



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**ACTIVIDAD NEURONAL EN LA CORTEZA VISUAL  
DE RATONES SHANK3<sup>+/-</sup> EN RESPUESTA A UNA  
TAREA VISUAL DE SOBRE-ESPECIFICIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

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

**EMILIANO JIMÉNEZ MÁRQUEZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DOCTORA YAZMÍN RAMIRO CORTÉS  
REVISOR:  
DOCTOR OCTAVIO CESAR GARCÍA  
GONZÁLEZ**

**CIUDAD DE MÉXICO 2019**



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.

## **Agradecimientos académicos**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Plasticidad Sináptica y Estructural a cargo de la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, en el departamento de Neurodesarrollo y Fisiología de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto Ciencia Básica 254878 y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM-IA201915).

SED GRATIAS AD QUISSUE MAXIME ...

PARENTES ENIM SINE DILECTIONE PATIENTIA IMPERDIET ID POTUISSENT. PRAESERTIM QUIA MATER MEA NON ATTIGIT ANIMAM MEAM, UT VIDEREM PRINCIPIMUM NOVA ADVENTUM.

SOROR MEA, SINE AUXILIO FUISSET, NUMQUAM POTEST EXPLICARE QUID FACIAM TIBI ANTEQUAM USU PUBLICO EXPERS EST SIVE MALUM ILLUD FACIO IOCOS SICUT A PUNCTUM EXPLICARE.

MIHI AVIS CURANDO AETERNUS.

PROXIMUS IN OMNI VITA IUCUNDIUS RIDICULAM MOMENTA AMICITIA. PRAESERTIM «AD CHILANGA LUDUM PSYCHOLOGIA» (JOSE, ANGEL, SEBASTIAN, LUIS, CASANDRA, JÉSUS, OKSANA, CARLOS ET MARTIN).

QUI NON AMICORUM TEMPORIBUS AD FREQUENTEM SEMPER. PAULINA GRATIAS, ALDO, ROBERTO, ADRIANA ET KARINA.

CETERIS FAMILIAE COLLEGAE (ET SOCIUS PRIORIS) LABORATORIUM: GERARDO, CARLOS, BEATRIZ, CECILIA, ARIZBETH ET LUIS. GRATIAS SUM ILLIS SICUT HOMO INDICAT APPLICANDAM ET PHYSICUS. EGO ETIAM VOLO AD GRATIAS AGO OMNES SODALES AD BL-CCII SEMPITERNUM ERIT PRAESENS CUM AMICIS ATQUE PRAECEPTORIBUS CONFERATIS. PRAESERTIM IVÁN EGO GRATIAS AGO HECTOR, ASAI ET EDGAR.

AD AMICORUM VEL COLLEGARUM COR MEUM IFC, QUIA NUMQUAM COGITATUR RES DOCUIT ME DISCERE. GRATIAS MARTIN, MARIANA, ET MEMO.

DOCENTIUM ME ET MAGISTRIS COLLEGII PEDE. GRATIAS VOBIS PRO OMNI PATIENTIA.

SYNODUS MIHI MAXIME DOCTORES ANTONIO ZAINOS ET GABRIEL GUTIERREZ DUCIBUS ORNABIT CONSILIUM UTILE.

FATUEL TECUAPETLA AUTEM DR. NAM CONSULTANT ASSIDUE FUERIT IN HOC PROJECT ET DOCENDO ET LOQUI MATLABE.

DENIQUE DR. YAZMÍN RAMIRO AD ME, ET DET MIHI CREDENS ILLORUM SUBSIDIUM. GRATIAS AD DR. YAZMÍN TANTUM SOMNIARE, QUOD POTUI IRE LOCIS.

EGO SIMILIS GRATIAS AGO ET OMNIBUS, QUI NEMPE AD HANC SECTIONEM DIGNUM GIGNIT.

PLVS VLTRA.

