



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DE LA CORTEZA  
VISUAL DE RATONES TIPO AUTISTA (SHANK3) IN VIVO EN  
MODO DE CABEZA FIJA MEDIANTE MICROSCOPIA DE  
EXCITACIÓN DE DOS FOTONES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**CARLOS ALBERTO ORTIZ CRUZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS  
2017**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno

Ortiz  
Cruz  
Carlos Alberto  
62 78 54 33  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310126355

2. Datos del tutor

Dra.  
Yazmín  
Ramiro  
Cortés

3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Tatiana  
Fiordelisio  
Coll

4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Rocío  
Salceda  
Sacanelles

5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Marco Arieli  
Herrera  
Valdez

6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Josué Orlando  
Ramírez  
Jarquín

7. Datos del trabajo escrito

Análisis de la actividad neuronal de la corteza visual de ratones tipo autista  
(SHANK3) *in vivo* en modo de cabeza fija mediante microscopía de excitación  
de dos fotones

51 p  
2017

***A mis padres, en agradecimiento a todo lo que me han dado.***

***A mi hermana y mis hermanos, por sus cuidados, sus enseñanzas y por las aventuras que pasamos juntos.***

***A mis sobrinos, en quienes veo la esperanza necesaria para un mejor futuro.***

*“Todos los hombres desean por naturaleza saber. Así lo indica el amor a los sentidos; pues, al margen de su utilidad, son amados a causa de sí mismos, y el que más de todos, el de la vista. En efecto, no sólo para obrar, sino también cuando no pensamos hacer nada, preferimos la vista, por decirlo así, a todos los otros. Y la causa en que, de los sentidos, éste es el que nos hace conocer más, y nos muestra muchas diferencias.”*

*Aristóteles -Metafísica-*

## **Agradecimientos académicos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la mejor formación académica, por permitirme conocer personas maravillosas y por hacerme crecer como profesional y como persona.

Al jurado que evaluó este trabajo, por su tiempo, sus observaciones y sus comentarios.

A la Doctora Yazmín Ramiro, por brindarme la oportunidad y confianza para formar parte de este proyecto, así como proporcionarme las herramientas teóricas y prácticas necesarias.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla, por toda la ayuda que brindó para la elaboración de este proyecto.

A Mtra. Inês Vaz y al Dr. Bassam Atallah (Champalimaud Foundation), por la orientación que brindaron para la elaboración de las ventanas craneales.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, por su ayuda en la estandarización de los protocolos de genotipificación de los animales transgénicos

A todos mis profesores y profesoras de la Facultad de Ciencias, por todas las enseñanzas y por aumentar mi pasión por la ciencia.

A mis compañeros del laboratorio AL-105: a la biól. Beatriz Gutiérrez, por su ayuda en la genotipificación de los ratones usados en este trabajo, al biól. Gerardo Perera, por su colaboración en el cuidado de la colonia de ratones, y al psic. Emiliano Jiménez, por su ayuda para la realización de experimento y en el análisis de los datos.

A mis compañeros del laboratorio BL-202: al biól. Iván Linares, por su asesoría en la obtención y análisis de las señales de calcio. Al Q.F.B. José Luis Pérez López, al biól. Héctor Alatraste y al Q.F.B. Edgar Díaz, por orientarme en la realización de cirugías, en la perfusión de animales y en la obtención de cortes histológicos. Así como a Argelia, Kathia, Asaí, Rubén, Fabiola y Nisa, quienes me brindaron su ayuda cuando fue necesario.

A Martín García, por sus asesorías en la elaboración de algoritmos para el análisis de datos.

Este trabajo se realizó con apoyo económico de DGAPA, UNAM (PAPIIT IA201915) y de CONACyT (Proyecto 254878).

## **Agradecimientos personales**

A mi familia: mis padres y mis hermanos por todo el apoyo que me han brindado, este éxito es de todos nosotros.

A la Dra. Yazmín por la confianza, sus enseñanzas, su amistad y, sobre todo, por soportarme durante más de dos años y contando...

Al Dr. Fatuel, por la confianza, por sus enseñanzas académicas, técnicas y personales.

A mis amigos de la ENP 9: Citlali Morales, David Baik y Diana Trejo, personas maravillosas y excelentes amigos; y a Fer, parte importante de mi historia.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Hugo, Hilda y Jozimar, por todos los momentos inolvidables que hemos pasado juntos. Así como a Juan Carlos, Arturo (Coyote), Esbaide, Betsy, Gala, Paulina y Priscila, buenos amigos y amigas quienes hicieron de mi paso por la Facultad una grata experiencia.

A mis amigos del AL-105: Betty, Janin, Milo y Gerry, por la confianza, la amistad, la ayuda brindada, los buenos momentos y todas las risas.

A mis amigos del BL-202: a Iván, por la confianza y la empatía, a JL por su honestidad, la confianza, las recomendaciones literarias y los consejos, a Edgar, por su ayuda dentro y fuera del laboratorio, a Héctor, por la retroalimentación en ámbitos académicos y personales, a Argelia, por las pláticas llenas de risas y por su confianza, a Kathia, por salvarme la vida en más de una ocasión, a Nisa por su amistad, su sinceridad y por motivarme e inspirarme a mejorar en muchos aspectos, a Asaí, por las buenas charlas y los consejos, a Rubén y Fabiola, que en el poco tiempo que he pasado con ellos, han mostrado ser grandes personas y buenos amigos. A todos ellos, por hacer mi estancia en el IFC de lo más placentera.

A Martín y Mariana, por la amistad y la ayuda que me han brindado, académica y personalmente.

## Contenido

Abreviaturas .....	2
Resumen.....	3
1. Introducción .....	4
1.1 Trastorno de espectro autista .....	4
1.2 Alteraciones de la actividad neuronal en pacientes con trastorno de espectro autista.....	5
1.3 Síndrome de Phelan-McDermid y SHANK3 .....	6
1.4 Modelo genético para el estudio del trastorno del espectro autista .....	8
1.5 Corteza visual primaria en ratones .....	10
1.6 Sensores de calcio genéticamente codificados para el estudio de la actividad neuronal .....	12
2. Planteamiento del problema .....	14
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivo General .....	15
4.1 Objetivos particulares .....	15
5. Materiales y métodos .....	16
5.1 Animales.....	16
5.2 Cirugías estereotáxicas para la elaboración de ventanas craneales, inyecciones virales y acondicionamiento al sistema Head-fixed .....	17
5.3 Recuperación post-quirúrgica, manipulación y habituación.....	19
5.4 Estímulos visuales.....	20
5.5 Microscopia de excitación de dos fotones in vivo .....	21
5.6 Histología.....	23
5.7 Procesamiento de imágenes y análisis de datos.....	24
5.7.1 Extracción de la señal de calcio intracelular .....	24
5.7.2 Selección de neuronas con actividad modulada por los estímulos visuales.....	26
5.7.3 Selección de neuronas selectivas .....	26
5.7.4 Evaluación de selectividad de las neuronas a la orientación y a la dirección de movimiento de los estímulos. ....	27
5.8 Estadística.....	28
6. Resultados .....	30
7. Discusión .....	42
8. Conclusión .....	47
Bibliografía .....	48

## **Abreviaturas**

TEA: Trastorno de espectro autista

PMD: Síndrome de Phelan-McDermid

OMS: Organización Mundial de la Salud

SHANK3: *SH3 and multiple ankyrin domains 3*

V1: Corteza visual primaria

CSc: Colículo superior contralateral

NGLd: Núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo

cpEGFP: Proteína verde fluorescente permutada circular

CaM: Proteína Calmodulina

## Resumen

El trastorno de espectro autista (TEA) está caracterizado por deficiencias en la comunicación verbal y no verbal, deficiencias en interacción social y conductas repetitivas o estereotipadas. Existe un componente genético causante del TEA, y se sabe que muchas de las mutaciones ocurren en genes asociados a la estructura y la función sináptica, por lo que a algunos trastornos se les ha denominado *sinaptopatías*. Un ejemplo de una sinaptopatía es el Síndrome de Phelan-McDermid, un trastorno de espectro autista caracterizado por hipotonía muscular neonatal, retraso o ausencia del desarrollo del habla y discapacidad intelectual. Este síndrome es causado por la delección del gen *Shank3* en un solo alelo. *Shank3* codifica para la proteína del mismo nombre (SHANK3), que se localiza en la densidad post-sináptica de las sinapsis glutamatérgicas y actúa como proteína de anclaje que interacciona con receptores inotrópicos y metabotrópicos de glutamato.

En humanos con TEA se han reportado alteraciones en la actividad neuronal y su sincronización en diversas áreas corticales, un aumento de actividad en regiones cerebrales relacionadas al procesamiento visual, así como alteraciones en la interconectividad neuronal, sin embargo, se desconocen los mecanismos neuronales. Por este motivo, en este proyecto nos planteamos la siguiente pregunta, ¿existe en el autismo una alteración de la actividad neuronal debido a la haploinsuficiencia del gen *Shank3*?

Para responder esta interrogante, evaluamos la actividad neuronal de la capa 2/3 de la corteza visual primaria (V1) en ratones tipo silvestre y ratones con haploinsuficiencia del gen *Shank3* (tipo autista) mientras están despiertos. La actividad se evaluó en respuesta a distintos estímulos visuales, considerando que las neuronas de V1 responden al contraste, orientación y movimientos de los estímulos. La actividad neuronal se registró mediante imagenología de calcio con GCaMP6f a través de ventanas craneales usando microscopía de excitación de dos fotones, en animales despiertos en modo de cabeza fija.

Encontramos que en ratones heterocigotos de *Shank3* hay menor actividad neuronal a nivel poblacional en comparación con ratones silvestres. Sin embargo, existe una mayor proporción de neuronas moduladas en respuesta a la estimulación visual, las cuales no presentan preferencia por algún estímulo en particular. De manera muy interesante, encontramos que las neuronas de ratones heterocigotos presentan una mayor selectividad a la orientación de los estímulos en comparación a los ratones silvestres. Por el contrario, no encontramos diferencias en la selectividad a la dirección. Esto sugiere que, en los ratones heterocigotos, existe una alteración a nivel de procesamiento neuronal en la vía “bottom-up” de corteza visual, que es la responsable de codificar la selectividad a la orientación, y que probablemente el sistema sensorial en este modelo se mantenga sin alteraciones, dado que no se observaron diferencias en la selectividad a la dirección, la cual está dada por las células ganglionares de retina.

## 1. Introducción

### 1.1 Trastorno de espectro autista

El trastorno de espectro autista (TEA), como su nombre lo indica, comprende varios trastornos que en conjunto comparten tres características comunes: deficiencias en la comunicación, deficiencias en interacción social y conductas repetitivas o estereotipadas. Estos síntomas raramente se presentan solos, usualmente existe una comorbilidad con otras condiciones médicas o psiquiátricas como discapacidad intelectual, epilepsias, dificultades en el control motor, ansiedad, trastorno por déficit de atención por hiperactividad, desordenes del sueño, problemas gastrointestinales, entre otros (Bourgeron, et al., 2015; Schroeder, et al., 2017). Actualmente se considera que el TEA es un desorden común, ya que se estima que la prevalencia global es de 1 en 160 niños de acuerdo al último reporte de la OMS (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/autism-spectrum-disorders/en/> consultado el 19 de mayo de 2017).

Las causas de TEA no se conocen con claridad, sin embargo, se ha demostrado que existen factores genéticos implicados de forma importante, pues, se calcula que la heredabilidad, es decir, las variaciones fenotípicas debidas a factores genéticos, en el autismo es aproximadamente del 52% (Gaugler et al., 2014). Las alteraciones genéticas reportadas en el autismo son de distinto tipo, por ejemplo, rearreglos cromosómico, variación en el número de copias, deleciones cortas o variantes en nucleótidos; así mismo, se han detectado mutaciones comunes, raras y *de novo*, que contribuyen al aumento en el riesgo de presentar TEA (Bourgeron, et al., 2015). Algunos de los genes implicados en el TEA están asociados a la estructura, al

desarrollo y a la función sináptica, razón por la que actualmente a algunos síndromes de espectro autista se les denomina “sinaptopatías” (Zoghbi & Bear, 2012).

## **1.2 Alteraciones de la actividad neuronal en pacientes con trastorno de espectro autista**

El autismo ha sido descrito como un trastorno general del procesamiento neuronal (Belmonte et al., 2004). Al respecto, avances en la imagenología funcional por resonancia magnética han permitido determinar la existencia de alteraciones de la actividad neuronal ligadas a diversos trastornos neurológicos, uno de ellos, el autismo. Se ha reportado que en pacientes con TEA existen alteraciones en la actividad neuronal y en su sincronización inter-hemisférica en diferentes regiones corticales lo cual no ocurre en pacientes control (Dinstein et al., 2012).

Además, en individuos autistas también se ha reportado un incremento de la actividad neuronal en regiones cerebrales relacionadas con la integración visual en comparación con individuos no autistas (Samson et al., 2012; Keehn et al., 2008; Lee et al., 2007). Además presentan una atención visual atípica a través de múltiples niveles y categorías de objetos (Wang et al., 2015). Estos reportes sugieren que en el trastorno de espectro autista existe alteraciones de la actividad neuronal, siendo la percepción visual una de las más estudiadas. Sin embargo, se desconocen las causas que conllevan a estas alteraciones que a su vez influyen en las afecciones neurológicas de las personas con autismo.

