. 328-334, 2015, doi: 10.1097/01.J.PAIN.0000460313.73358.31.
- [54] I. Gilron, D. Tu, R. R. Holden, A. C. Jackson, y D. Du Merton-Shore, «Combination of morphine with nortriptyline for neuropathic pain», *Pain*, vol. 156, n.º 8, pp. 1440-1448, ago. 2015, doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000000149.

- [55] L. E. Chaparro, P. J. Wiffen, R. A. Moore, y I. Gilron, «Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults», *Volume 2017, Issue 6*, vol. 2017, n.º 6, doi: 10.1002/14651858.CD008943.pub2.
- [56] F. Barthas, J. Sellmeijer, S. Hugel, E. Waltisperger, M. Barrot, y I. Yalcin, «The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression», *Biol Psychiatry*, vol. 77, n.º 3, pp. 236-245, 2015, doi: 10.1016/j.biopsych.2014.08.004.
- [57] A. M. Cunha, J. Pereira-Mendes, A. Almeida, M. R. Guimarães, y H. Leite-Almeida, «Chronic pain impact on rodents' behavioral repertoire», *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 119, pp. 101-127, dic. 2020, doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2020.09.022.
- [58] M. Llorca-Torralba *et al.*, «Chemogenetic Silencing of the Locus Coeruleus–Basolateral Amygdala Pathway Abolishes Pain-Induced Anxiety and Enhanced Aversive Learning in Rats», *Biol Psychiatry*, vol. 85, n.º 12, pp. 1021-1035, jun. 2019, doi: 10.1016/j.biopsych.2019.02.018.
- [59] O. Moriarty, M. Roche, B. E. McGuire, y D. P. Finn, «Validation of an air-puff passive-avoidance paradigm for assessment of aversive learning and memory in rat models of chronic pain», *J Neurosci Methods*, vol. 204, n.º 1, pp. 1-8, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.10.024>.
- [60] A. A. Mutso *et al.*, «Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain», *Volume 32, Issue 17, Pages 5747 - 5756*, vol. 32, n.º 17, pp. 5747-5756, abr. 2012, doi: 10.1523/jneurosci.0587-12.2012.
- [61] O. H. P. Burman, R. M. A. Parker, E. S. Paul, y M. T. Mendl, «Anxiety-induced cognitive bias in non-human animals», *Physiol Behav*, vol. 98, n.º 3, pp. 345-350, sep. 2009, doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2009.06.012.
- [62] I. Yalcin y M. Barrot, «The anxiodepressive comorbidity in chronic pain», *Volume 27, Issue 5, Pages 520 - 527*, vol. 27, n.º 5, pp. 520-527, oct. 2014, doi: 10.1097/ACO.0000000000000116.
- [63] J. C. Gaspar, C. Healy, M. I. Ferdousi, M. Roche, y D. P. Finn, «Pharmacological Blockade of PPAR α Exacerbates Inflammatory Pain-Related Impairment of Spatial Memory in Rats», *Biomedicines 2021, Vol. 9, Page 610*, vol. 9, n.º 6, p. 610, may 2021, doi: 10.3390/BIOMEDICINES9060610.
- [64] A. J. Shackman, T. V. Salomons, H. A. Slagter, A. S. Fox, J. J. Winter, y R. J. Davidson, «The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex», *Nature Reviews Neuroscience 2011 12:3*, vol. 12, n.º 3, pp. 154-167, feb. 2011, doi: 10.1038/nrn2994.
- [65] H. S. Mayberg *et al.*, «Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: Converging PET findings in depression and normal sadness», *Depression: The Science of Mental Health*, vol. 6, pp. 245-253, oct. 2013, doi: 10.1176/AJP.156.5.675/ASSET/IMAGES/AM3F2.JPEG.

- [66] J. Sellmeijer *et al.*, «Hyperactivity of Anterior Cingulate Cortex Areas 24a/24b Drives Chronic Pain-Induced Anxiodepressive-like Consequences», *Journal of Neuroscience*, vol. 38, n.º 12, pp. 3102-3115, mar. 2018, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3195-17.2018.
- [67] T. Suto, J. C. Eisenach, y K. I. Hayashida, «Peripheral nerve injury and gabapentin, but not their combination, impair attentional behavior via direct effects on noradrenergic signaling in the brain», *Pain*, vol. 155, n.º 10, pp. 1935-1942, oct. 2014, doi: 10.1016/J.PAIN.2014.05.014.
- [68] D. A. Bangasser, X. Zhang, V. Garachh, E. Hanhauser, y R. J. Valentino, «Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: A structural basis for sex differences in emotional arousal», *Physiol Behav*, vol. 103, n.º 3-4, pp. 342-351, jun. 2011, doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2011.02.037.
- [69] J. M. Luque, M. R. de Blas, S. Segovia, y A. Guillamón, «Sexual dimorphism of the dopamine- β -hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus», *Developmental Brain Research*, vol. 67, n.º 2, pp. 211-215, jun. 1992, doi: 10.1016/0165-3806(92)90221-H.
- [70] H. Pinos, P. Collado, M. Rodríguez-Zafra, C. Rodríguez, S. Segovia, y A. Guillamón, «The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat», *Brain Res Bull*, vol. 56, n.º 1, pp. 73-78, sep. 2001, doi: 10.1016/S0361-9230(01)00540-8.
- [71] B. Mulvey *et al.*, «Molecular and Functional Sex Differences of Noradrenergic Neurons in the Mouse Locus Coeruleus», *Cell Rep*, vol. 23, n.º 8, pp. 2225-2235, may 2018, doi: 10.1016/J.CELREP.2018.04.054.
- [72] M. Altemus, N. Sarvaiya, y C. Neill Epperson, «Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives», *Front Neuroendocrinol*, vol. 35, n.º 3, pp. 320-330, ago. 2014, doi: 10.1016/J.YFRNE.2014.05.004.
- [73] M. Olff, «Sex and gender differences in post-traumatic stress disorder: an update», *Eur J Psychotraumatol*, vol. 8, n.º sup4, sep. 2017, doi: 10.1080/20008198.2017.1351204.
- [74] A. Cardenas, J. Caniglia, D. Keljalic, y E. Dimitrov, «Sex differences in the development of anxiodepressive-like behavior of mice subjected to sciatic nerve cuffing», *Pain*, vol. 161, n.º 8, 2020, [En línea]. Disponible en: https://journals.lww.com/pain/fulltext/2020/08000/sex_differences_in_the_development_of.19.aspx
- [75] J. W. De Gee, T. Knapen, y T. H. Donner, «Decision-related pupil dilation reflects upcoming choice and individual bias», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, n.º 5, pp. E618-E625, feb. 2014, doi: 10.1073/pnas.1317557111.
- [76] R. B. Ebitz, J. M. Pearson, y M. L. Platt, «Pupil size and social vigilance in rhesus macaques», *Front Neurosci*, vol. 8, n.º 8 MAY, may 2014, doi: 10.3389/fnins.2014.00100.