# Índice

## RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA .....	1
1.1.2 SÍNDROME DE PHELA-NMCDERMID.....	2
1.2 SHANK3 .....	3
1.3 MODELO MURINO DEL SÍNDROME DE PHELAN-MCDERMID .....	5
1.4 ALTERACIONES EN EL PROCESAMIENTO NEURONAL DE LA INFORMACIÓN VISUAL EN EL AUTISMO .....	6
1.5 PSICOFÍSICA Y NEUROMETRÍA .....	9
1.6 ORGANIZACIÓN DE LA VÍA VISUAL Y FLUJO DE LA INFORMACIÓN VISUAL EN RATONES .....	11
1.7 MICROSCOPIA DE EXCITACIÓN DE DOS FOTONES Y SENSORES DE CALCIO GENÉTICAMENTE CODIFICADOS .....	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	16
3. HIPÓTESIS .....	17
4. OBJETIVO GENERAL .....	17
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1 ANIMALES .....	18
5.2 VENTANAS CRANEALES, INFECCIONES VIRALES Y LA MODALIDAD CABEZA FIJA.....	18
5.3 RECUPERACIÓN POST QUIRÚRGICA Y HABITUACIÓN A LA MODALIDAD CABEZA FIJA.....	21
5.4 MICROSCOPIA DE EXCITACIÓN DE DOS FOTONES EN ANIMALES DESPIERTOS .....	22
5.5 TAREA DE DETECCIÓN DE PATRONES VISUALES .....	23
5.6 HISTOLOGÍA .....	25
5.7 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y OBTENCIÓN DE SEÑALES.....	26
5.8 EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DE LAS NEURONAS ANTE LOS DIVERSOS TIPOS DE ESTÍMULOS .....	27
5.9 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS ANIMALES DURANTE LA TAREA DE DISCRIMINACIÓN .....	28
5.10 ESTADÍSTICA .....	29
6. RESULTADOS .....	30
6.1 LOS RATONES SHANK3 MUESTRAN INCAPACIDAD PARA DETECTAR EL CAMBIO EN LA CONTINGENCIA .....	30
6.2 CAMBIOS EN LA PROPORCIÓN DE NEURONAS SELECTIVAS DURANTE EL APRENDIZAJE DE LA TAREA VISUAL.....	36
6.3 CAMBIOS EN LA AMPLITUD DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO EN RESPUESTA A LOS DISTINTOS COMPONENTES DE LA TAREA VISUAL.....	39
6.4 CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD NEURONAL EN RESPUESTA A LA TAREA VISUAL .....	42
6.5 LATENCIAS DE RESPUESTA DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO ANTE LOS DIFERENTES COMPONENTES DE LA TAREA VISUAL .....	46
7. DISCUSION .....	52
8. CONCLUSIONES .....	56
9. GLOSARIO .....	58
10. REFERENCIAS .....	60

## RESUMEN

El Trastorno del espectro autista (TEA) es considerado un desorden del neurodesarrollo. Se caracteriza por deficiencias en la comunicación verbal y no verbal, deficiencias en interacción social y conductas repetitivas o estereotipadas. Se desconocen las causas del TEA, sin embargo, se ha demostrado que en el 20% de los casos existe un componente genético asociado. Algunos de los genes afectados codifican para proteínas que participan en la estructura y función sináptica, por lo que algunos trastornos han sido denominados *sinaptopatías*, un ejemplo de lo anterior es el síndrome Phelan-McDermid. Este síndrome es causado por la delección del gen *Shank3* en un solo alelo. A la fecha es uno de los modelos mejor caracterizados para el estudio del trastorno del espectro autista, además es el único que induce el fenotipo tipo autista causado por una delección monogenética específica.

El gen *Shank3* codifica para la proteína del mismo nombre (SHANK3), que se localiza en la densidad post-sináptica de las neuronas glutamatérgicas. La proteína SHANK3 presenta dominios de unión proteicos para la interacción con los receptores glutamatérgicos, los cuales están estrechamente relacionados con los procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje.

Las personas diagnosticadas con TEA presentan alteraciones en la actividad neuronal relacionada con áreas de procesamiento visual, así como la presencia de sobre-especificidad del aprendizaje perceptual. Esta es definida como una adquisición deficiente de la información que refleja inflexibilidad conductual y una falla en los mecanismos cognitivos que permiten generalizar una regla. En el modelo murino, datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que ratones deficientes de SHANK3 presentan alteraciones en la actividad neuronal de corteza visual primaria. Considerando estos antecedentes, en este trabajo hipotetizamos que la haploinsuficiencia de *Shank3* podría estar asociada a la inflexibilidad cognitiva observada en el TEA, por lo tanto, el modelo de autismo es más propenso a desarrollar sobre especificidad del aprendizaje en una tarea visual, y dificultad en aprender una nueva tarea visual. Nuestros resultados muestran que los ratones SHANK3 desarrollan sobre especificidad del aprendizaje, mientras que los ratones silvestres no desarrollan este tipo de conducta. Respecto a la actividad neuronal, observamos diferencias entre las proporciones de neuronas selectivas en ratones SHANK3 y ratones silvestres en distintas etapas de la tarea. Por lo tanto, podemos concluir que a la par de la existencia de problemas en el aprendizaje, existen alteraciones en la actividad neuronal asociada al procesamiento de información en los ratones SHANK3. Lo cual corrobora nuestra hipótesis.