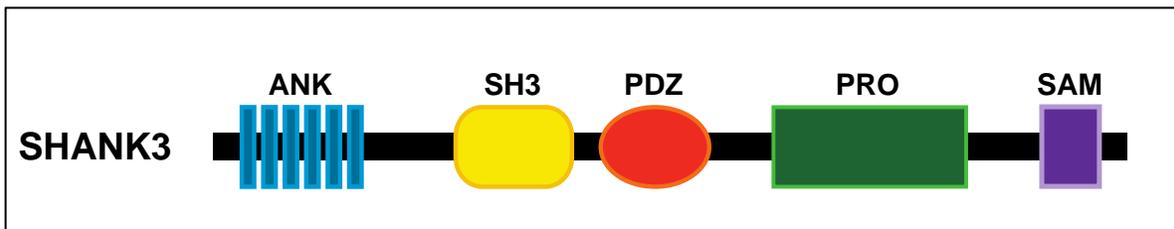
### 1.3 Síndrome de Phelan-McDermid y SHANK3

El síndrome de Phelan-McDermid (PMS, por sus siglas en inglés), es un ejemplo de sinaptopatía y, por su sintomatología, es considerado un trastorno del espectro autista. Se caracteriza por hipotonía muscular neonatal, discapacidad intelectual en distintos grados, de severa a moderada, retraso o ausencia del habla, además de los síntomas característicos del autismo (Peça et al., 2011; Wilson et al., 2003). Este trastorno es causado por una deleción en el cromosoma 22 del brazo q13.3, lo cual conlleva a la deleción de cerca 90 genes. Sin embargo, la condición neurológica de PMS es atribuida a la deleción en uno de alelos del gen *Shank3* (Peça et al., 2011), pues en todos los pacientes diagnosticados con PMS se ha detectado esta mutación. Es decir, la deleción de *Shank3* es común en todos los pacientes con PMS, independiente del tamaño de la deleción en el cromosoma 22 (Wilson et al., 2003).

El gen *Shank3* codifica para la proteína del mismo nombre, SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin domains 3*), la cual pertenece a la familia de las proteínas SHANK. SHANK3 es una proteína de anclaje de la densidad postsináptica de sinapsis glutamatérgicas, que interactúa de forma directa o indirecta con receptores de glutamato. El gen *Shank3* presenta múltiples exones, producto de corte y empalme (*splicing*) alternativo resultando en la posible generación de diversas isoformas de la proteína SHANK3 (Monteiro & Feng, 2017; Sheng & Kim, 2000).

La proteína SHANK3 tiene dominios de unión a proteínas desde su región N-terminal hasta la región C-terminal: dominio repetido de ankirina (**ANK**) al que se unen las proteínas Sharpina y  $\alpha$ -fodrina; un dominio **SH3** que interactúa

directamente con AMPA; un dominio **PDZ** que se une a las proteínas SAPAP/GKAP1 y GRIP los cuales se unen a PSD95 y, a su vez, a los receptores NMDA y AMPA respectivamente; una región rica en prolina (**PRO**) que se une a Homer y esta a su vez se une a mGluR; finalmente, presenta un motivo alfa estéril (**SAM**) el cual tiene como función multimerizar a SHANK (Sheng & Kim, 2000; Monteiro & Feng, 2017) (Fig. 1).



**Figura 1. Dominios de la proteína SHANK3.** Representación esquemática de los dominios de unión proteína-proteína de SHANK3. ANK: dominio repetido de ankirina, SH3: Src homólogo 3, PDZ: discos PSD95 zona larga occludens 1, PRO: región rica en prolinas, SAM: motivo alfa estéril. Tiene una masa molecular > 200kDa. Modificado de Costales y Kalevzon, 2015.

SHANK3 se expresa en grandes cantidades en corazón, y de forma moderada en cerebro y bazo. En el cerebro se expresa en corteza, tálamo, estriado, hipocampo, cerebelo y amígdala (Lim et al., 1999; Wang et al., 2014). Sin embargo, las diferentes isoformas de SHANK3 se expresan de forma diferencial dependiendo del desarrollo, el tipo celular y la región del cerebro (Wang et al., 2014; Lee et al., 2015), sugiriendo que las diferentes isoformas poseen funciones específicas.

La expresión de SHANK3 es alta en la densidad post-sináptica de sinapsis glutamatérgicas, específicamente en la zona citoplasmática. Las diferentes isoformas también presentan localización sub-celular diferencial, algunas presentes en núcleo (isoformas que carecen de los dominios PRO y SAM) mientras que la mayoría están presentes en el citoplasma (Monteiro & Feng, 2017). SHANK3 tiene

la función de formar el complejo PSD a través del reclutamiento de diferentes proteínas, además de ser parte del sistema de señalización entre receptores y el citoesqueleto (Monteiro & Feng, 2017). Esta información muestra la relevancia funcional de SHANK3 en las sinapsis glutamatérgicas.

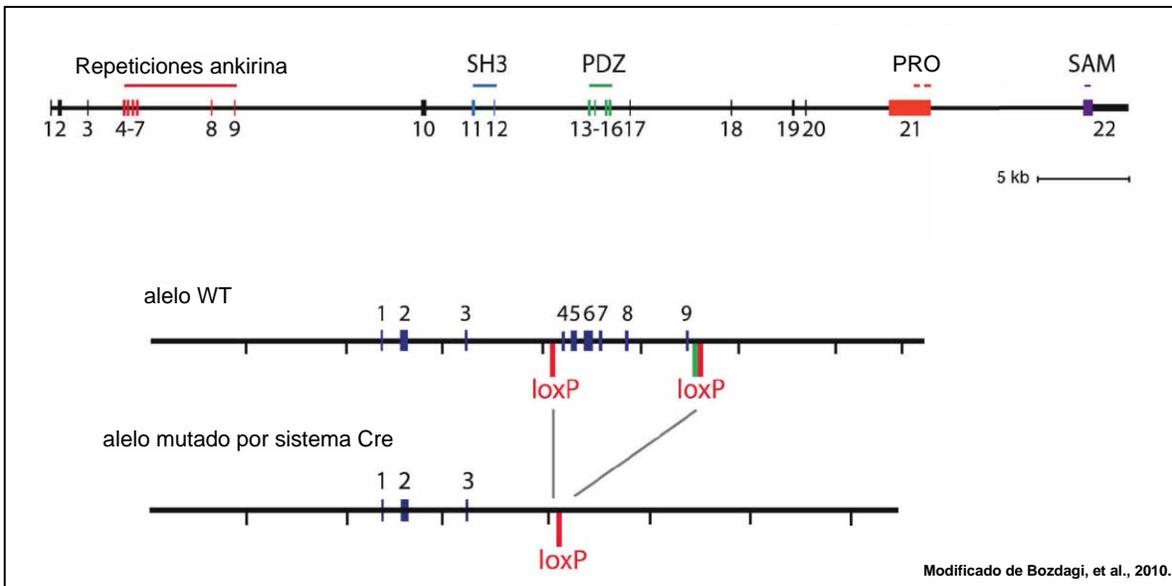
#### **1.4 Modelo genético para el estudio del trastorno del espectro autista**

En humanos, *Shank3* es uno de los genes mejor caracterizados implicados en el trastorno del espectro autista. Sin embargo, existe poca información de las consecuencias de la haploinsuficiencia de SHANK3 en el sistema nervioso, y cómo altera la función sináptica y consecuentemente la actividad neuronal que pudiera estar provocando la condición neurológica del TEA. Con la finalidad de estudiar estas alteraciones moleculares, se han desarrollado modelos animales que presentan alteraciones genéticas similares a las que ocurren en pacientes humanos.

A la fecha se han creado ratones con diversas mutaciones en el gen *Shank3* que, en el caso de estos animales, se localiza en el cromosoma 15E3 (Monteiro & Feng, 2017). Estas mutaciones incluyen deleciones en el dominio ANK, PDZ o SH3. Se considera que estos modelos presentan un fenotipo tipo autista, con déficits en la interacción social, comportamientos repetitivos, así como algunas vocalizaciones anormales (Jiang & Ehlers, 2013). Cada uno presenta fenotipos específicos o alteraciones celulares particulares, y son válidos para el estudio del TEA, pues en humanos se han reportado gran diversidad de deleciones de *Shank3* que provocan un mosaico de variabilidad de las condiciones neurológicas.

Sin embargo, uno de los modelos donde la mutación en *Shank3* es similar a la condición humana, es el ratón haploinsuficiente de *Shank3*, el cual carece del gen *Shank3* en un solo alelo, similar a lo que ocurre en los humanos donde la mutación se presenta en una condición haploide. Este modelo es un ratón genéticamente modificado en el que, por medio del sistema de Cre recombinasa, se eliminaron los exones del 4 al 9, que fueron flanqueados por sitios loxP. Esta porción eliminada en un solo alelo corresponde al dominio repetido de ankirina (ANK) del gen *Shank3* (Fig. 2). Esta delección impide que la expresión de SHANK3 sea completa, pues reduce en un 50% la expresión de mRNA/proteína en la densidad post-sináptica (Bozdagi et al., 2010) .

Los ratones heterocigotos para *Shank3* son un modelo genético de TEA, que se caracterizan por presentar interacción social disminuida, deficiencias en el reconocimiento de objetos nuevos, incremento en conductas repetitivas, vocalizaciones ultrasónicas reducidas y déficits en la memoria espacial (Bozdagi et al., 2010; Yang et al., 2012; Jaramillo et al., 2016). A nivel neurofisiológico presentan una disminución en la transmisión glutamatérgica, reducción en el cociente NMDA/AMPA de sinapsis excitatorias y potenciación sináptica reducida (Bozdagi et al., 2010; Yang et al., 2012).



**Figura 2. Modelo genético de autismo con haploinsuficiencia de *Shank3*.** Estructura genómica de SHANK3, los números representan los exones. Abajo: Localización de los sitios loxP flanqueando los exones 4-9 para la delección de dominio de repeticiones de Ankirina en un alelo silvestre. Posterior se muestra el alelo mutado por la acción del sistema Cre recombinasa, que elimina la porción flanqueada por los sitios loxP, produciendo el fenotipo haploinsuficiente de *Shank3*. Modificado de Bozdagi, et al., 2010.

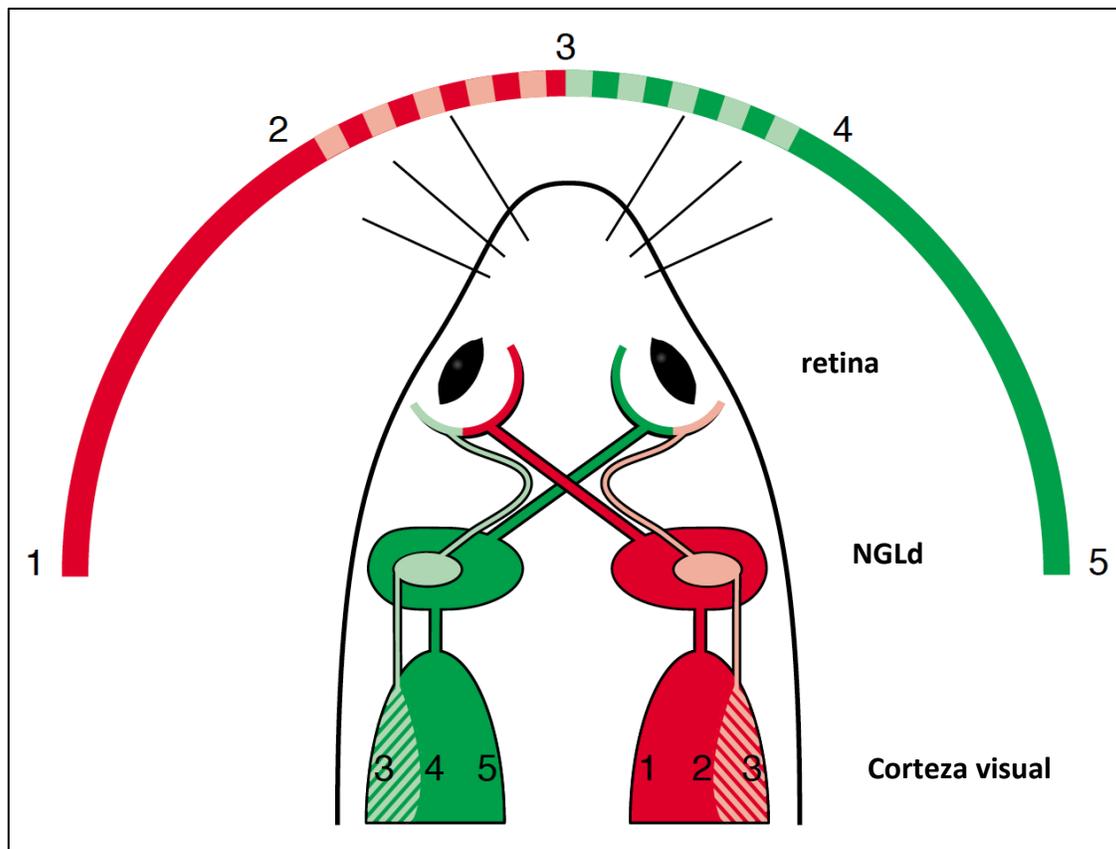
### 1.5 Corteza visual primaria en ratones

A pesar de las diferencias en la complejidad de la corteza visual de roedores con respecto a los humanos, existen una serie de similitudes básicas a nivel anatómico y funcional entre ambos organismos. Esto permite utilizar al ratón como modelo estándar, además que posee accesibilidad y la posibilidad de realizar manipulaciones genéticas para estudiar fenómenos particulares.