- [77] M. R. Nassar, K. M. Rumsey, R. C. Wilson, K. Parikh, B. Heasley, y J. I. Gold, «Rational regulation of learning dynamics by pupil-linked arousal systems», *Nat Neurosci*, vol. 15, n.º 7, pp. 1040-1046, jul. 2012, doi: 10.1038/nn.3130.
- [78] J. Reimer, E. Froudarakis, C. R. Cadwell, D. Yatsenko, G. H. Denfield, y A. S. Tolias, «Pupil Fluctuations Track Fast Switching of Cortical States during Quiet Wakefulness», *Neuron*, vol. 84, n.º 2, pp. 355-362, 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.033.
- [79] Y. Liu, C. Rodenkirch, N. Moskowitz, B. Schriver, y Q. Wang, «Dynamic Lateralization of Pupil Dilation Evoked by Locus Coeruleus Activation Results from Sympathetic, Not Parasympathetic, Contributions», *Cell Rep*, vol. 20, n.º 13, pp. 3099-3112, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.094.
- [80] J. Reimer *et al.*, «Pupil fluctuations track rapid changes in adrenergic and cholinergic activity in cortex», *Nat Commun*, vol. 7, n.º 1, pp. 1-7, nov. 2016, doi: 10.1038/ncomms13289.
- [81] S. Joshi, Y. Li, R. M. Kalwani, y J. I. Gold, «Relationships between Pupil Diameter and Neuronal Activity in the Locus Coeruleus, Colliculi, and Cingulate Cortex», *Neuron*, vol. 89, n.º 1, pp. 221-234, ene. 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.028.
- [82] M. Privitera *et al.*, «A complete pupillometry toolbox for real-time monitoring of locus coeruleus activity in rodents», *Nat Protoc*, vol. 15, n.º 8, pp. 2301-2320, 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0324-6.
- [83] W. Ellermeier y W. Westphal, «Gender differences in pain ratings and pupil reactions to painful pressure stimuli», *Pain*, vol. 61, n.º 3, pp. 435-439, jun. 1995, doi: 10.1016/0304-3959(94)00203-Q.
- [84] Ö. Yüzgeç, M. Prsa, R. Zimmermann, y D. Huber, «Pupil Size Coupling to Cortical States Protects the Stability of Deep Sleep via Parasympathetic Modulation», *Current Biology*, vol. 28, n.º 3, pp. 392-400.e3, 2018, doi: 10.1016/j.cub.2017.12.049.
- [85] J. W. de Gee *et al.*, «Pupil-linked phasic arousal predicts a reduction of choice bias across species and decision domains», *Elife*, vol. 9, pp. 1-25, jun. 2020, doi: 10.7554/eLife.54014.
- [86] V. D. Costa y P. H. Rudebeck, «More than Meets the Eye: The Relationship between Pupil Size and Locus Coeruleus Activity», *Neuron*, vol. 89, n.º 1, pp. 8-10, ene. 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.031.
- [87] P. R. Murphy, R. G. O'Connell, M. O'Sullivan, I. H. Robertson, y J. H. Balsters, «Pupil diameter covaries with BOLD activity in human locus coeruleus», *Hum Brain Mapp*, vol. 35, n.º 8, pp. 4140-4154, ago. 2014, doi: 10.1002/hbm.22466.
- [88] D. J. Chandler, P. Jensen, J. G. McCall, A. E. Pickering, L. A. Schwarz, y N. K. Totah, «Redefining Noradrenergic Neuromodulation of Behavior: Impacts of a Modular Locus Coeruleus Architecture», *The Journal of Neuroscience*, vol. 39, n.º 42, p. 8239, oct. 2019, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1164-19.2019.

- [89] S. J. Sara y S. Bouret, «Orienting and Reorienting: The Locus Coeruleus Mediates Cognition through Arousal», *Neuron*, vol. 76, n.º 1, pp. 130-141, oct. 2012, doi: 10.1016/J.NEURON.2012.09.011.
- [90] E. E. Benarroch, «Locus coeruleus», *Cell and Tissue Research* 2017 373:1, vol. 373, n.º 1, pp. 221-232, jul. 2017, doi: 10.1007/S00441-017-2649-1.
- [91] D. Weinshenker, «Long Road to Ruin: Noradrenergic Dysfunction in Neurodegenerative Disease», *Trends Neurosci*, vol. 41, n.º 4, pp. 211-223, 2018, doi: 10.1016/j.tins.2018.01.010.
- [92] M. J. Betts *et al.*, «Locus coeruleus imaging as a biomarker for noradrenergic dysfunction in neurodegenerative diseases», *Brain*, vol. 142, n.º 9, pp. 2558-2571, sep. 2019, doi: 10.1093/brain/awz193.
- [93] A. Galgani *et al.*, «Locus Coeruleus Magnetic Resonance Imaging in Neurological Diseases», *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol. 21, n.º 1, 2021, doi: 10.1007/s11910-020-01087-7.
- [94] L. Xiang, A. Harel, H. Y. Gao, A. E. Pickering, S. J. Sara, y S. I. Wiener, «Behavioral correlates of activity of optogenetically identified locus coeruleus noradrenergic neurons in rats performing T-maze tasks», *Sci Rep*, vol. 9, n.º 1, pp. 1-13, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37227-w.
- [95] M. Kelberman, S. Keilholz, y D. Weinshenker, «What's That (Blue) Spot on my MRI? Multimodal Neuroimaging of the Locus Coeruleus in Neurodegenerative Disease», *Front Neurosci*, vol. 14, p. 1069, 2020, doi: 10.3389/fnins.2020.583421.
- [96] D. Hämmerer *et al.*, «Locus coeruleus integrity in old age is selectively related to memories linked with salient negative events», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, n.º 9, pp. 2228-2233, 2018, doi: 10.1073/pnas.1712268115.
- [97] J. A. Elman *et al.*, «Task-evoked pupil dilation and BOLD variance as indicators of locus coeruleus dysfunction», *Cortex*, vol. 97, pp. 60-69, 2017, doi: 10.1016/j.cortex.2017.09.025.
- [98] C. Naegeli *et al.*, «Locus Coeruleus Activity Mediates Hyperresponsiveness in Posttraumatic Stress Disorder», *Biol Psychiatry*, vol. 83, n.º 3, pp. 254-262, 2018, doi: 10.1016/j.biopsych.2017.08.021.
- [99] M. Zuend *et al.*, «Arousal-induced cortical activity triggers lactate release from astrocytes», *Nat Metab*, vol. 2, n.º 2, pp. 179-191, 2020, doi: 10.1038/s42255-020-0170-4.
- [100] V. Breton-Provencher y M. Sur, «Active control of arousal by a locus coeruleus GABAergic circuit», *Nat Neurosci*, vol. 22, n.º 2, pp. 218-228, 2019, doi: 10.1038/s41593-018-0305-z.
- [101] H. Hayat *et al.*, «Locus coeruleus norepinephrine activity mediates sensory-evoked awakenings from sleep», *Sci Adv*, vol. 6, n.º 15, pp. eaaz4232-eaaz4232, 2020, doi: 10.1126/sciadv.aaz4232.