## **1. Introducción**

### **1.1 Trastorno del Espectro Autista**

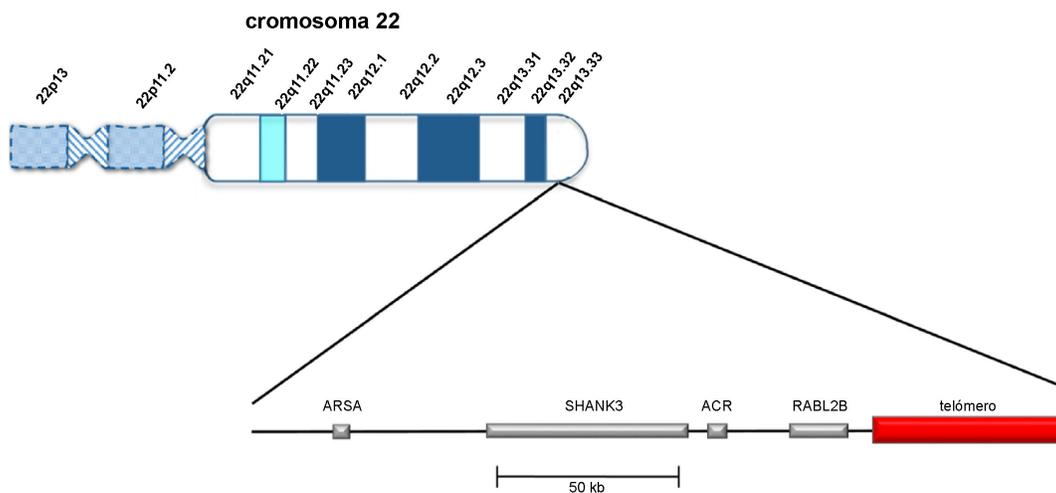
El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un desorden del neurodesarrollo, caracterizado principalmente por deficiencias en el lenguaje verbal y no verbal, deficiencias en la interacción social, conductas estereotipadas y repetitivas (Carbonetto, 2014; Lord, Elsabbagh, Baird, & Veenstra-Vanderweele, 2018). En muchos de los casos los síntomas anteriores tienen asociadas comorbilidades como deficiencia intelectual, epilepsia, dificultades en la motricidad, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, ansiedad, trastornos del sueño y alteraciones en la percepción sensorial, entre otros (Bourgeron, 2015; Phelan & McDermid, 2011; Sala, Vicidomini, Bigi, Mossa, & Verpelli, 2015). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia de este trastorno es de 1 en 160 infantes de todo el mundo (World Health Organization, 2018).

Las causas del TEA se desconocen, sin embargo, gracias a las herramientas genéticas de diagnóstico, se ha reportado que existe un componente genético importante, se calcula que la heredabilidad de factores genéticos que predisponen al autismo es de 52% (Gaugler et al., 2014). Los re-arreglos cromosómicos, las variaciones en el número de copias de un gen o las variaciones en la codificación de secuencias explican más del 20% de los casos clínicos (Huguet, Ey, Bourgeron, & genetics, 2013; Leblond et al., 2014). La mayoría de los genes afectados codifican para proteínas que participan en la formación de circuitos neuronales, usualmente proteínas estructurales (neuroliginas y neuroexinas) y funcionales de las sinapsis, es por lo que se ha acuñado el término sinaptopatías (ver glosario) (Huguet et al., 2013; Zoghbi & Bear, 2012).

### 1.1.2 Síndrome Phelan-McDermid

El síndrome Phelan-McDermid es un ejemplo de sinaptopatía, considerado como parte del TEA. Los pacientes con este síndrome muestran además de los signos característicos del TEA, un retraso o no de desarrollo del habla, déficit intelectual (de moderado a severo según el caso), poco contacto visual, ansiedad, conductas auto estimulatorias, hipotonía neonatal, dimorfismos cráneo faciales menores, menor sensibilidad al dolor, epilepsia, entre otros (Han et al., 2016; Phelan & McDermid, 2011; Schmeisser & Verpelli, 2016).