Una de las mayores diferencias en los ratones respecto a otros mamíferos es el tamaño del campo visual, donde, debido a la posición de los ojos, la región binocular ocupa cerca de un tercio del área de la corteza visual (Huberner, 2013). Esto quiere decir que la mayor parte de la corteza visual recibe entradas sinápticas provenientes del ojo contralateral, específicamente de la región monocular de la

retina (Priebe & McGee, 2014). Así mismo, a diferencia de otros mamíferos superiores, la corteza visual primaria de ratones carece de organización columnar (Huberner, 2013).

Los estímulos visuales llegan a retina y estos son transformados en señales eléctricas por los foto-receptores, y a través de un procesamiento intra-retinal la información es enviada al cerebro por aferentes de la retina, las células ganglionares de la retina. Estas mandan sus proyecciones al colículo superior contralateral (CSc), y al núcleo geniculado lateral dorsal contralateral del tálamo (NGLd). Las neuronas del NGLd proyectan a la corteza primaria visual ipsilateral (Fig. 3) (Wilks, et al., 2013), específicamente a la capa L4 de corteza visual, y estas neuronas a su vez proyectan a capas L2/3 y estas a capa L5 (Sun et al., 2016).



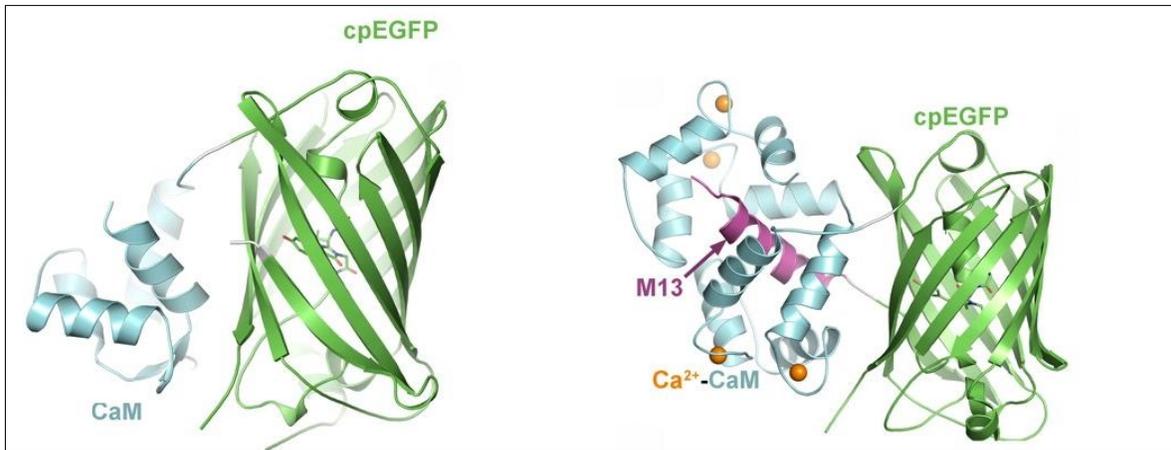
**Figura 3. Esquema de la vía visual de ratón.** Se muestra el campo visual monocular 1-2 y 4-5 del ratón. El campo visual binocular 2-4. Las proyecciones contralaterales e ipsilaterales de retina al núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) y las proyecciones a corteza visual. Modificado de Hübner, 2003.

### 1.6 Sensores de calcio genéticamente codificados para el estudio de la actividad neuronal

La actividad neuronal ocasiona cambios rápidos en las concentraciones intracelulares de calcio, por lo que se han desarrollado técnicas basadas en este principio para monitorear la actividad de neuronas individuales o de poblaciones neuronales (Chen et al., 2013). Estas técnicas utilizan compuestos sensibles a los

cambios en la concentración de calcio intracelular, compuestos denominados indicadores de calcio, que pueden ser químicos o genéticamente codificados.

Los indicadores de calcio genéticamente codificados ofrecen una serie de ventajas sobre los indicadores químicos, entre las más destacables están, una mejor relación señal-ruido y la posibilidad de utilizarlos en tipos celulares específicos (Chen et al., 2013; Broussard et al., 2014). El GCaMP6 es un ejemplo de un indicador de calcio genéticamente codificado. Su estructura consiste en una proteína verde fluorescente permutada circular (cpEGFP), unido a una proteína calmodulina (CaM) y un péptido denominado M13 (Chen et al., 2013). En ausencia o bajas concentraciones de calcio intracelular, CaM y M13 se encuentran separadas entre sí, y cpGFP emite bajos niveles de fluorescencia. Cuando aumenta la concentración de calcio intracelular, este se une a CaM, promoviendo la unión entre ella y M13 (Fig. 4); esta unión promueve un cambio conformacional en cpGFP ocasionando un aumento en la fluorescencia que emite cuando es excitada con longitudes de onda de 450 a 490nm (Broussard et al., 2014) o de 900 a 940 nm cuando se utiliza microscopia de excitación de dos fotones (Chen et al., 2013). La secuencia genética de estos indicadores se puede introducir al genoma de las células a través de transfecciones con plásmidos o a través de infecciones virales, lo que permite la expresión de estas proteínas en las células que son el objeto de estudio.



**Figura 4. Indicador de calcio genéticamente codificado GCaMP6.** Estructura de la proteína indicadora de calcio GCaMP6 en estado basal (panel izquierdo) y en estado activo por aumento en la concentración de calcio intracelular (panel derecho). cpEGFP: proteína verde fluorescente permutada; CaM: proteína calmodulina; M13: péptido M13.

## 2. Planteamiento del problema

Existe evidencia de alteraciones en la actividad cerebral de pacientes con TEA en distintas regiones cerebrales (Dinstein et al., 2011; Dinstein et al., 2012), tales como el incremento de actividad neuronal en corteza visual en comparación con individuos no autistas (Samson et al., 2012), así como diferencias sensoriales en pacientes con PMS (Mises et al., 2016).

Por lo tanto, en este proyecto se plantea evaluar si existen alteraciones en la respuesta neuronal en la corteza visual de un modelo genético de autismo, como consecuencia de una posible desregulación molecular y de la actividad sináptica ocasionada por la haploinsuficiencia del gen *Shank3*.

Para desarrollar este proyecto se consideró que las neuronas de las capas 2/3 de V1 de ratones responden al contraste, la dirección del movimiento y la orientación de los estímulos visuales (Glickfeld et al., 2013; Chen et al., 2013;

Atallah et al., 2012; Sun et al., & Ji, 2016). De esta forma, determinaremos los cambios en la actividad neuronal por medio de señales de calcio provenientes de sensores de calcio genéticamente codificados (GCaMP6f) obtenidas con microscopía de excitación de dos fotones (Kerlin et al., 2010; Chen et al., 2013), en ratones despiertos.

### **3. Hipótesis**

En ratones tipo autista (SHANK3<sup>+/-</sup>) existe una alteración de la actividad neuronal en la corteza visual primaria (V1) en comparación con ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>), provocada por las alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas consecuencia de la haploinsuficiencia del gen *Shank3*.

### **4. Objetivo General**

Evaluar la actividad neuronal *in vivo* en las capas 2/3 de corteza visual primaria mediante señales de calcio (GCaMP6f) en ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) y en ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) en respuesta a estímulos visuales.

#### **4.1 Objetivos particulares**

1. Inducir respuestas neuronales de la corteza visual primaria de ratones SHANK3<sup>+/-</sup> y SHANK3<sup>+/+</sup>, por medio de estímulos visuales elaborados mediante algoritmos hechos en Matlab.
2. Acondicionar ratones para trabajar en el sistema de cabeza fija y lograr monitorear la actividad neuronal *in vivo*. Esto implica realizar cirugías estereotáxicas para la inyección del virus adenoasociado AAV1-Syn-

GCaMP6f-WPRE-SV40, la realización de ventanas craneales en V1, y la implantación de barras para el sistema de cabeza fija.

3. Detectar la actividad neuronal *in vivo* de las capas 2/3 de V1 de los ratones, por medio de microscopía de excitación de dos fotones, en ratones despiertos en modo de cabeza fija.
4. Analizar la actividad neuronal a través de los cambios en la fluorescencia del indicador de calcio genéticamente codificado (GCaMP6f) expresado en las neuronas de la capa 2/3 de corteza visual primaria, mediante algoritmos generados en Matlab.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Animales**

Todos los procedimientos que se llevaron a cabo con animales para la realización de este proyecto se aprobaron por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (protocolo no. YRC94-16)

Se utilizaron ratones machos de la cepa B6(Cg)-*Shank3*<sup>tm1.1Bux/J</sup> (Jackson Laboratory, Lote no. 017889) (Bozdagi et al., 2010) de 8 a 16 semanas de edad. Los grupos experimentales se formaron con ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) (fenotipo tipo autista) y silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) de la misma cepa. Todos los experimentos se realizaron a doble ciego, lo que implica que el experimentador desconocía el genotipo de los animales hasta que se concluye el análisis de los datos obtenidos.

## **5.2 Cirugías estereotáxicas para la elaboración de ventanas craneales, inyecciones virales y acondicionamiento al sistema Head-fixed**

Las cirugías se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Holtmaat (Holtmaat et al., 2009) para la elaboración de ventanas craneales. Se realizaron en un cuarto de bioseguridad nivel 2, y se utilizó equipo de protección personal (guantes de látex o nitrilo, cofia, cubrebocas y bata quirúrgica desechables), todo esto en un ambiente aséptico. Los animales se anestesiaron en una cámara de isofluorano (2-3%) para iniciar la cirugía. Una vez anestesiados (frecuencia respiratoria = 1/seg.), se posicionaron en el estereotáxico que está conectado a un sistema de anestesia (isofluorano 1.5%), sobre un colchón térmico para mantener la temperatura del animal durante el procedimiento quirúrgico. Los ojos de los ratones se protegieron de la deshidratación e irritación aplicando un ungüento ocular de uso veterinario (Dura lágrima).

Posteriormente se expuso el cráneo del animal en cirugía y se alineó en el estereotáxico para ubicar la región de V1 en el hemisferio izquierdo con las siguientes coordenadas: 2.5 mm lateral y 0.5 mm anteroposterior respecto a lambda. Se procedió a la realización de la ventana craneal de aproximadamente 2.5 mm de diámetro con un taladro dental de ¼", evitando dañar la dura. Una vez que se accedió al tejido cerebral se mantuvo hidratado con una solución de iones denominada buffer de corteza (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4 y estéril). Para evitar el sangrado excesivo durante la craneotomía se utilizaron esponjas hemostáticas humedecidas con el buffer de corteza.

Posteriormente se realizó la inyección del virus adenoasociado AAV1-Syn-GCaMP6f-WPRE-SV40 (Penn Vector Core), en el área dónde se realizó la craneotomía (2.5 mm lateral y 0.5mm antero-posterior respecto a lambda), a una profundidad de 250  $\mu\text{m}$ , área que corresponde a las capas 2/3 de la corteza visual primaria de los ratones (Fig. 7C). En cada animal se realizaron tres inyecciones de 50 nl. cada una, en diferentes sitios, utilizando un micro-inyector Nanoject 2.0 (Drummond Scientific) y pipetas de borosilicato de 0.5  $\mu\text{m}$ , con una punta biselada a 45° aproximadamente. Después de cada inyección se dejó difundir el virus durante 10 minutos.

Terminadas las inyecciones se colocó un cubreobjetos circular de 3 mm de diámetro con un espesor #1 (Warner Instruments, 64-0720) sobre el tejido expuesto, donde previamente se puso una gota de buffer de corteza para evitar la deshidratación del tejido. La orilla del cubreobjetos se adhirió al cráneo con cianoacrilato.

Se colocó una barra de acero (Diseñado por Takaki Komiyama, Janelia Farm) para trabajar en el modo de cabeza fija (Guo et al., 2014) en la parte anterior del cráneo, ligeramente atrás de los ojos; previamente se raspó el cráneo con una navaja de bisturí para lograr una mayor superficie de contacto entre el cianoacrilato, la barra y el hueso del cráneo. Se dejó secar por completo el adhesivo y se cubrió el cráneo y la piel expuesta con acrílico dental (Orthojet).

Durante la cirugía se administraron fármacos para reducir la inflamación y el dolor, así como para evitar infecciones y deshidratación. Se aplicaron dexametasona ( $2\mu\text{g/g}^{-1}$  peso) vía intramuscular, solución de Ringer lactato

(0.015ml/g<sup>-1</sup> peso) vía subcutánea, sulfametoxazol (1 mg/ml) y trimetoprima (0.2 mg/ml) vía subcutánea. Al finalizar la cirugía, se retiró al animal del estereotáxico y su recuperación fue monitoreada durante 60 minutos posteriores a la cirugía. Si la recuperación resultó favorable, se mantuvo en el área de recuperación por 48 horas, posterior a este período se traslada al vivario donde permaneció para fines experimentales.

### **5.3 Recuperación post-quirúrgica, manipulación y habituación**

A los animales se les dio una semana de recuperación después de la cirugía, durante la cual se les administró Carprofeno (0.3 ml de un stock de 0.50 mg/mlc vía intraperitoneal) y Enrofloxacin 4 µl/ml (5 µg/g<sup>-1</sup> peso) vía oral, haciendo la disolución en el agua de consumo.

Después del período de recuperación, se siguió un protocolo de manipulación y habituación al sistema de cabeza fija, para reducir el estrés de los animales (Guo et al., 2014). Para acostumbrar a los animales a las manos del experimentador, se siguió un programa de privación de agua, en el que se limita el acceso al agua removiendo los bebederos de sus cajas y ofreciéndoles agua con una pipeta o jeringa al tiempo en que se manipulan. El protocolo manipulación consistió en colocar a los ratones sobre la palma de la mano, dejándolo explorar libremente. Se les ofreció agua o comida para identificar el momento en el que se relajan, pues los animales sólo beben y comen en la mano del experimentador cuando están relajados (Fig. 5). La manipulación se realizó durante tres días, procurando mantener el peso de los animales al 85% de su peso al iniciar el programa privación de agua.