- [102] J. L. Andreassi, «Pupillary Response and Behavior», en *Psychophysiology: Human Behavior and Physiological Response*, Psychology Press, 2006, pp. 289-304.
- [103] T. Nath, A. Mathis, A. C. Chen, A. Patel, M. Bethge, y M. W. Mathis, «Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors», *bioRxiv*, vol. 14, pp. 2152-2176, 2018, doi: 10.1101/476531.
- [104] W.-L. Ou, T.-L. Kuo, C.-C. Chang, y C.-P. Fan, «Deep-Learning-Based Pupil Center Detection and Tracking Technology for Visible-Light Wearable Gaze Tracking Devices», *Applied Sciences*, vol. 11, n.º 2, p. 851, 2021, doi: 10.3390/app11020851.
- [105] W. Fuhl, T. Santini, G. Kasneci, W. Rosenstiel, y E. Kasneci, «PupilNet v2.0: Convolutional Neural Networks for CPU based real time Robust Pupil Detection», *arXiv preprint*, p. arXiv:1711.00112-arXiv:1711.00112, 2017, [En línea]. Disponible en: <http://arxiv.org/abs/1711.00112>
- [106] F. J. Vera-Olmos, E. Pardo, H. Melero, y N. Malpica, «DeepEye: Deep convolutional network for pupil detection in real environments», *Integr Comput Aided Eng*, vol. 26, n.º 1, pp. 85-95, 2018, doi: 10.3233/ICA-180584.
- [107] Y. H. Yiu *et al.*, «DeepVOG: Open-source pupil segmentation and gaze estimation in neuroscience using deep learning», *J Neurosci Methods*, vol. 324, p. 108307, 2019, doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.05.016.
- [108] K. Il Lee, J. H. Jeon, y B. C. Song, «Deep Learning-Based Pupil Center Detection for Fast and Accurate Eye Tracking System», en *Lecture Notes in Computer Science*, Springer, 2020, pp. 36-52. doi: 10.1007/978-3-030-58529-7_3.
- [109] A. Büki, G. Kalmár, G. Kekesi, G. Benedek, L. G. Nyúl, y G. Horvath, «Impaired pupillary control in “schizophrenia-like” WISKET rats», *Autonomic Neuroscience*, vol. 213, pp. 34-42, 2018, doi: 10.1016/J.AUTNEU.2018.05.007.
- [110] A. Lara-Doña, S. Torres-Sánchez, D. Sánchez-Morillo, y E. Berrocoso, «Sistema para el reconocimiento automático de los cambios en el tamaño de la pupila en pequeños roedores», en *XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica CASEIB 2020*, Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, 2020, pp. 455-458. [En línea]. Disponible en: http://caseib.es/2020/wp-content/uploads/2020/12/CASEIB2020_LibroActas.pdf
- [111] S. Srinivas, R. K. Sarvadevabhatla, K. R. Mopuri, N. Prabhu, S. S. S. Kruthiventi, y R. V. Babu, «A taxonomy of deep convolutional neural nets for computer vision», *Frontiers Robotics AI*, vol. 2, n.º JAN, p. 36, 2016, doi: 10.3389/frobt.2015.00036.

- [112] F. Sultana, A. Sufian, y P. Dutta, «Evolution of Image Segmentation using Deep Convolutional Neural Network: A Survey», *Knowl Based Syst*, vol. 201-202, p. 106062, 2020, doi: 10.1016/j.knosys.2020.106062.
- [113] Z. Wu, C. Shen, y A. van den Hengel, «Bridging Category-level and Instance-level Semantic Image Segmentation», *arXiv preprint*, p. arXiv:1605.06885-arXiv:1605.06885, 2016, [En línea]. Disponible en: <http://arxiv.org/abs/1605.06885>
- [114] K. He, G. Gkioxari, P. Dollár, y R. Girshick, «Mask R-CNN», *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 42, n.º 2, pp. 386-397, 2020, doi: 10.1109/TPAMI.2018.2844175.
- [115] R. Zhang, Z. Tian, C. Shen, M. You, y Y. Yan, «Mask Encoding for Single Shot Instance Segmentation», en *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, IEEE Computer Society, 2020, pp. 10223-10232. doi: 10.1109/CVPR42600.2020.01024.
- [116] Y. Wang, Z. Xu, H. Shen, B. Cheng, y L. Yang, «CenterMask: Single shot instance segmentation with point representation», en *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, IEEE Computer Society, 2020, pp. 9310-9318. doi: 10.1109/CVPR42600.2020.00933.
- [117] D. Bolya, C. Zhou, F. Xiao, y Y. J. Lee, «YOLACT: Real-time instance segmentation», en *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2019, pp. 9156-9165. doi: 10.1109/ICCV.2019.00925.
- [118] X. Chen, R. Girshick, K. He, y P. Dollar, «TensorMask: A foundation for dense object segmentation», en *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2019, pp. 2061-2069. doi: 10.1109/ICCV.2019.00215.
- [119] S. Zagoruyko *et al.*, «A multipath network for object detection», *British Machine Vision Conference 2016, BMVC 2016*, vol. 2016-Septe, pp. 15.1-15.12, 2016, doi: 10.5244/C.30.15.
- [120] P. O. Pinheiro, R. Collobert, y P. Dollar, «Learning to Segment Object Candidates», *Adv Neural Inf Process Syst*, vol. 2015-Janua, pp. 1990-1998, 2015, [En línea]. Disponible en: <http://arxiv.org/abs/1506.06204>
- [121] X. Wang, R. Zhang, T. Kong, L. Li, y C. Shen, «SOLOv2: Dynamic and Fast Instance Segmentation», *arXiv preprint*, p. arXiv:2104.05970 (2021).-arXiv:2104.05970 (2021)., 2020, [En línea]. Disponible en: <http://arxiv.org/abs/2003.10152>
- [122] K. He, X. Zhang, S. Ren, y J. Sun, «Deep residual learning for image recognition», en *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 2016, pp. 770-778. doi: 10.1109/CVPR.2016.90.