Al cuarto día a los animales se les presentó la estación de trabajo del sistema de cabeza fija, y se les dejó explorar libremente. Cuando se logró que los ratones comieran y bebieran estando dentro del tubo de la estación, se realizó la maniobra de fijación, que consiste en tomar firme y cuidadosamente la cabeza del animal y fijar la barra de acero en los postes de la estación de trabajo, ajustándola con un par de tornillos, para evitar que el animal, una vez fijado, se mueva de su lugar. En esta posición se ofreció agua y comida al animal, para buscar reducir su nivel de estrés y el protocolo se repitió durante tres días, dejando al animal con la cabeza fija durante más tiempo en cada sesión de habituación hasta conseguir que estuvieran tranquilos en el tubo por al menos 30 minutos (Fig. 5).



**Figura 5. Procedimientos de trabajo con ratones en el sistema *head-fixed*.** Diagrama temporal que muestra las fases que se llevaron a cabo para trabajar con ratones en el sistema de cabeza fija. En color azul se representa el tiempo de recuperación post-quirúrgica de los animales con tratamiento farmacológico; el verde corresponde al tiempo de manipulación. En la parte de arriba se muestran fotografías de un ratón en esta fase, se logra apreciar que está tranquilo en la mano del experimentador; finalmente, en amarillo se muestra el período correspondiente a la habituación al sistema de cabeza fija, la fotografía de la parte superior muestra a un ratón al final de esta etapa. Al final de esta fase los animales están listos para hacer imagen con microscopía de dos fotones.

#### 5.4 Estímulos visuales

Los estímulos visuales fueron realizados en Matlab (Mathworks, versión 2016) con el uso de la librería de funciones Psychophyscs Toolbox (recurso de

acceso libre). Se realizó un algoritmo para presentar ocho tipos de estímulos que consistieron en animaciones compuestas por barras blancas y negras (contraste del 100%), en distintas orientaciones y que presentan movimiento en direcciones opuestas. A cada tipo de estímulo se le asignó un ángulo de identificación, teniendo así estímulos a 0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270° y 315°. El protocolo de estimulación consistió en 10 segundos de presentación de la pantalla en color gris, seguida por 4 segundos de presentación de estímulo (Fig. 6A). Cada conjunto de estímulos se repitió de tres a cinco veces por ensayo, y se realizaron tres ensayos por sesión de estimulación para cada animal.

Los estímulos visuales se presentaron en un monitor LCD de 17" con resolución de 2.048 x 1.536 píxeles a 264 píxeles por pulgada, que se colocó a una distancia de aproximadamente 20 centímetros del centro del ojo derecho de los ratones, y en una orientación de 70° respecto a su vista frontal, con el fin de abarcar la mayor parte del campo visual monocular de los animales (Fig. 6B).

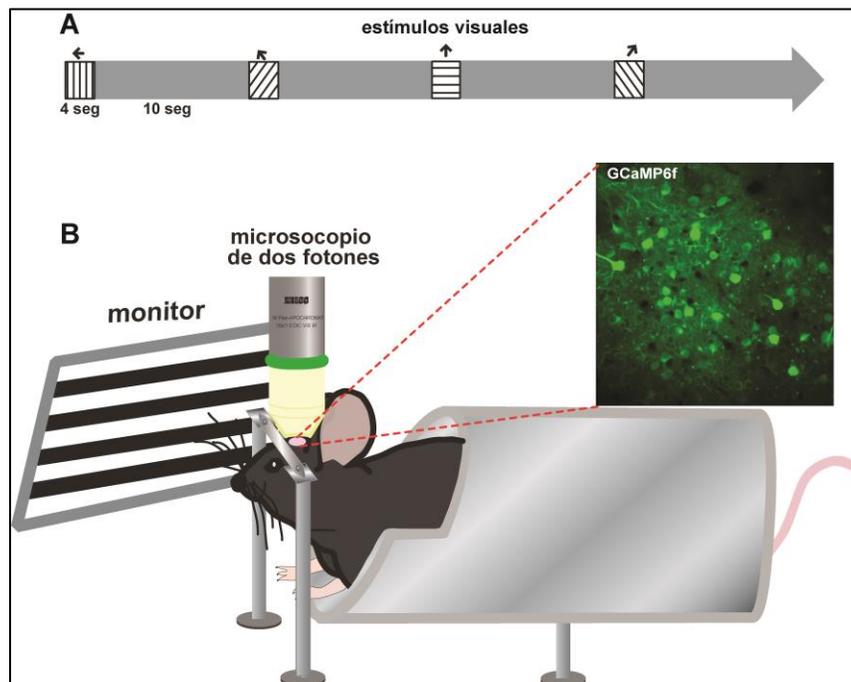
### **5.5 Microscopia de excitación de dos fotones *in vivo***

Para la adquisición de imágenes de calcio *in vivo* se utilizó un microscopio de excitación de dos fotones Zeiss LSM 710, objetivo 20x Plan Achromat, de inmersión de agua, 1.0 AN, 2.4 mm distancia trabajo, láser infrarrojo pulsado Chameleon Ultra II (Coherent). El indicador de calcio se excitó a una longitud de onda de 900 nanómetros.

La tasa de adquisición de imágenes fue de 4 Hz (250ms por cada *frame* adquirido). El inicio y el final de la adquisición de imágenes se controló usando una

interface de Matlab y una tarjeta Arduino UNO, por medio de una serie de circuitos eléctricos conectados a la computadora del microscopio.

Se colocó a los ratones en modo de cabeza fija y cada uno se ubicó debajo del microscopio, poniendo una gota de agua sobre la ventana craneal, dentro de la poza que se hizo durante la cirugía (Fig. 6B).

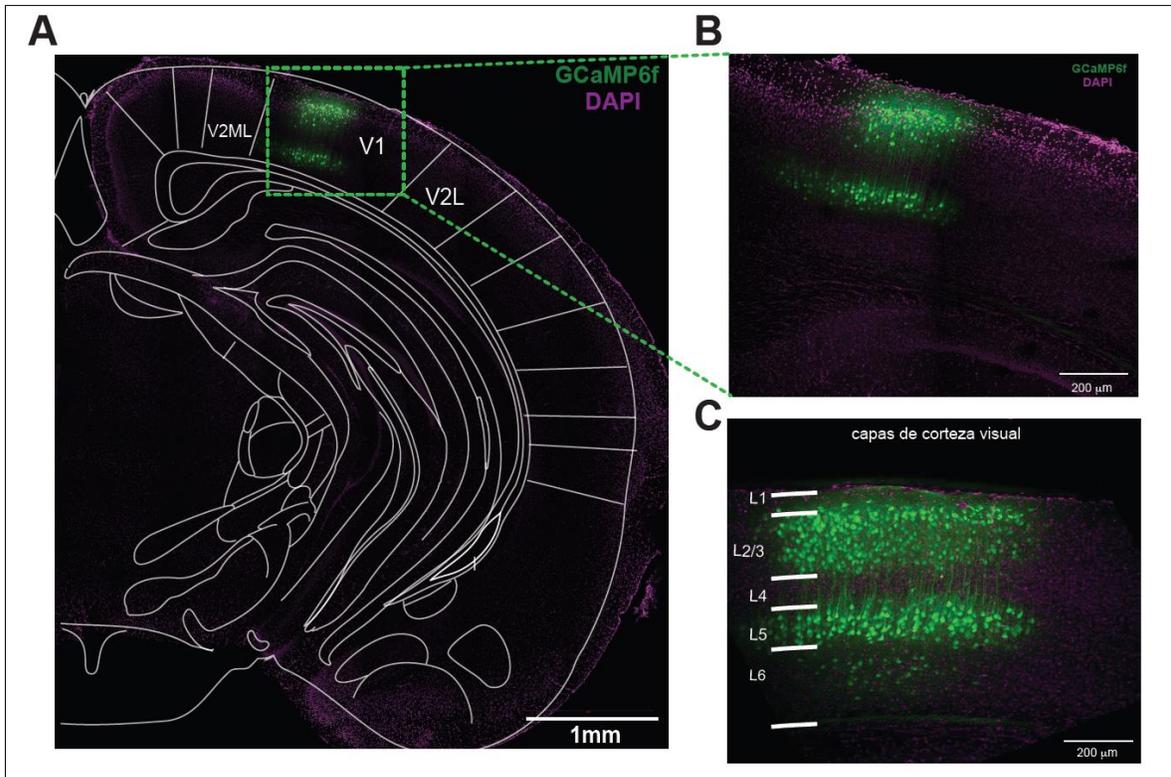


**Figura 6. Estimulación visual e imagenología de calcio *in vivo*.** **A)** Diagrama de la rutina de estímulos visuales elaborada con Psychophysycs Toolbox de MatLab. Se muestran las orientaciones de los estímulos y algunas de las direcciones de su movimiento; las direcciones restantes son las opuestas a las indicadas en el diagrama (total de ocho estímulos). **B)** Representación de la adquisición de imagen con microscopía de dos fotones *in vivo* en modo de cabeza fija. El recuadro muestra una imagen real del tejido cerebral obtenida a través de la ventana craneal.

Antes de iniciar la imagenología durante la estimulación visual, el objetivo del microscopio se cubrió con tela de color negro, para evitar que la luz del monitor de estimulación visual incidiera directamente sobre los fotomultiplicadores, y así reducir la contaminación lumínica de las imágenes adquiridas.

## 5.6 Histología

Al finalizar los experimentos, los animales se anestesiaron con Xilacina/Ketamina (15/85 %) y se perfundieron con PBS o NaCl al 0.9% y con paraformaldehido al 4% para fijar el tejido cerebral. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en paraformaldehido 4% por una noche. Posteriormente se incluyeron con agar y se obtuvieron cortes coronales de 150  $\mu\text{m}$  usando un vibratomo. Los cortes se montaron en un portaobjetos y se montaron con VectaShield-DAPI. Finalmente se realizó imagenología confocal (Zeiss LSM 710), GCaMP6f se excitó con 488 nm, filtro de emisión de 500-550 nm, DAPI se excitó a 720 nm, filtro de emisión de 420-480nm, objetivo C-Apochromat 10x, inmersión de agua, 0.45 NA, 1.8 mm distancia de trabajo, para comprobar que los sitios de infección corresponden a la corteza visual primaria (Fig. 7).



**Figura 7. Expresión de GCaMP6f en neuronas de corteza visual primaria.** **A)** Imagen de microscopía confocal de una rebanada de cerebro de ratón infectado con AAV.Syn.GCaMP6f; se aprecia que la zona de infección (neuronas en verde) corresponde a la corteza visual primaria **B)** Acercamiento de la zona de infección de la rebanada mostrada en A. **C)** Corte histológico de cerebro de ratón infectada con GCaMP6f donde se aprecian las capas de la corteza visual primaria. En este trabajo se analizó la actividad de las neuronas de la capa 2/3 ubicada a 250μm de profundidad. Cada “L” corresponde a una capa (*layer*).

## 5.7 Procesamiento de imágenes y análisis de datos

### 5.7.1 Extracción de la señal de calcio intracelular

El movimiento horizontal de las secuencias de imágenes adquiridas se corrigió mediante un algoritmo de alineamiento de imágenes del software ImageJ y el plugin Turboreg (Thévenaz, et al., 1998).

Se realizó un algoritmo semi-automatizado en MatLab para medir los cambios en la fluorescencia del indicador de calcio (GCaMP6f) basados en el

trabajo de Chen y cols. (Chen et al., 2013). En primer lugar, se realizó una deconvolución de las imágenes obtenidas por microscopía de dos fotones por medio de un algoritmo de aproximación de fracción racional, que nos permitió modificar la tasa de adquisición de 250 ms por cuadro a una de 1 ms por cuadro. La modificación se realizó con el fin de alinear el tiempo de la adquisición de las imágenes del microscopio con el tiempo del protocolo de estimulación visual. Posteriormente, de forma manual se seleccionaron regiones de interés, correspondientes a los somas de neuronas de la corteza visual primaria que fueron visiblemente identificables, y se trazó un polígono alrededor de cada soma. Se midió el promedio de la intensidad del color de los píxeles dentro del polígono, a lo largo de todo el video. A este valor se le asignó el nombre de  $F_{soma}$ . Para descartar la fluorescencia emitida por la neuropila, que es el tejido nervioso que no corresponde a somas (dendritas, axones), de forma automática se trazó un círculo con un radio definido a partir del centro del polígono y hasta 5  $\mu\text{m}$  de la periferia del soma, para cada una de la región de interés evaluada y se midió el promedio de la intensidad del color de píxeles, exceptuando la región ocupada por el polígono que corresponde al soma. A este valor se le denominó  $F_{neuropila}$ . La señal de la fluorescencia de cada soma, denominada  $F_v$ , se estimó con la siguiente manera (Chen et al., 2013):

$$F_v = F_{soma}^t - F_{neuropila}^t$$

Para alinear la actividad neuronal (medida a través de cambios en la fluorescencia) con la estimulación visual, se realizó una colecta de datos por medio de una tarjeta Arduino y una serie de circuitos eléctricos. Se registraron los tiempos

en que se presentó cada uno de los estímulos, así como los tiempos de inicio y final de la adquisición de imágenes.

Para obtener los cambios de fluorescencia, respecto a la fluorescencia basal ( $\Delta F/F_0$ ) se empleó la siguiente expresión (Chen et al., 2013):

$$\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$$

dónde **F** es el valor promedio de la fluorescencia durante los cuatro segundos en que se presentaron los estímulos y **F<sub>0</sub>** es el promedio de la fluorescencia durante los dos segundos previos al inicio de la estimulación. El transitorio de calcio final correspondiente a cada estímulo fue el promedio de los transitorios obtenidos en tres o cinco ensayos.

### **5.7.2 Selección de neuronas con actividad modulada por los estímulos visuales**

Las células con un valor de  $\Delta F/F_0$  significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la fluorescencia promedio en los dos segundos previos al inicio de la estimulación, a la que denominamos fluorescencia basal, fueron seleccionadas como neuronas moduladas por los estímulos visuales.

### **5.7.3 Selección de neuronas selectivas**

Para determinar si las células moduladas son selectivas a alguno o algunos de los estímulos, se realizaron curvas de ajuste para los transitorios de calcio en función de cada uno de los ocho estímulos presentados, así mismo los valores negativos se consideraron como 0, estos análisis se realizaron basado en el trabajo

de Sun y cols. (Sun et al., 2016). Posteriormente se ajustó una curva con una función Gaussiana doble, usando la herramienta Curve Fitting Tool de Matlab:

$$R(\theta) = b + c e^{-\frac{x(\theta - \theta_{pref})^2}{2a^2}} + d e^{-\frac{x(\theta - \theta_{pref} + 180)^2}{2a^2}}$$

Donde  $\theta_{pref}$  es la orientación preferida, es decir el estímulo dónde se encontró el mayor valor de  $\Delta F/F$ ,  $b$  es una constante calculada de forma automática por el programa,  $c$  es la respuesta (en  $\Delta F/F$ ) de la célula a la orientación preferida,  $d$  es la respuesta celular en el ángulo opuesto a la orientación preferida, es decir, la orientación preferida más o menos  $180^\circ$  y  $a$  es el ancho de la curva de ajuste (Sun et al., 2016; Carandini & Ferster, 2000).

Con este análisis, se seleccionaron aquellas células que se ajustaron a la doble Gaussiana con un valor de  $R^2 > 0.7$ , a las que denominamos neuronas selectivas. Este estadístico mide el éxito del ajuste para explicar la variación de los datos.

#### **5.7.4 Evaluación de selectividad de las neuronas a la orientación y a la dirección de movimiento de los estímulos.**

Se midió la selectividad a la orientación de los estímulos visuales que las neuronas selectivas utilizando el índice de selectividad a la orientación, definida como (Sun et al., 2016)

$$\frac{R_{pref} - R_{ortho}}{R_{pref} + R_{ortho}}$$

donde  $R_{pref}$  corresponde a la respuesta de la célula a la orientación preferida (dónde se registró el mayor valor de  $\Delta F/F$ ) y  $R_{ortho}$  es la respuesta de la célula a la orientación ortogonal de la orientación preferida, es decir orientación preferida más o menos  $90^\circ$ .

Para determinar la selectividad de la dirección del movimiento de los estímulos visuales, se usó el índice de selectividad a la dirección, definido como (Sun et al., 2016)

$$\frac{R_{pref} - R_{opu}}{R_{pref} + R_{opu}}$$

donde  $R_{opu}$  es la respuesta de la célula en la orientación opuesta a la orientación preferida, es decir, la orientación preferida más o menos  $180^\circ$ .

## 5.8 Estadística

Para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas, a cada conjunto de datos analizados se les realizaron pruebas de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk y/o prueba de Kolmogorov\_Smirnov).

En todas las pruebas de hipótesis realizadas en este proyecto se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

La determinación de células moduladas por la estimulación visual se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar los valores de  $\Delta F/F_0$  de la célula durante la estimulación y dos segundos previos a ésta (fluorescencia basal).

La prueba de U de Mann-Whitney se utilizó para evaluar los siguientes parámetros: número de células positivas a GCaMP6f, actividad neuronal total de las neuronas moduladas, amplitud del cambio en la fluorescencia, número de estímulos a los que hay respuesta celular, índice de selectividad a la orientación e índice de selectividad a la dirección.

Para comparar los porcentajes de neuronas moduladas por estimulación visual, se utilizó una prueba de t de Student.

Las proporciones de células moduladas y no moduladas por la estimulación visual, así como las proporciones de células selectivas y no selectivas, fueron evaluadas mediante el uso de tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher.

La preferencia de las células moduladas fue evaluada con una prueba de Kruskal-Wallis, con un post-hoc de Dunn para determinar si la respuesta celular fue significativamente diferente durante algún estímulo en particular. Así mismo, la prueba fue utilizada para comparar si en los dos grupos existía o no una preferencia igual o similar por alguno de los estímulos.

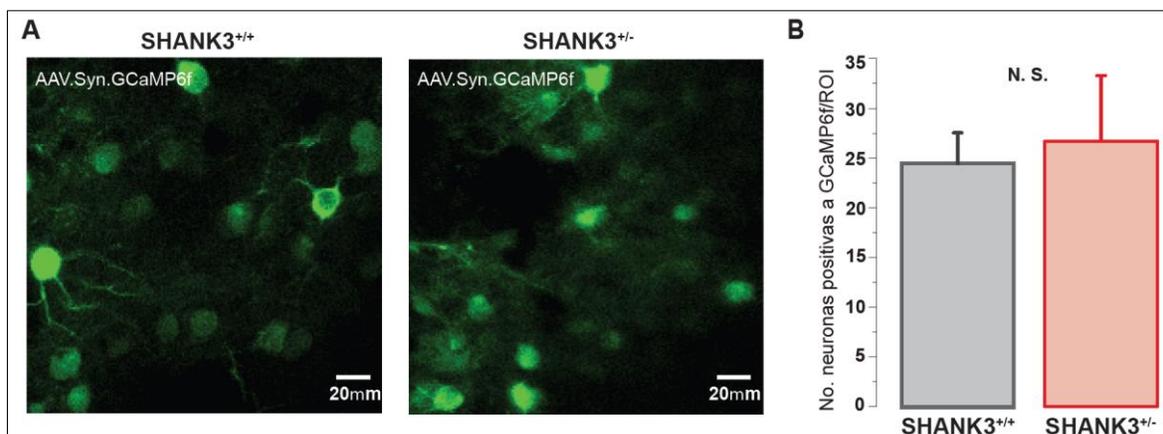
Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software Origin Pro8, y en algunos casos también se utilizaron los softwares Matlab y GraphPad Prism.

## 6. Resultados

### Expresión de GCaMP6f en corteza visual primaria

Con el propósito de determinar si la haploinsuficiencia del gen *Shank3*, que produce un fenotipo autista, afecta la actividad neuronal de la corteza visual, se infectaron neuronas de la capa 2/3 de corteza visual primaria (V1) con un virus adenoasociado que codifica para el indicador de calcio GCaMP6f.

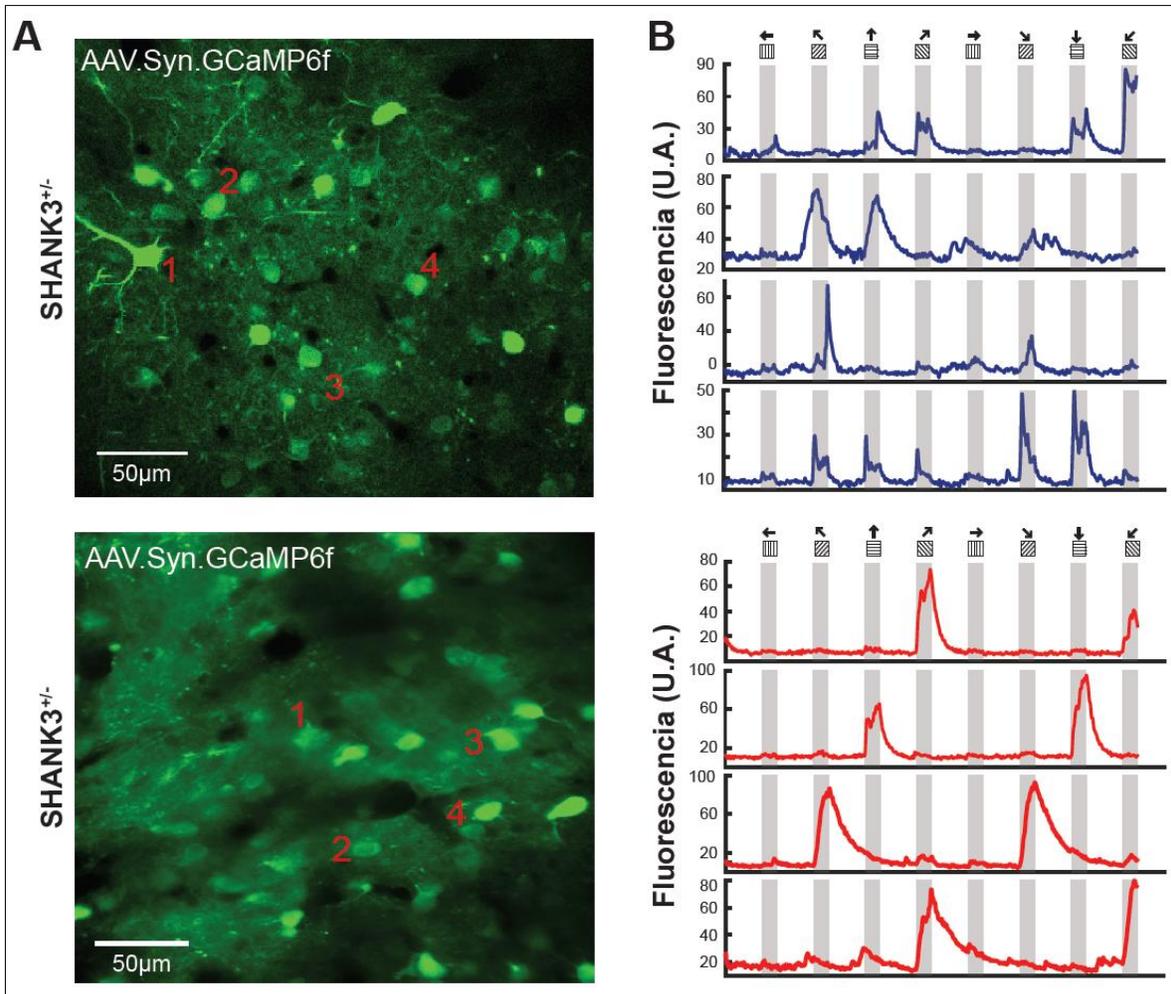
Para descartar algún sesgo técnico o influencia del genotipo, se contó el número de células que expresan GCaMP6f en cada una de las regiones de interés (ROI: 250  $\mu\text{m}$  x 250  $\mu\text{m}$ ) en las que se hizo microscopía de dos fotones *in vivo* en modo de cabeza fija en cada uno de los individuos. El promedio de neuronas positivas por cada ROI fue de 24 los silvestre y 27 los heterocigotos. Esta diferencia no es estadísticamente significativa (Fig. 8B), por lo que se determinó que el genotipo y la técnica de inyecciones virales no influyó sobre la expresión de GCaMP6f.



**Figura 8. Expresión de GCaMP6f en corteza visual primaria.** **A)** Imágenes con microscopía de excitación de dos fotones en ratones despiertos en modo de cabeza fija. Neuronas positivas a GCaMP6f en regiones de interés (ROI) de corteza visual primaria. **B)** Cuantificación del número de neuronas positivas a GCaMP6f por ROI en cada grupo experimental, silvestres (WT, n=7) y heterocigotos (HET, n=5), U de Mann-Whitney P=0.749. N.S. No significativo. Barras representan la media  $\pm$  E.S.

## **6.2 Actividad neuronal por imagenología de calcio con GCaMP6f en ratones despiertos en modo de cabeza fija**

Una vez determinada la expresión de GCaMP6f en la corteza visual primaria, monitoreamos la actividad neuronal a través de cambios en la fluorescencia del indicador de calcio. Para esto, registramos, por medio de microscopia de excitación de dos fotones, una región de interés del área infectada con GCaMP6f a lo largo del tiempo, mientras a los ratones se les presenta una serie de estímulos visuales en un monitor colocado frente al ojo contralateral al hemisferio dónde se realizó la infección (secciones 5.4 y 5.5 de *Materiales y métodos*; y Fig. 6). Después, se obtuvieron los valores de la fluorescencia de cada soma visible a lo largo del tiempo, y finalmente los valores de fluorescencia de cada ensayo se promediaron y se alinearon al tiempo en que aparecen los estímulos visuales. Los detalles de la obtención de las señales de calcio y de la alineación a los tiempos de estimulación se describen en la sección 5.7 de *Materiales y métodos*. La actividad neuronal pudo ser monitoreada y analizada en los dos genotipos utilizados en este proyecto, mediante microscopia de excitación de dos fotones y la técnica de cabeza fija (Fig. 9).