- [123] T.-Y. Lin, P. Dollár, R. Girshick, K. He, B. Hariharan, y S. Belongie, «Feature Pyramid Networks for Object Detection», en *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, IEEE, 2017, pp. 936-944. doi: 10.1109/CVPR.2017.106.
- [124] L.-C. Chen, Y. Zhu, G. Papandreou, F. Schroff, y H. Adam, «Encoder-Decoder with Atrous Separable Convolution for Semantic Image Segmentation», *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, vol. 11211 LNCS, pp. 833-851, 2018, doi: 10.1007/978-3-030-01234-2_49.
- [125] V. Badrinarayanan, A. Kendall, y R. Cipolla, «SegNet: A Deep Convolutional Encoder-Decoder Architecture for Image Segmentation», *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 39, n.º 12, pp. 2481-2495, 2017, doi: 10.1109/TPAMI.2016.2644615.
- [126] F. Chollet, «Xception: Deep Learning With Depthwise Separable Convolutions», 2017.
- [127] M. Sandler, A. Howard, M. Zhu, A. Zhmoginov, y L. C. Chen, «MobileNetV2: Inverted Residuals and Linear Bottlenecks», en *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 2018, pp. 4510-4520. doi: 10.1109/CVPR.2018.00474.
- [128] E. Shelhamer, J. Long, y T. Darrell, «Fully Convolutional Networks for Semantic Segmentation», *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 39, n.º 4, pp. 640-651, 2017, doi: 10.1109/TPAMI.2016.2572683.
- [129] T. Kim y E. C. Lee, «Experimental verification of objective visual fatigue measurement based on accurate pupil detection of infrared eye image and multi-feature analysis», *Sensors*, vol. 20, n.º 17, pp. 1-12, 2020, doi: 10.3390/s20174814.
- [130] T.-Y. Lin, P. Goyal, R. Girshick, K. He, y P. Dollár, «Focal Loss for Dense Object Detection», *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 42, n.º 2, pp. 318-327, 2017, doi: 10.1109/TPAMI.2018.2858826.
- [131] X. Wang, T. Kong, C. Shen, Y. Jiang, y L. Li, «SOLO: Segmenting Objects by Locations», en *Lecture Notes in Computer Science*, vol. 12363, Springer, 2020, pp. 649-665. doi: 10.1007/978-3-030-58523-5_38.
- [132] J. Martin Bland y D. G. Altman, «Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical Measurement», *The Lancet*, vol. 327, n.º 8476, pp. 307-310, 1986, doi: 10.1016/S0140-6736(86)90837-8.
- [133] G. Borges *et al.*, «Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK 1/2) in the Locus Coeruleus Contributes to Pain-Related Anxiety in Arthritic Male Rats», *International Journal of Neuropsychopharmacology*, vol. 20, n.º 6, pp. 463-475, 2017, doi: 10.1093/ijnp/pyx005.
- [134] IDS Imaging Development Systems GmbH, «pyueye · PyPI». Accedido: 3 de junio de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://pypi.org/project/pyueye/>

- [135] G. Kalmár, A. Büki, G. Kékesi, G. Horváth, y L. G. Nyúl, «Automating, analyzing and improving pupillometry with machine learning algorithms», *Acta Cybernetica*, vol. 24, n.º 2, pp. 197-209, 2019, doi: 10.14232/ACTACYB.24.2.2019.3.
- [136] M. Privitera *et al.*, «Noradrenaline release from the locus coeruleus shapes stress-induced hippocampal gene expression», *Elife*, vol. 12, mar. 2024, doi: 10.7554/ELIFE.88559.
- [137] T. T. Dang-Vu, S. M. McKinney, O. M. Buxton, J. M. Solet, y J. M. Ellenbogen, «Spontaneous brain rhythms predict sleep stability in the face of noise», *Curr Biol*, vol. 20, n.º 15, ago. 2010, doi: 10.1016/J.CUB.2010.06.032.
- [138] M. S. Gilzenrat, S. Nieuwenhuis, M. Jepma, y J. D. Cohen, «Pupil diameter tracks changes in control state predicted by the adaptive gain theory of locus coeruleus function», *Cogn Affect Behav Neurosci*, vol. 10, n.º 2, pp. 252-269, 2010, doi: 10.3758/CABN.10.2.252.
- [139] K. Deisseroth, «Optogenetics», *Nat Methods*, vol. 8, n.º 1, pp. 26-29, ene. 2011, doi: 10.1038/NMETH.F.324.
- [140] K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenböck, A. Ting, y M. J. Schnitzer, «Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits», *Journal of Neuroscience*, vol. 26, n.º 41, pp. 10380-10386, oct. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006.
- [141] O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, y K. Deisseroth, «Optogenetics in neural systems», *Neuron*, vol. 71, n.º 1, pp. 9-34, jul. 2011, doi: 10.1016/J.NEURON.2011.06.004.
- [142] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, y K. Deisseroth, «Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity», *Nat Neurosci*, vol. 8, n.º 9, pp. 1263-1268, 2005, doi: 10.1038/NN1525.
- [143] I. Suárez-Pereira, M. Llorca-Torralba, L. Bravo, C. Camarena-Delgado, C. Soriano-Mas, y E. Berrocoso, «The Role of the Locus Coeruleus in Pain and Associated Stress-Related Disorders», 1 de mayo de 2022, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.biopsycho.2021.11.023.
- [144] A. Minetti, «Unlocking the potential of adeno-associated virus in neuroscience: a brief review», *Mol Biol Rep*, vol. 51, n.º 1, dic. 2024, doi: 10.1007/S11033-024-09521-6.
- [145] Mightex, «Optogenetic Stimulation: The Ultimate Guide». Accedido: 10 de diciembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.mightexbio.com/optogenetic-stimulation/>
- [146] DAYY Photonics, «DAYY Photonics | Lasers vs. Light Emitting Diodes (LEDs) vs....». Accedido: 10 de diciembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://dayyphotonics.com/knowledgebase/lasers-vs-light-emitting-diodes-leds-vs-superluminescent-diodes-sleds>