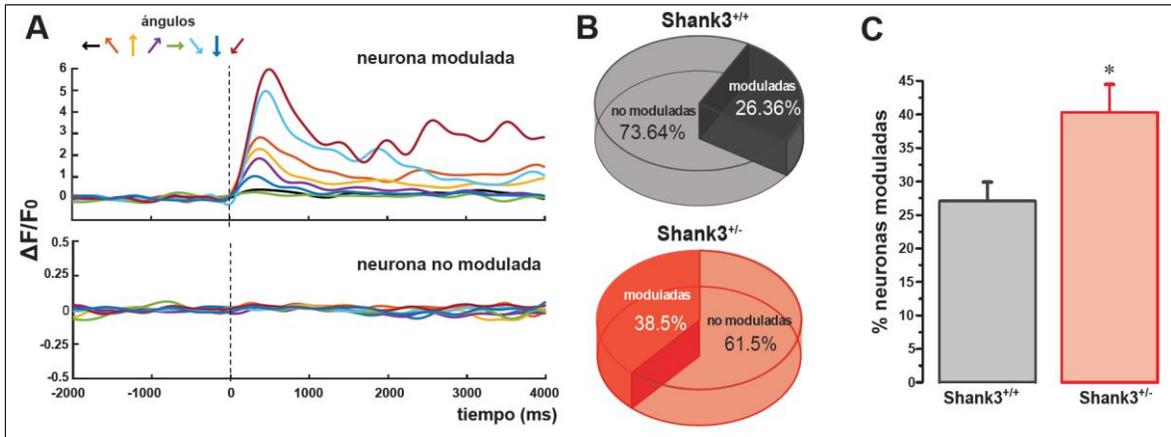


**Figura 9. Actividad neuronal *in vivo* de corteza visual primaria de ratones despiertos A)** Muestra de las regiones de interés de V1 donde se registró la actividad neuronal *in vivo* en ratones despiertos. En el panel superior se muestra un ROI de un ratón silvestre, mientras que el panel inferior corresponde a un ratón heterocigoto. **B)** Muestra de los transitorios de calcio obtenidos de neuronas de ratones silvestre (panel superior) y heterocigotos (panel inferior) infectadas con GCaMP6f. Cada trazo es el promedio de cinco ensayos, y cada uno de ellos corresponde a uno de los somas numerados en el panel A. Las líneas grises corresponden a los tiempos en que se presentan los estímulos visuales. U.A.= Unidades arbitrarias, que corresponden al promedio de la intensidad de color de los píxeles que forman la imagen.

## **La proporción de neuronas moduladas por estímulos visuales es mayor en ratones heterocigotos que en ratones tipo silvestre**

Para evaluar la actividad de las neuronas de la corteza visual primaria en respuesta a la estimulación visual, se seleccionaron sólo aquellas neuronas que respondieron de forma positiva a los estímulos visuales, es decir, neuronas que tuvieran valores de  $\Delta F/F_0$  significativamente mayores que la fluorescencia basal, en por lo menos uno de los ocho estímulos presentados. Las neuronas que no tuvieran un cambio en la fluorescencia significativamente mayor con respecto al basal en respuesta a un estímulo fueron consideradas no moduladas (Fig. 10A) (Chen et al., 2013; Sun et al., 2016). De esta forma, se excluyeron respuestas relacionadas a otros factores (actividad espontánea, actividad en función de cambios de luminosidad, locomoción del ratón, etc.) que pudieran alterar el análisis. Los criterios para considerar a una célula como modulada o no modulada se describen detalladamente en la sección 5.7.2 de Materiales y métodos.

En los ratones silvestres, de las 220 neuronas positivas a GCaMP6f evaluadas, 58 resultaron moduladas, correspondiente al **26.36%** del total, mientras que en los animales heterocigotos presentaron 72 moduladas, de las 187 analizadas, lo que corresponde a un **38.5%** (Fig. 10B). Al analizar el porcentaje de neuronas moduladas por cada individuo se encontró una mayor proporción de neuronas moduladas en los ratones heterocigotos (**42.48012%  $\pm$  3.80772%**) en comparación a los ratones silvestres (**30.84849%  $\pm$  3.08526%**) (Fig. 10C). Estos datos demuestran que en ratones heterocigotos existe un mayor número de neuronas que responden a los estímulos visuales presentados.



**Figura 10. Los ratones heterocigotos presentan una mayor proporción de neuronas con actividad modulada en respuesta a estimulación visual. A)** Ejemplo de transitorios de calcio de una neurona modulada (panel superior) y de una no modulada (panel inferior) durante la presentación de estímulos visuales. La línea punteada indica el momento en el que estímulo visual se presenta. **B)** Proporción de neuronas moduladas y no moduladas a nivel poblacional en ratones silvestres (WT) y heterocigotos (HET), prueba exacta de Fisher,  $P=0.033$ . **C)** Proporción de neuronas moduladas por ratón. Barras representan la media  $\pm$  E.S. t de Student, \*  $P=0.01612$ .

### La actividad neuronal modulada por la estimulación visual es diferente en ratones heterocigotos de *Shank3*

Para determinar si la actividad neuronal se ve afectada por la haploinsuficiencia de *Shank3*, se evaluaron los cambios en la fluorescencia de las neuronas moduladas durante el tiempo en que se presentaron los estímulos visuales. Para esto, se tomaron los valores de  $\Delta F/F_0$  de cada neurona modulada durante los cuatro segundos de duración de cada uno de los estímulos y se realizó un promedio. De esta forma, se obtuvieron ocho valores por cada soma analizado, correspondientes al promedio de  $\Delta F/F_0$  durante el tiempo de cada uno de los estímulos presentados.

Con los valores obtenidos anteriormente, se evaluó, en primer lugar, si existe preferencia de las neuronas moduladas por alguno de los estímulos presentados. Se encontró que en ratones silvestres hay un aumento significativo de actividad durante el estímulo correspondiente a 315° (**1.2946 ± 0.16999  $\Delta F/F_0$** ), así como una tendencia a una mayor actividad en el estímulo de 135° (**1.26345 ± 0.1659  $\Delta F/F_0$** ) (Fig. 11 A, B). Respecto a estos datos, al tratarse de la misma orientación del estímulo, con movimiento en direcciones opuestas, consideramos que los ratones silvestres presentan una mayor preferencia por esta orientación.

Por otra parte, en los animales heterocigotos no se encontró preferencia por algún estímulo en particular (Fig. 11 A, B). Estos datos muestran que las neuronas de V1 de ratones heterocigotos no presentan preferencia por alguno de los estímulos, mientras que, en los ratones silvestre, si hay preferencia por una orientación particular.

Además, al comparar la actividad de las neuronas moduladas evocada por los estímulos visuales, encontramos que las dos poblaciones analizadas son diferentes entre sí, sobre todo en el estímulo de 315° dónde se registró una mayor actividad en los silvestres (**1.2946 ± 0.16999  $\Delta F/F_0$** ), en comparación de los heterocigotos (**0.71859 ± 0.13295  $\Delta F/F_0$** ) (Fig. 11B).

Partiendo de lo anterior, cuantificamos si a nivel poblacional la actividad neuronal total (actividad durante los ocho estímulos presentados) de las neuronas moduladas es diferente en ratones heterocigotos. Al comparar los valores de  **$\Delta F/F_0$**  a nivel poblacional, encontramos que la actividad neuronal total de los animales

heterocigotos es menor ( **$0.67842 \pm 0.04981 \Delta F/F_0$** ) en comparación a los silvestres ( **$0.75576 \pm 0.04743 \Delta F/F_0$** ) (Fig. 11C).

Para tratar de explicar esta diferencia en la actividad analizaron tres posibles causas: una disminución en la intensidad de las respuestas de las neuronas de los ratones heterocigotos, una disminución en el número de eventos a los que responden, o una combinación de ambos factores.

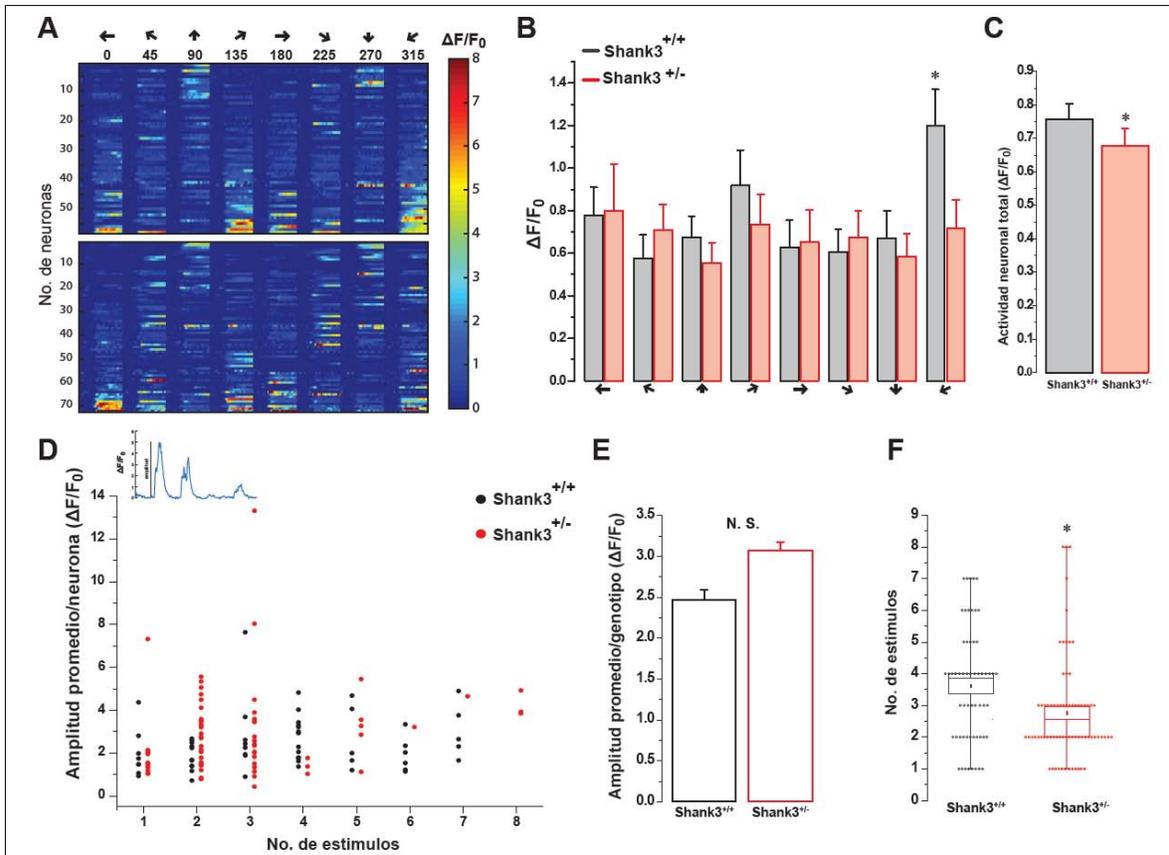
Para dilucidar la causa de esta diferencia, cada neurona modulada se agrupó en función de la amplitud promedio de  $\Delta F/F_0$  con la que respondió a la estimulación visual y al número de estímulos a los que respondió (Fig. 11D). Encontramos que la mayoría de las neuronas, tanto de ratones silvestres como de heterocigotos, tienen una amplitud promedio similar, que está en un rango de 0.7 a 5 de  $\Delta F/F_0$ . Sin embargo, al observar la distribución de las células en función del número de estímulos a los que responde, encontramos que la mayoría de las neuronas de ratones heterocigotos responden principalmente en un rango de 2 a 3 estímulos, mientras que las neuronas de los ratones silvestres se distribuyen de forma más homogénea en relación al número de estímulos a los que responden, y en este caso, el rango va de 1 a 7 estímulos. Estos datos sugieren que la diferencia encontrada en la actividad neuronal entre los dos grupos analizados se debe a una diferencia en el número de estímulos a los que las neuronas responden, más que a una diferencia en la intensidad de la actividad de las neuronas.

Para corroborar que la intensidad de la actividad neuronal en ratones heterocigotos no es diferente, se midieron las amplitudes del cambio en la fluorescencia de las neuronas solo cuando éstas respondieron de forma positiva a

los estímulos. Encontramos que en animales heterocigotos existe una tendencia hacia una mayor amplitud ( **$3.07364 \pm 0.19662 \Delta F/F_0$** ) en comparación a los silvestres ( **$2.46472 \pm 0.12205 \Delta F/F_0$** ), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (Fig. 11E).

A fin de comprobar que el número de estímulos a los que las neuronas de los ratones heterocigotos responden es menor, se hizo un conteo del número de estímulos visuales a los que cada neurona modulada en ambos genotipos respondió de manera significativamente positiva. Encontramos que las neuronas de los animales heterocigotos responden en promedio a un menor número de estímulos visuales ( **$2.76389 \pm 0.1953$** ) que las neuronas de ratones silvestres ( **$3.62069 \pm 0.23951$** ) (Fig. 11F).

En resumen, estos datos demuestran que una disminución en la actividad neuronal en ratones heterocigotos o haploinsuficientes, no se debe a una disminución en la intensidad de su actividad, sino que es debido a que sus neuronas responden de manera positiva a un menor número de estímulos.



**Figura 11** Diferencias en la actividad neuronal de ratones heterocigotos evocada por estimulación visual. **A)** Mapas de color de la actividad neuronal (medida en  $\Delta F/F_0$ ) de cada neurona modulada en respuesta a los estímulos visuales presentados, para ratones silvestres (mapa superior) y heterocigotos (mapa inferior). En los mapas, las neuronas con menor actividad se encuentran en la parte superior, mientras que aquellas con mayor actividad están en la parte inferior. **B)** Cuantificación poblacional de la actividad neuronal mostrada en A, prueba de H de Kruskal-Wallis,  $P = 0.0057$ , Post-Hoc Comparación Múltiple de Dunn. WT  $n = 58$  neuronas de 7 ratones; HET  $n = 72$  células de 5 ratones. **C)** Actividad neuronal total de neuronas moduladas por los estímulos visuales. Prueba de U de Mann-Whitney,  $P < 0.0001$ . WT  $n = 58$  neuronas de 7 ratones; HET  $n = 72$  neuronas de 5 ratones. **D)** Gráfico de dispersión de la distribución las neuronas moduladas en función de la amplitud promedio con la que responden a los estímulos (ordenadas) y del número de estímulos a los que responden (abscisas). Se muestra un trazo de un transitorio de calcio para ejemplificar la amplitud considerada en este análisis. **E)** Amplitud de  $\Delta F/F_0$  de las respuestas neuronales evocadas por los estímulos. Prueba de U de Mann-Whitney,  $P = 0.05654$ . WT  $n = 58$  neuronas de 7 ratones; HET  $n = 72$  neuronas de 5 ratones. **F)** Número de estímulos a los que las neuronas moduladas responden, representado en diagrama de cajas y bigotes. Prueba de U de Mann-Whitney,  $P = 0.00304$ . WT  $n = 58$  neuronas de 7 ratones; HET  $n = 72$  neuronas de 5 ratones. Barras representan la media  $\pm$  E.S.