- [147] G. Aston-Jones y J. D. Cohen, «An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: Adaptive gain and optimal performance», *Annu Rev Neurosci*, vol. 28, pp. 403-450, 2005, doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135709.
- [148] E. M. Vazey, D. E. Moorman, y G. Aston-Jones, «Phasic locus coeruleus activity regulates cortical encoding of salience information», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, n.º 40, pp. E9439-E9448, oct. 2018, doi: 10.1073/pnas.1803716115.
- [149] J. Rajkowski, H. Majczynski, E. Clayton, y G. Aston-Jones, «Activation of Monkey Locus Coeruleus Neurons Varies With Difficulty and Performance in a Target Detection Task», *J Neurophysiol*, vol. 92, n.º 1, pp. 361-371, jul. 2004, doi: 10.1152/jn.00673.2003.
- [150] S. M. Florin-Lechner, J. P. Druhan, G. Aston-Jones, y R. J. Valentino, «Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus», *Brain Res*, vol. 742, n.º 1-2, pp. 89-97, dic. 1996, doi: 10.1016/S0006-8993(96)00967-5.
- [151] M. E. Carter *et al.*, «Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons», *Nat Neurosci*, vol. 13, n.º 12, pp. 1526-1535, dic. 2010, doi: 10.1038/NN.2682.
- [152] J. G. McCall *et al.*, «Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior», *Elife*, vol. 6, jul. 2017, doi: 10.7554/ELIFE.18247.
- [153] C. W. Harley y Q. Yuan, «Locus Coeruleus Optogenetic Modulation: Lessons Learned from Temporal Patterns», *Brain Sciences 2021, Vol. 11, Page 1624*, vol. 11, n.º 12, p. 1624, dic. 2021, doi: 10.3390/BRAINSCI11121624.
- [154] A. R. O. Martins y R. C. Froemke, «Coordinated forms of noradrenergic plasticity in the locus coeruleus and primary auditory cortex», *Nat Neurosci*, vol. 18, n.º 10, pp. 1483-1492, oct. 2015, doi: 10.1038/NN.4090.
- [155] E. Weiss, Y. (Andy) Liu, y Q. Wang, «Optogenetic Locus Coeruleus Stimulation Improves Pupil Size Tracking of Cortical State», *bioRxiv*, p. 2024.02.02.578675, ene. 2024, doi: 10.1101/2024.02.02.578675.
- [156] G. Paxinos y K. B. J. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.*, vol. 2nd Editio. Elsevier, 2001. Accedido: 1 de enero de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates-compact/franklin/978-0-12-816159-3>
- [157] Prizmatix, «Pulser Plus User Manual». Accedido: 2 de junio de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.prizmatix.com/Optogenetics/PulserPlus.htm>

- [158] A. Lara-Doña, S. Torres-Sánchez, E. Berrocoso, y D. Sánchez-Morillo, «Sistema integral de pupilometría binocular para roedores», en *XL Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica CASEIB 2022*, 2022, pp. 130-33.
- [159] «Fiber Coupled LEDs for Optogenetics Experiments in Freely Moving Mammals». Accedido: 15 de diciembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.prizmatix.com/Optogenetics/Optogenetics-Fiber-Coupled-LEDs.aspx>
- [160] M. E. Kret y E. E. Sjak-Shie, «Preprocessing pupil size data: Guidelines and code», *Behav Res Methods*, vol. 51, n.º 3, pp. 1336-1342, 2019, doi: 10.3758/s13428-018-1075-y.
- [161] A. Savitzky y M. J. E. Golay, «Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures», *Anal Chem*, vol. 36, n.º 8, pp. 1627-1639, jul. 1964, doi: 10.1021/AC60214A047/ASSET/AC60214A047.FP.PNG_V03.
- [162] K. Ogata, *Ingeniería de control moderna*. Mexico [etc.]: Prentice Hall Hispanoamericana, 1986. doi: 10.1109/ICET.2009.5353146.
- [163] F. R. Adler, «Dynamic Models in Biology, Stephen P. Ellner, John Guckenheimer. Princeton University Press (2006). 352 pp., ISBN: 0691125899 (paper, GBP 29,95)», 2007, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.mbs.2007.03.004.
- [164] J. Cunningham y T. Szabo, *Modeling and Control of Dynamic Systems (2nd ed.)*, n.º 4. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. doi: 10.1002/acs.871.
- [165] J. Cohen, «Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences Second Edition», 1988.
- [166] D. J. Sheskin, B. Raton, L. New, y Y. Washington, «PARAMETRIC and NONPARAMETRIC STATISTICAL PROCEDURES SECOND EDITION», 2000. [En línea]. Disponible en: www.crcpress.com
- [167] R. Kirk, «Kirk, Roger E. (2013). Experimental design: Procedures for the behavioral sciences (4th ed.). Thousand Oaks, CA: Sage.», 2013.
- [168] C. Grimm *et al.*, «Tonic and burst-like locus coeruleus stimulation distinctly shift network activity across the cortical hierarchy», *Nature Neuroscience* 2024 27:11, vol. 27, n.º 11, pp. 2167-2177, sep. 2024, doi: 10.1038/s41593-024-01755-8.
- [169] P. Mariscal *et al.*, «Sexual differences in locus coeruleus neurons and related behavior in C57BL/6J mice», *Biol Sex Differ*, vol. 14, n.º 1, dic. 2023, doi: 10.1186/S13293-023-00550-7.
- [170] R. J. Valentino y E. Van Bockstaele, «Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress», *Eur J Pharmacol*, vol. 583, n.º 2-3, pp. 194-203, abr. 2008, doi: 10.1016/J.EJPBAR.2007.11.062.