## **Las neuronas de la corteza visual primaria de ratones heterocigotos tienen mayor selectividad a la orientación, pero la selectividad a la dirección no es diferente**

A partir de los resultados anteriores, nos planteamos determinar si existe una mayor selectividad de las neuronas de corteza visual en ratones heterocigotos a algún componente de los estímulos visuales. Basados en estudios previos, se sabe que las neuronas de la capa 2/3 de la corteza visual primaria responden a la orientación, dirección y contraste de los estímulos visuales.

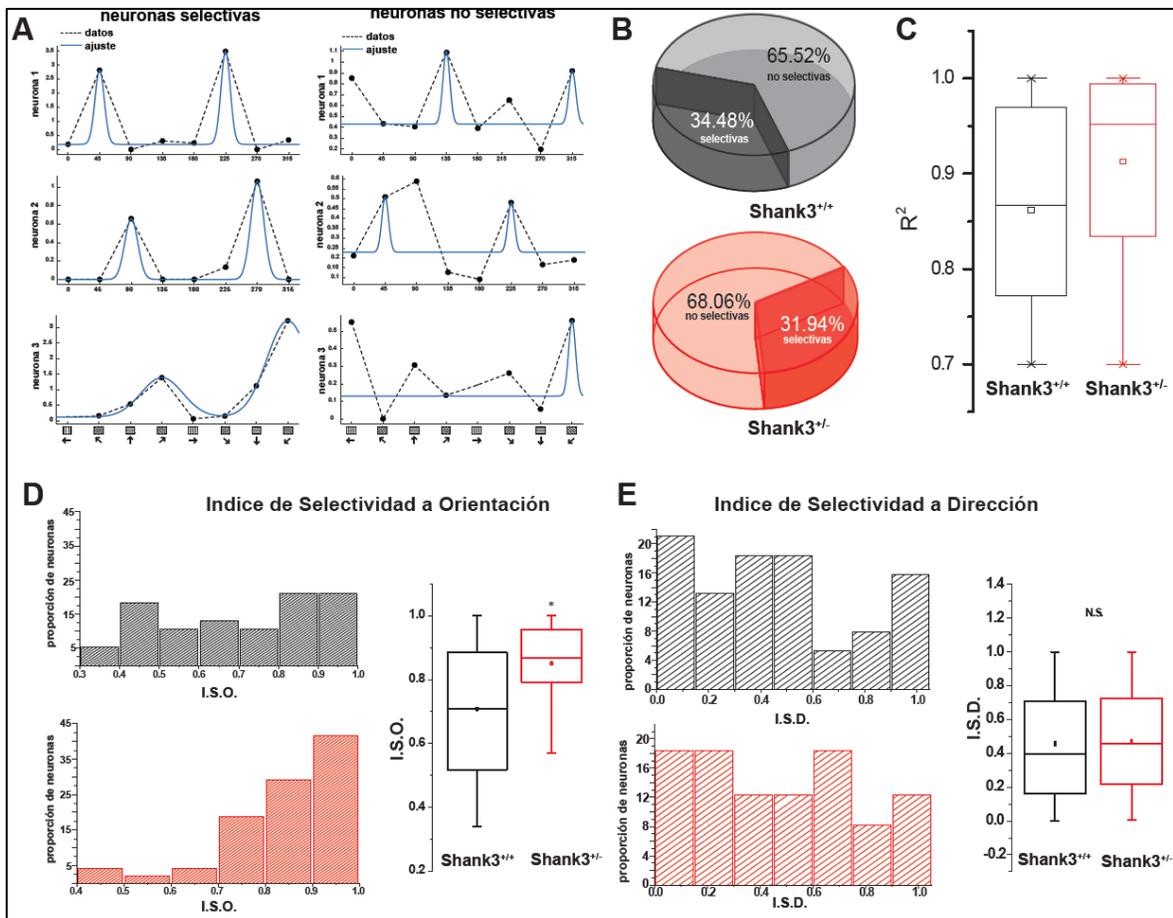
Considerando estas características, se realizó un ajuste de los datos con una función compuesta por la suma de dos Gaussianas definidas en  $360^\circ$ , con base en el trabajo de Sun y cols. (Sun et al., 2016; Carandini & Ferster, 2000). Los picos de la doble Gaussiana son forzados a separarse por  $180^\circ$ , recordando que, en los estímulos visuales presentados, cada  $180^\circ$  se encuentra la misma orientación del estímulo, pero con dirección de movimiento opuesta. Las neuronas cuyas respuestas a los estímulos visuales se ajustaron a la doble Gaussiana con un valor de  $R^2$  (un parámetro que mide el éxito del ajuste de los datos reales a los datos generados por la función, y que va de 0 a 1) mayor a 0.7 fueron consideradas como neuronas selectivas, por el contrario, las neuronas que no se ajustaron a este parámetro se consideraron no selectivas (Fig. 12 A).

Como resultado de este análisis, encontramos que en animales silvestres 38 de las 58 neuronas moduladas resultaron ser selectivas (**correspondiente a 65.52%**), mientras que en los heterocigotos fueron 49 neuronas selectivas de las 72 moduladas (**correspondiente a 68.06%**). Esta diferencia en las proporciones no

resultó ser estadísticamente significativa (Fig. 12B). Sin embargo, cabe mencionar que las neuronas de los ratones heterocigotos se ajustaron con mayor precisión a la curva de la función Gaussiana, es decir, sus valores de  $R^2$  son mayores (**0.9115 ± 0.014**) en comparación de las células de los ratones silvestres (**0.8615 ± 0.017**) (Fig. 12C).

Por otra parte, se midió la selectividad a la orientación que cada neurona selectiva presenta ante los estímulos, mediante el índice de selectividad a la orientación, I.S.O (véase sección 5.6 de *Materiales y métodos*). Encontramos que los ratones heterocigotos presentan un mayor índice de selectividad a la orientación (**0.8507 ± 0.01877**) en comparación a los ratones silvestre (**0.70798 ± 0.03324**) (Fig. 12D), mostrando así que las neuronas del grupo experimental son más selectivas a la orientación de los estímulos presentados.

También se midió la selectividad a la dirección del movimiento de los estímulos visuales. Para esto, se utilizó el índice de selectividad a la dirección, I.S.D. (véase sección 5.6 de *Materiales y métodos*) para medir este parámetro. Los datos muestran que el I.S.D. de las neuronas de los ratones silvestres no es diferente a la de los ratones heterocigotoss (**0.4567 ± 0.05365** silvestres y **0.4724 ± 0.0433** heterocigotos) (Fig. 12E).



**Figura 12. Selectividad de las neuronas a la orientación y a la dirección de los estímulos visuales.** **A)** Ajuste de la actividad neuronal evocada por los distintos estímulos visuales a una función doble Gaussiana. Se muestran ejemplos de neuronas selectivas (panel derecho) que se ajusta a la función con un valor de  $R^2=0.926$  y neuronas no selectivas (panel izquierdo) cuyo valor de  $R^2=0.926$ . Las líneas punteadas representan los datos y las líneas continuas azules el ajuste. **B)** Proporción de neuronas selectivas y no selectivas en animales silvestres y heterocigotos. Prueba exacta de Fisher,  $P = 0.8517$ . **C)** Nivel de precisión de ajuste de los datos reales a la función doble Gaussiana. Prueba de U de Mann-Whitney \*  $P=0.0179$   $P=0.0017$ . WT  $n = 38$  neuronas de 7 ratones, HET  $n = 49$  neuronas de 5 ratones. **D)** Selectividad a la orientación de las neuronas selectivas. Los histogramas muestran la distribución del índice de selectividad a la orientación (I.S.O.) de ratones silvestres (panel izquierdo superior) y de ratones heterocigotos (panel izquierdo inferior). El diagrama de cajas y bigotes (panel derecho) muestra la comparación de las distribuciones graficadas en los paneles izquierdos. Prueba de U de Mann-Whitney, \*  $P=0.0017$ . WT  $n = 38$  neuronas de 7 ratones, HET  $n = 49$  neuronas de 5 ratones. **E)** Selectividad a la dirección de las células selectivas. Los histogramas y el diagrama de cajas y bigotes muestran lo mismo que en C, pero para el índice de selectividad a la dirección (I.S.D.). Prueba de U de Mann-Whitney N.S.  $P=0.80$ .

Estos datos demuestran por primera vez que las neuronas de los ratones heterocigotos tienen una mayor selectividad a la orientación de los estímulos visuales, es decir, que poseen una mayor cantidad de neuronas que responden de

forma preferencial o exclusiva a una orientación en particular, en comparación de las neuronas de ratones silvestres. Sin embargo, no se encontró diferencia en la selectividad a la dirección entre los grupos experimentales.

## 7. Discusión

Se ha documentado que individuos con síndrome de espectro autista muestran mayor percepción visual (Samson et al., 2012; Keehn et al., 2008), además de alteraciones en la conectividad (Hahamy, et al., 2015). Sin embargo, se desconocen los mecanismos neuronales que causan estas alteraciones.

Gracias a los modelos genéticos animales diseñados a partir de las mutaciones detectadas en pacientes humanos, actualmente es posible estudiar y tratar de dilucidar las relaciones entre las alteraciones neuronales, el comportamiento y las alteraciones moleculares en ciertos trastornos del espectro autista.

En este proyecto utilizamos un modelo genético de autismo, causado por la haploinsuficiencia del gen *Shank3* (Bozdagi et al., 2010), para estudiar si la carencia de la proteína SHANK3 en las sinapsis glutamatérgicas promueve una alteración de la actividad neuronal de la corteza visual en ratones haploinsuficientes de *Shank3*.

Por medio de microscopía de excitación de dos fotones *in vivo*, en modo de cabeza fija, analizamos la actividad de las neuronas de la capa 2/3 de la corteza visual primaria de ratones haploinsuficientes de *Shank3* (SHANK3<sup>+/-</sup>) y ratones

silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) de la misma cepa. Se sabe que las neuronas de corteza visual primaria de ratones responden a orientación, dirección y contraste (Niell & Stryker, 2008; Chen et al., 2013; Sun et al., 2016). Derivado de estos estudios nos dimos a la tarea de evaluar la respuesta de las neuronas de corteza visual primaria en nuestro modelo genético de autismo y ratones normales en respuesta a estímulos visuales con diferentes orientaciones y movimiento.

Vale la pena mencionar que todos los experimentos fueron a doble ciego, sin conocer el genotipo de los ratones hasta posterior al análisis de datos. Nuestros datos muestran que la expresión del sensor de calcio GCaMP6f es igual en ambos genotipos. Y que neuronas de ratones heterocigotos responden a diferentes estímulos visuales a través de transitorios de calcio como ocurre en neuronas de ratones silvestres, demostrando que la haploinsuficiencia de *Shank3* no afecta la expresión y la actividad de GCaMP6f.

Por otra parte, para evaluar la respuesta neuronal a los diferentes estímulos, se consideraron sólo las neuronas moduladas, es decir, neuronas que respondieran positivamente a los estímulos visuales, mientras que las neuronas que no cumplieran este criterio fueron consideradas no moduladas, esto de acuerdo a los trabajos de Chen y Sun (Chen et al., 2013; Sun et al., 2016). Respecto a esto, encontramos una mayor proporción de neuronas moduladas en los ratones heterocigotos en comparación a los ratones silvestres. Y por los resultados previos descartamos que sea el número de neuronas que expresan GCaMP6f pues en este

caso no hubo diferencias entre los genotipos. Así, demostramos que la proporción de neuronas que responden a los estímulos visuales es mayor en los ratones heterocigotos.

Sin embargo, cuando se evaluó la respuesta específica de cada neurona a los diferentes estímulos, encontramos que las neuronas de los ratones silvestres responden preferencialmente a ciertos ángulos, como ha sido descrito por otros grupos (Andermann, et al., 2010; Bachatene et al., 2016) mientras que las neuronas de los ratones heterocigotos no responden a algún estímulo en particular. Además, a nivel poblacional hay una menor actividad neuronal en los ratones heterocigotos que en los ratones silvestres, esta es la primera vez que se mide la actividad neuronal en este modelo de autismo. Al respecto, la información que se tiene es derivada de pacientes humanos con autismo, donde se ha reportado una mayor actividad neuronal en áreas corticales relacionadas con el procesamiento visual y la experiencia, por el contrario en corteza frontal detectaron una menor actividad en autistas, sugiriendo que puede ser consecuencia de alteraciones en la plasticidad sináptica durante el desarrollo neuronal (Samson et al., 2012).