- [171] R. J. Valentino y E. Van Bockstaele, «Opposing regulation of the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor and opioids. Potential for reciprocal interactions between stress and opioid sensitivity», *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 158, n.º 4, pp. 331-342, 2001, doi: 10.1007/S002130000673.
- [172] H. M. Guajardo, K. Snyder, A. Ho, y R. J. Valentino, «Sex Differences in μ -Opioid Receptor Regulation of the Rat Locus Coeruleus and Their Cognitive Consequences», *Neuropsychopharmacology* 2017 42:6, vol. 42, n.º 6, pp. 1295-1304, nov. 2016, doi: 10.1038/npp.2016.252.
- [173] R. J. Valentino y E. Van Bockstaele, «Endogenous opioids: The downside of opposing stress», *Neurobiol Stress*, vol. 1, n.º 1, pp. 23-32, ene. 2015, doi: 10.1016/J.YNSTR.2014.09.006.
- [174] A. L. Curtis, N. T. Bello, y R. J. Valentino, «Evidence for Functional Release of Endogenous Opioids in the Locus Ceruleus during Stress Termination», *Journal of Neuroscience*, vol. 21, n.º 13, pp. RC152-RC152, jul. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-J0001.2001.
- [175] N. Grujic, R. Polania, y D. Burdakov, «Neurobehavioral meaning of pupil size», *Neuron*, vol. 112, n.º 20, pp. 3381-3395, oct. 2024, doi: 10.1016/J.NEURON.2024.05.029.
- [176] K. L. Turner, K. W. Gheres, y P. J. Drew, «Relating Pupil Diameter and Blinking to Cortical Activity and Hemodynamics across Arousal States», *Journal of Neuroscience*, vol. 43, n.º 6, pp. 949-964, feb. 2023, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1244-22.2022.
- [177] J. Korf, G. K. Aghajanian, y R. H. Roth, «Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of the locus coeruleus», *Neuropharmacology*, vol. 12, n.º 10, pp. 933-938, 1973, doi: 10.1016/0028-3908(73)90024-5.
- [178] G. N. Smagin, A. H. Swiergiel, y A. J. Dunn, «Corticotropin-releasing factor administered into the locus coeruleus, but not the parabrachial nucleus, stimulates norepinephrine release in the prefrontal cortex», *Brain Res Bull*, vol. 36, n.º 1, pp. 71-76, ene. 1995, doi: 10.1016/0361-9230(94)00166-X.
- [179] E. D. Abercrombie, R. W. Keller, y M. J. Zigmond, «Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: Pharmacological and behavioral studies», *Neuroscience*, vol. 27, n.º 3, pp. 897-904, dic. 1988, doi: 10.1016/0306-4522(88)90192-3.
- [180] E. D. Abercrombie y B. L. Jacobs, «Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli», *J Neurosci*, vol. 7, n.º 9, pp. 2844-2848, 1987, doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-09-02844.1987.

- [181] S. C. Heinrichs, E. M. Pich, K. A. Miczek, K. T. Britton, y G. F. Koob, «Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action», *Brain Res*, vol. 581, n.º 2, pp. 190-197, may 1992, doi: 10.1016/0006-8993(92)90708-H.
- [182] A. L. Curtis, S. C. Leiser, K. Snyder, y R. J. Valentino, «Predator stress engages corticotropin-releasing factor and opioid systems to alter the operating mode of locus coeruleus norepinephrine neurons», *Neuropharmacology*, vol. 62, n.º 4, pp. 1737-1745, mar. 2012, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.020.
- [183] H. Wang, H. K. Ortega, H. Atilgan, C. E. Murphy, y A. C. Kwan, «Pupil Correlates of Decision Variables in Mice Playing a Competitive Mixed-Strategy Game», *eNeuro*, vol. 9, n.º 2, mar. 2022, doi: 10.1523/ENEURO.0457-21.2022.
- [184] M. Altemus, N. Sarvaiya, y C. Neill Epperson, «Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives», *Front Neuroendocrinol*, vol. 35, n.º 3, pp. 320-330, 2014, doi: 10.1016/J.YFRNE.2014.05.004.
- [185] M. Olff, «Sex and gender differences in post-traumatic stress disorder: an update», *Eur J Psychotraumatol*, vol. 8, n.º sup4, p. 1351204, sep. 2017, doi: 10.1080/20008198.2017.1351204.
- [186] J. S. Mogil, «Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon», *Nat Rev Neurosci*, vol. 13, n.º 12, pp. 859-866, dic. 2012, doi: 10.1038/NRN3360.
- [187] L. A. McWilliams, B. J. Cox, y M. W. Enns, «Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: An examination in a nationally representative sample», *Pain*, vol. 106, n.º 1-2, pp. 127-133, 2003, doi: 10.1016/S0304-3959(03)00301-4.
- [188] A. Tsang *et al.*, «Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders», *J Pain*, vol. 9, n.º 10, pp. 883-891, 2008, doi: 10.1016/J.JPAIN.2008.05.005.
- [189] G. Aston-Jones, J. Rajkowski, y J. B. T.-P. in B. R. Cohen, «Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention», en *Cognition, emotion and autonomic responses: The integrative role of the prefrontal cortex and limbic structures*, vol. 126, Elsevier, 2000, pp. 165-182. doi: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26013-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26013-5).
- [190] C. W. Berridge y B. D. Waterhouse, «The locus coeruleus-noradrenergic system: Modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes», 2003. doi: 10.1016/S0165-0173(03)00143-7.
- [191] S. J. Sara, «The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition», 4 de marzo de 2009, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrn2573.

- [192] I. E. Loewenfeld, «Mechanisms of reflex dilatation of the pupil - Historical review and experimental analysis», *Documenta Ophthalmologica*, vol. 12, n.º 1, pp. 185-448, dic. 1958, doi: 10.1007/BF00913471/METRICS.
- [193] J. C. Eisenach, R. Curry, C. A. Aschenbrenner, R. C. Coghill, y T. T. Houle, «Pupil responses and pain ratings to heat stimuli: Reliability and effects of expectations and a conditioning pain stimulus», *J Neurosci Methods*, vol. 279, pp. 52-59, mar. 2017, doi: 10.1016/J.JNEUMETH.2017.01.005.
- [194] D. J. Cullen *et al.*, «Clinical signs of anesthesia.», *Anesthesiology*, vol. 36, n.º 1, pp. 21-36, ene. 1972, doi: 10.1097/00000542-197201000-00005.
- [195] E. Szabadi, «Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus», *Front Integr Neurosci*, vol. 6, n.º SEPTEMBER, sep. 2012, doi: 10.3389/FNINT.2012.00094.
- [196] E. C. Emery, G. T. Young, E. M. Berrocoso, L. Chen, y P. A. McNaughton, «HCN2 Ion Channels Play a Central Role in Inflammatory and Neuropathic Pain», *Science (1979)*, vol. 333, n.º 6048, pp. 1462-1466, sep. 2011, doi: 10.1126/science.1206243.
- [197] S. Nobukawa *et al.*, «Pupillometric Complexity and Symmetricity Follow Inverted-U Curves Against Baseline Diameter Due to Crossed Locus Coeruleus Projections to the Edinger-Westphal Nucleus», *Front Physiol*, vol. 12, p. 614479, feb. 2021, doi: 10.3389/FPHYS.2021.614479/BIBTEX.
- [198] W. D. Poynter, «Pupil-size asymmetry is a physiologic trait related to gender, attentional function, and personality», *Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition*, vol. 22, n.º 6, pp. 654-670, nov. 2017, doi: 10.1080/1357650X.2016.1268147.
- [199] D. A. Bangasser, K. R. Wiersielis, y S. Khantsis, «Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress», *Brain Res*, vol. 1641, pp. 177-188, jun. 2016, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2015.11.021.
- [200] A. Viglione, R. Mazziotti, y T. Pizzorusso, «From pupil to the brain: New insights for studying cortical plasticity through pupillometry», *Front Neural Circuits*, vol. 17, 2023, doi: 10.3389/FNCIR.2023.1151847.
- [201] A. D. Legatt, J. Arezzo, y H. G. Vaughan, «Averaged multiple unit activity as an estimate of phasic changes in local neuronal activity: effects of volume-conducted potentials», *J Neurosci Methods*, vol. 2, n.º 2, pp. 203-217, abr. 1980, doi: 10.1016/0165-0270(80)90061-8.
- [202] L. Kargieman, N. Santana, G. Mengod, P. Celada, y F. Artigas, «Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n.º 37, pp. 14843-14848, sep. 2007, doi: 10.1073/PNAS.0704848104/SUPPL_FILE/04848FIG7.JPG.
- [203] X. F. Ding *et al.*, «A novel low-cost electrode for recording the local field potential of freely moving rat's brain», *Transl Neurosci*, vol. 11, n.º 1, p. 96, ene. 2020, doi: 10.1515/TNSCI-2020-0104.

- [204] K. E. Furth, A. J. McCoy, C. Dodge, J. R. Walters, A. Buonanno, y C. Delaville, «Neuronal correlates of ketamine and walking induced gamma oscillations in the medial prefrontal cortex and mediodorsal thalamus», *PLoS One*, vol. 12, n.º 11, p. e0186732, nov. 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0186732.
- [205] M. Kogan, M. McGuire, y J. Riley, «Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease», *Neurosurg Clin N Am*, vol. 30, n.º 2, pp. 137-146, abr. 2019, doi: 10.1016/J.NEC.2019.01.001.
- [206] G. Aston-Jones y F. E. Bloom, «Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle», *The Journal of Neuroscience*, vol. 1, n.º 8, p. 876, 1981, doi: 10.1523/JNEUROSCI.01-08-00876.1981.
- [207] M. Ishimatsu y J. T. Williams, «Synchronous Activity in Locus Coeruleus Results from Dendritic Interactions in Pericoerulear Regions», *The Journal of Neuroscience*, vol. 16, n.º 16, p. 5196, ago. 1996, doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-16-05196.1996.
- [208] G. Aston-Jones y F. E. Bloom, «Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli», *Journal of Neuroscience*, vol. 1, n.º 8, pp. 887-900, 1981, doi: 10.1523/jneurosci.01-08-00887.1981.
- [209] Y. N. Chen, J. K. Kostka, S. H. Bitzenhofer, y I. L. Hanganu-Opatz, «Olfactory bulb activity shapes the development of entorhinal-hippocampal coupling and associated cognitive abilities», *Current Biology*, vol. 33, n.º 20, pp. 4353-4366.e5, oct. 2023, doi: 10.1016/J.CUB.2023.08.072.
- [210] D. J. Thomson, «Spectrum Estimation and Harmonic Analysis», *Proceedings of the IEEE*, vol. 70, n.º 9, pp. 1055-1096, 1982, doi: 10.1109/PROC.1982.12433.
- [211] H. Bokil, P. Andrews, J. E. Kulkarni, S. Mehta, y P. P. Mitra, «Chronux: A platform for analyzing neural signals», *J Neurosci Methods*, vol. 192, n.º 1, pp. 146-151, sep. 2010, doi: 10.1016/J.JNEUMETH.2010.06.020.

ANEXOS

ANEXO I. VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA TÉCNICA DE OPTOGENÉTICA

ANEXO I. VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA TÉCNICA DE OPTOGENÉTICA

Al finalizar los experimentos de pupilometría, se comprobó la correcta administración del vector viral de optogenética en el LC izquierdo de los animales como verificación de la expresión de ChR2 en las células del LC. Para ello, los animales fueron perfundidos con paraformaldehído (4%) y se extrajo su cerebro, del cual, la porción que contenía el LC fue seccionada en cortes coronales de 40 μm de grosor mediante un micrótopo de congelación (Microm HM 525, Thermo Scientific). Estas secciones fueron montadas en portas con fluoro-gel, un medio de montaje acuoso especial para fluorescencia. Las imágenes fueron visualizadas en un microscopio Olympus BX60 y adquiridas por la cámara acoplada Olympus DP74.

Finalmente, la verificación histológica consistió en comprobar la correcta expresión del vector viral en el LC en todos los animales, así solamente se incluyeron en este estudio los datos de aquellos los animales en cuyo LC izquierdo se observó fluorescencia verde por la expresión del gen reportero del vector viral de optogenética (**Figura 75**).

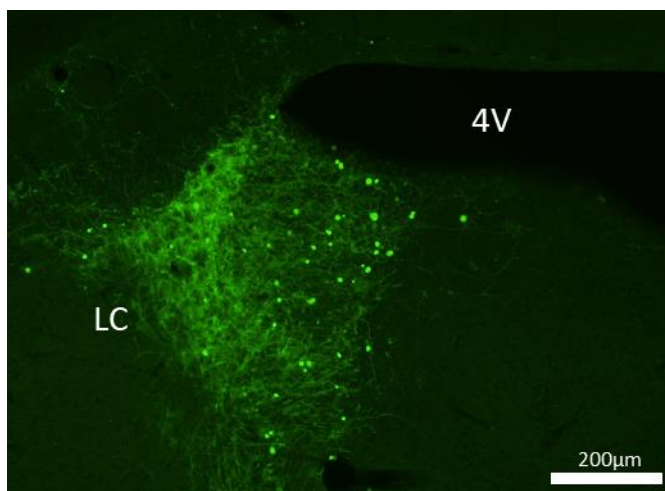


Figura 75. Expresión del vector viral de optogenética en el LC. Imagen representativa de la expresión del gen reportero (fluorescencia verde) del vector viral para optogenética en las células del LC izquierdo de un animal. 4V, cuarto ventrículo; LC, locus coeruleus.