Por otro lado, cuantificamos la amplitud del cambio en la fluorescencia respecto a la fluorescencia basal ( $\Delta F/F_0$ ), y observamos que la amplitud de las respuestas tiende a ser mayor en ratones heterocigotos, sin embargo, no es diferente significativamente. Esta mayor tendencia en la amplitud se puede deber a una mayor frecuencia de potenciales de acción (Chen et al., 2013), por lo que

parecería que, en estos ratones, hay un incremento en el número de potenciales de acción evocados por la estimulación visual.

Además, las neuronas de los ratones heterocigotos responden a un menor número de estímulos, lo cual sugiere que pueden presentar una mayor selectividad. Al respecto, evaluamos dos parámetros para determinar la selectividad de las neuronas, el Índice de Selectividad a la Orientación (ISO) y el Índice de Selectividad a la Dirección (ISD). A partir de estos análisis observamos de manera poblacional que la proporción de neuronas selectivas no es diferente entre los dos genotipos.

Sin embargo, las neuronas de ratones heterocigotos muestran una mayor selectividad a la orientación de los estímulos, en comparación a las neuronas de ratones silvestres. Al respecto, se ha demostrado que la selectividad a la orientación de los estímulos visuales proviene del núcleo geniculado lateral dorsal (dLGN) del tálamo, el cual conecta con L2/3 a través de L4 de corteza visual (Sun et al., 2016; Lien & Scanziani, 2013), por lo que se debe considerar que las diferencias en la selectividad a la orientación en los ratones heterocigotos pueden estar dadas por alteraciones en este circuito, específicamente por la modulación de la vía “bottom-up” de L2/3 encargada de procesar las señales sensoriales provenientes de tálamo (Makino & Komiyama, 2015). No obstante, no podemos descartar una alteración en el balance de las conexiones excitatorias e inhibitorias, siendo estas últimas las posibles responsables de la sintonización de la respuesta a la orientación en V1 (Atallah et al., 2012; N. R. Wilson, et al., 2012; Lee et al., 2012).

Por otra parte, de acuerdo a reportes previos las neuronas de L2/3 no presentan una selectividad marcada a la dirección en ratones normales (Sun et al., 2016) ni en ratones heterocigotos, esto puede deberse a que la selectividad a la dirección puede ser generada en las células ganglionares de la retina, las cuales se sabe responden preferencialmente al movimiento, que operan dentro de microcircuitos independientes del procesamiento neuronal (Barlow & Hill, 1963 (Demb, 2007; Vaney, et al., 2012). En este caso, habría que considerar que las células de la retina, al menos las células ganglionares, no se ven afectadas por la haploinsuficiencia de *Shank3*.

En su conjunto, estos datos demuestran por primera vez que la actividad de las neuronas de L2/3 de corteza visual se ve alterada en ratones haploinsuficientes de *Shank3*. Además, estos datos sugieren que probablemente las entradas sensoriales, es decir, las células de la retina no se vean afectadas en nuestro modelo de autismo, pues no se detectaron diferencias en la selectividad a la dirección. Por el contrario, el procesamiento neuronal o los circuitos neuronales pueden estar alterados en nuestro modelo genético de autismo, pues observamos una mayor selectividad a la orientación, lo cual requiere integración de información en la vía “bottom-up” de la corteza visual primaria. Esto hace sentido si consideramos que la expresión de *SHANK3* se da en las sinapsis glutamatérgicas, lo cual puede alterar la respuesta sináptica y consecuentemente la actividad neuronal.

## 8. Conclusión

Evaluando la actividad neuronal por medio de imagenología de calcio con GCaMP6f a través de microscopía de excitación de dos fotones *in vivo* y el sistema de cabeza fija, encontramos que las neuronas de ratones heterocigotos presentan una mayor selectividad a la orientación de los estímulos en comparación a los ratones silvestres. Por el contrario, no encontramos diferencias en la selectividad a la dirección. Esto sugiere que en los ratones heterocigotos, existe una alteración a nivel de procesamiento neuronal en la vía “bottom-up” de corteza visual, que es la responsable de codificar la selectividad a la orientación, y que probablemente el sistema sensorial en este modelo se mantenga sin alteraciones, dado que no se observaron diferencias en la selectividad a la dirección, la cual está dada por las células ganglionares de retina.

Estos datos demuestran por primera vez que la haploinsuficiencia del gen *Shank3* ocasiona alteraciones en la actividad neuronal de la corteza visual, alteraciones que podrían estar presentes en pacientes humanos con Síndrome de Phelan-McDermid, tal como se ha observado en otros pacientes con trastorno de espectro autista. Además, confirman la hipótesis planteada en este proyecto.

## Bibliografía

- Andermann, M. L., Kerlin, A. M., & Reid, R. C. (2010). Chronic cellular imaging of mouse visual cortex during operant behavior and passive viewing. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4, 3. doi:10.3389/fncel.2010.00003
- Atallah, B. V., Bruns, W., Carandini, M., & Scanziani, M. (2012). Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron*, 73(1), 159–170. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.013
- Bachatene, L., Bharmauria, V., Cattan, S., Chanauria, N., Etindele-Sosso, F. A., & Molotchnikoff, S. (2016). Functional synchrony and stimulus selectivity of visual cortical units: Comparison between cats and mice. *Neuroscience*, 337, 331–338. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.09.030
- Barlow, H. B., & Hill, R. M. (1963). Selective sensitivity to direction of movement in ganglion cells of the rabbit retina. *Science*, 139(3553), 412–414.
- Belmonte, M. K., Cook, E. H., Anderson, G. M., Rubenstein, J. L. R., Greenough, W. T., Beckel-Mitchener, A., ... Tierney, E. (2004). Autism as a disorder of neural information processing: directions for research and targets for therapy. *Molecular Psychiatry*, 9(7), 646–663. doi:10.1038/sj.mp.4001499
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(9), 551–563. doi:10.1038/nrn3992
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D. L., Takahashi, N., ... Buxbaum, J. D. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular Autism*, 1(1), 15. doi:10.1186/2040-2392-1-15
- Broussard, G. J., Liang, R., & Tian, L. (2014). Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7. doi:10.3389/fnmol.2014.00097
- Carandini, M., & Ferster, D. (2000). Membrane potential and firing rate in cat primary visual cortex. *The Journal of Neuroscience*, 20(1), 470–484.
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., ... Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. doi:10.1038/nature12354
- Demb, J. B. (2007). Cellular mechanisms for direction selectivity in the retina. *Neuron*, 55(2), 179–186. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.001
- Dinstein, I., Heeger, D. J., Lorenzi, L., Minshew, N. J., Malach, R., & Behrmann, M. (2012). Unreliable evoked responses in autism. *Neuron*, 75(6), 981–991. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.026

- Dinstein, I., Pierce, K., Eyer, L., Solso, S., Malach, R., Behrmann, M., & Courchesne, E. (2011). Disrupted neural synchronization in toddlers with autism. *Neuron*, *70*(6), 1218–1225. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.018
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., ... Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, *46*(8), 881–885. doi:10.1038/ng.3039
- Glickfeld, L. L., Andermann, M. L., Bonin, V., & Reid, R. C. (2013). Cortico-cortical projections in mouse visual cortex are functionally target specific. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 219–226. doi:10.1038/nn.3300
- Guo, Z. V., Hires, S. A., Li, N., O'Connor, D. H., Komiyama, T., Ophir, E., ... Svoboda, K. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *Plos One*, *9*(2), e88678. doi:10.1371/journal.pone.0088678
- Hahamy, A., Behrmann, M., & Malach, R. (2015). The idiosyncratic brain: distortion of spontaneous connectivity patterns in autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*, *18*(2), 302–309. doi:10.1038/nn.3919
- Han, Q., Kim, Y. H., Wang, X., Liu, D., Zhang, Z.-J., Bey, A. L., ... Ji, R.-R. (2016). SHANK3 Deficiency Impairs Heat Hyperalgesia and TRPV1 Signaling in Primary Sensory Neurons. *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2016.11.007
- Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D. K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S. B., ... Wilbrecht, L. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nature Protocols*, *4*(8), 1128–1144. doi:10.1038/nprot.2009.89
- Hübener, M. (2003). Mouse visual cortex. *Current opinion in neurobiology*, *13*(4), 413-420. doi:10.1016/S0959-4388(03)00102-8
- Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Liu, S., & Powell, C. M. (2016). Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in Shank3 Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research*, *9*(3), 350–375. doi:10.1002/aur.1529
- Jiang, Y.-H., & Ehlers, M. D. (2013). Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron*, *78*(1), 8–27. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.016
- Keehn, B., Brenner, L., Palmer, E., Lincoln, A. J., & Müller, R.-A. (2008). Functional brain organization for visual search in ASD. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *14*(6), 990–1003. doi:10.1017/S1355617708081356
- Kerlin, A. M., Andermann, M. L., Berezovskii, V. K., & Reid, R. C. (2010). Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex. *Neuron*, *67*(5), 858–871. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.002
- Lee, J., Chung, C., Ha, S., Lee, D., Kim, D.-Y., Kim, H., & Kim, E. (2015). Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 94. doi:10.3389/fncel.2015.00094

- Lee, P. S., Foss-Feig, J., Henderson, J. G., Kenworthy, L. E., Gilotty, L., Gaillard, W. D., & Vaidya, C. J. (2007). Atypical neural substrates of Embedded Figures Task performance in children with Autism Spectrum Disorder. *Neuroimage*, *38*(1), 184–193. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.07.013
- Lee, S.-H., Kwan, A. C., Zhang, S., Phoumthippavong, V., Flannery, J. G., Masmanidis, S. C., ... Dan, Y. (2012). Activation of specific interneurons improves V1 feature selectivity and visual perception. *Nature*, *488*(7411), 379–383. doi:10.1038/nature11312
- Lien, A. D., & Scanziani, M. (2013). Tuned thalamic excitation is amplified by visual cortical circuits. *Nature Neuroscience*, *16*(9), 1315–1323. doi:10.1038/nn.3488
- Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J. I., Suh, P. G., Sheng, M., & Kim, E. (1999). Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(41), 29510–29518.
- Makino, H., & Komiyama, T. (2015). Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex. *Nature Neuroscience*, *18*(8), 1116–1122. doi:10.1038/nn.4061
- Mieses, A. M., Tavassoli, T., Li, E., Soorya, L., Lurie, S., Wang, A. T., ... Kolevzon, A. (2016). Brief Report: Sensory Reactivity in Children with Phelan-McDermid Syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *46*(7), 2508–2513. doi:10.1007/s10803-016-2754-0
- Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(3), 147–157. doi:10.1038/nrn.2016.183
- Niell, C. M., & Stryker, M. P. (2008). Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *The Journal of Neuroscience*, *28*(30), 7520–7536. doi:10.1523/JNEUROSCI.0623-08.2008
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., ... Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, *472*(7344), 437–442. doi:10.1038/nature09965
- Priebe, N. J., & McGee, A. W. (2014). Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. *Frontiers in neural circuits*, *8*. doi:10.3389/fncir.2014.00123
- Samson, F., Mottron, L., Soulières, I., & Zeffiro, T. A. (2012). Enhanced visual functioning in autism: an ALE meta-analysis. *Human Brain Mapping*, *33*(7), 1553–1581. doi:10.1002/hbm.21307
- Schroeder, J. C., Reim, D., Boeckers, T. M., & Schmeisser, M. J. (2017). Genetic animal models for autism spectrum disorder. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *30*, 311–324. doi:10.1007/7854\_2015\_407

- Sheng, M., & Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 11), 1851–1856.
- Sun, W., Tan, Z., Menseh, B. D., & Ji, N. (2016). Thalamus provides layer 4 of primary visual cortex with orientation- and direction-tuned inputs. *Nature Neuroscience*, 19(2), 308–315. doi:10.1038/nn.4196
- Thévenaz, P., Ruttimann, U. E., & Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society*, 7(1), 27–41. doi:10.1109/83.650848
- Vaney, D. I., Sivyer, B., & Taylor, W. R. (2012). Direction selectivity in the retina: symmetry and asymmetry in structure and function. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(3), 194–208. doi:10.1038/nrn3165
- Wang, S., Jiang, M., Duchesne, X. M., Laugeson, E. A., Kennedy, D. P., Adolphs, R., & Zhao, Q. (2015). Atypical Visual Saliency in Autism Spectrum Disorder Quantified through Model-Based Eye Tracking. *Neuron*, 88(3), 604–616. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.042
- Wang, X., Xu, Q., Bey, A. L., Lee, Y., & Jiang, Y.-H. (2014). Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice. *Molecular Autism*, 5, 30. doi:10.1186/2040-2392-5-30
- Wilks, T. A., Harvey, A. R., & Rodger, J. (2013). Seeing with Two Eyes: Integration of Binocular Retinal Projections in the Brain. In *Functional Brain Mapping and the Endeavor to Understand the Working Brain*. InTech. doi: 10.5772/56491
- Wilson, H. L., Wong, A. C. C., Shaw, S. R., Tse, W.-Y., Stapleton, G. A., Phelan, M. C., ... McDermid, H. E. (2003). Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *Journal of Medical Genetics*, 40(8), 575–584. doi:10.1136/jmg.40.8.575
- Wilson, N. R., Runyan, C. A., Wang, F. L., & Sur, M. (2012). Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature*, 488(7411), 343–348. doi:10.1038/nature11347
- Yang, M., Bozdagi, O., Scattoni, M. L., Wöhr, M., Roulet, F. I., Katz, A. M., ... Crawley, J. N. (2012). Reduced excitatory neurotransmission and mild autism-relevant phenotypes in adolescent Shank3 null mutant mice. *The Journal of Neuroscience*, 32(19), 6525–6541. doi:10.1523/JNEUROSCI.6107-11.2012
- Zoghbi, H. Y., & Bear, M. F. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). doi:10.1101/cshperspect.a009886