ANEXO II. EVALUACIÓN CONDUCTUAL

ANEXO II. EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Al finalizar los experimentos de pupilometría, se comprobó que los animales CCI presentaran dolor en la pata operada y una conducta de tipo depresiva como consecuencia del dolor neuropático a largo plazo. Para ello, se evaluó el umbral sensorial de los animales CCI tanto machos como hembras mediante la prueba de von Frey. El umbral mecánico para la retirada de la pata se evaluó utilizando un dispositivo von Frey automático (Ugo Basile). Se aplicó una fuerza máxima de 5 g durante una rampa de 10 segundos, tras lo cual la fuerza se mantuvo constante en 5 g durante 30 segundos [196]. El umbral de retirada (gramos) se determinó como el promedio de dos medidas.

Asimismo, la conducta de tipo depresiva se evaluó mediante la prueba de desesperanza conductual denominada prueba de suspensión de la cola (del inglés *tail suspension test*, TST). Esta prueba consistió en suspender a los ratones del extremo distal de la cola utilizando cinta adhesiva y elevados a 20 cm del suelo durante una sesión de 6 minutos. Dicha sesión fue grabada y posteriormente se analizó el tiempo que pasaron inmóviles, definido como colgados de la cola sin mostrar ningún comportamiento activo. Un aumento de esta conducta es indicativo de la presencia de una conducta de tipo depresiva [169].

Los resultados obtenidos en ambas pruebas se muestran en la **Figura 76**.

Los resultados en la prueba de von Frey indican que los animales CCI muestran una reducción significativa del umbral nociceptivo de la pata izquierda (pata operada) tanto en el grupo de machos como en hembras (**Figura 76(a, c)**). Estos datos corroboran que todos los animales CCI presentan dolor en el miembro operado.

Por otro lado, los resultados en la prueba TST muestran que los animales CCI presentan un mayor tiempo de inmovilidad que los animales naïve ya sean machos o hembras (**Figura 76(b, d)**). Estos resultados indican que los animales con CCI, que presentan dolor, a largo plazo también manifiestan una conducta de tipo depresiva.

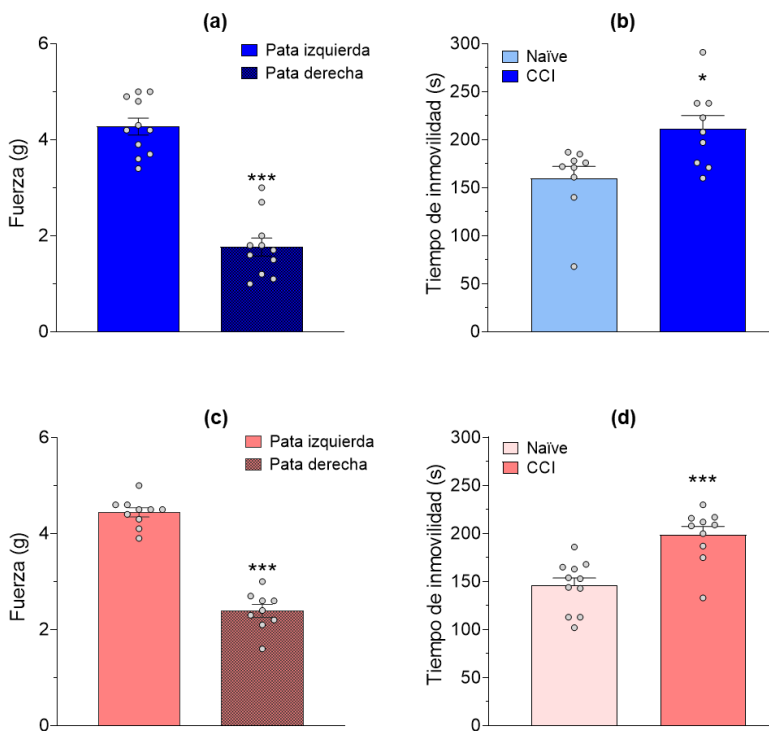


Figura 76. Evaluación nociceptiva y de la conducta de tipo depresiva en machos y hembras. Umbral nociceptivo de las patas derecha e izquierda de los grupos CCI machos (a) y CCI hembras (c) en la prueba de von Frey; tiempo de inmovilidad en la prueba TST para los grupos naïve y CCI machos (b) y naïve y CCI hembras (d). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ T-test no pareado.

ANEXO III. VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL REGISTRO DE LFP EN EL LC

ANEXO III. VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL REGISTRO DE LFP EN EL LC

Al finalizar los experimentos del registro simultáneo de LFP en el LC y el diámetro pupilar, se comprobó la correcta localización del electrodo en el LC derecho e izquierdo de cada animal. Para ello, al finalizar el experimento se extrajo el tejido cerebral, el cual fue sumergido en PFA al 4 % para su fijación. Posteriormente, la porción que contenía el LC fue seccionada en cortes coronales de 40 μm de grosor mediante un criostato (Microm HM 525, Thermo Scientific). Estas secciones fueron recogidas directamente en portas y fueron teñidas con Rojo neutro. Las imágenes fueron visualizadas en un microscopio Olympus BX60 y adquiridas por la cámara acoplada Olympus DP74.

Finalmente, la verificación histológica consistió en comprobar la correcta colocación del electrodo de registro de LFP en el LC para cada uno de los animales (**Figura 77**). Sólo se incluyeron en el estudio los resultados procedentes de aquellos animales en los que se verificó la correcta localización del electrodo de registro en el LC.

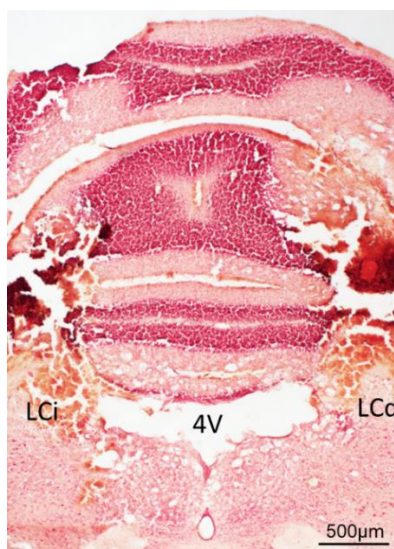


Figura 77. Verificación histológica del registro electrofisiológico en el LC. Imagen representativa de la correcta localización del electrodo de registro en el LC derecho e izquierdo, observándose en un corte coronal el rastro y lesión que dejaron los electrodos durante el registro en el LC derecho (LCd) e izquierdo (LCi) de un animal. 4V, cuarto ventrículo.



UCA

Universidad
de Cádiz