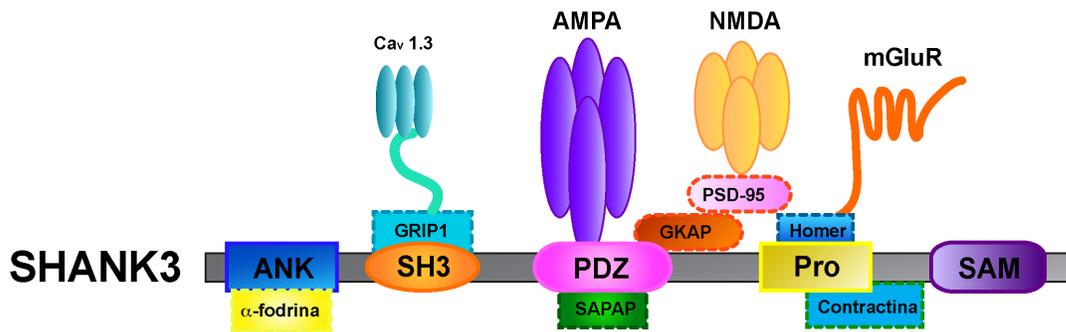
Se cree que la sintomatología asociada a este síndrome es causada por una deleción en el brazo q del cromosoma 22 de humanos, provocando la perdida de toda la región, lo que se puede traducir en una pérdida de aproximadamente 90 genes (Phelan & McDermid, 2011). El tamaño de las deleciones en este síndrome es muy variable, puede ir de 0.1 a 10 Mb (Dhar et al., 2010; Wilson et al., 2003). Sin embargo, el común denominador en todos los casos reportados es la haploinsuficiencia (ver glosario) del gen Shank3 (Fig. 1).



**Figura 1. Esquema del cromosoma 22 y deleción de Shank3.** La deleción puede incluir los genes ARSA, ACR, RABL2B SHANK3 y el telómero. Modificado de (Costales and Kolevzon, 2015).

## 1.2 SHANK3

El gen Shank3 se encuentra en el cromosoma 22, en la región q13.3. Abarca cerca de 60 kb de ADN, tiene 22 exones. Este gen codifica para la proteína SHANK3, que debido a splicing alternativo puede traducirse en seis isoformas (SHANK3a, SHANK3b, SHANK3c, SHANK3d, SHANK3e y SHANK3f). Esta proteína es miembro de la familia SHANK (ver glosario), esta familia comprende a las proteínas SHANK1, SHANK2 y SHANK3 que son codificadas por los genes Shank1, Shank2 y Shank3 respectivamente. Es una proteína de anclaje de la densidad postsináptica (ver glosario) en neuronas glutamatérgicas. Estructuralmente SHANK3 cuenta con cinco dominios de unión a proteínas, ANK (región de seis repeticiones de anquirina), SH3 (por sus siglas en inglés: Src Homology 3), PDZ, PRO (región rica en prolina) y SAM (por sus siglas en inglés Sterile Alpha Motif) (Carbonetto, 2014; Costales & Kolevzon, 2015; Monteiro & Feng, 2017). El dominio ANK le permite interactuar con el citoesqueleto a través de  $\alpha$ -fodrina, la región SH3 interactúa con la proteína GRIP y con canales de calcio dependientes de voltaje. El dominio PDZ, interactúa de manera directa con los receptores AMPA (ver glosario) y con las proteínas SAPAP1 (por sus siglas en inglés: SAP90/PSD95-associated protein 1”), que a su vez interactúan con los receptores NMDA (ver glosario). En la región rica en prolina (PRO), se une la contractina y la proteína Homer, la cual interactúa con los receptores mGlu (ver glosario). Finalmente se encuentra el dominio SAM, el cual es requerido para la localización de SHANK3 a la densidad postsináptica (ver glosario) (Fig. 2) (Monteiro & Feng, 2017; Naisbitt et al., 1999).



**Figura 2. Esquema de la proteína SHANK3.** El esquema ilustra los dominios de unión a proteínas de SHANK3, repeticiones de anquirina (ANK), SH3, PDZ, región rica en Prolina (Pro) y SAM, y su expresión en la post-sinapsis.

SHANK3 se expresa en grandes cantidades en el corazón, y de forma moderada en el bazo y en el cerebro, en este último se encuentra altamente expresada en sinapsis cortico-estriatales, tálamo, hipocampo y cerebelo (Lim et al., 1999; X. Wang et al., 2011). Existen cinco isoformas de esta proteína que se expresan de forma diferencial en función del momento de desarrollo, tipos celulares o regiones cerebrales (Tabla 1). Además, varían en la composición de los dominios de unión a proteínas que las componen, SHANK3a, SHANK3c, SHANK3d, SHANK3e y SHANK3f contienen los dominios PRO y SAM, mientras que SHANK3b carece de los dominios PRO y SAM; a pesar de esto la ausencia de cualquiera de las isoformas produce el fenotipo conductual antes mencionado (Bozdagi et al., 2010; Carbonetto, 2014; Jiang & Ehlers, 2013).

**Tabla 1.** Se muestran los niveles de expresión relativa de las cinco isoformas de SHANK3 en distintas estructuras del cerebro.

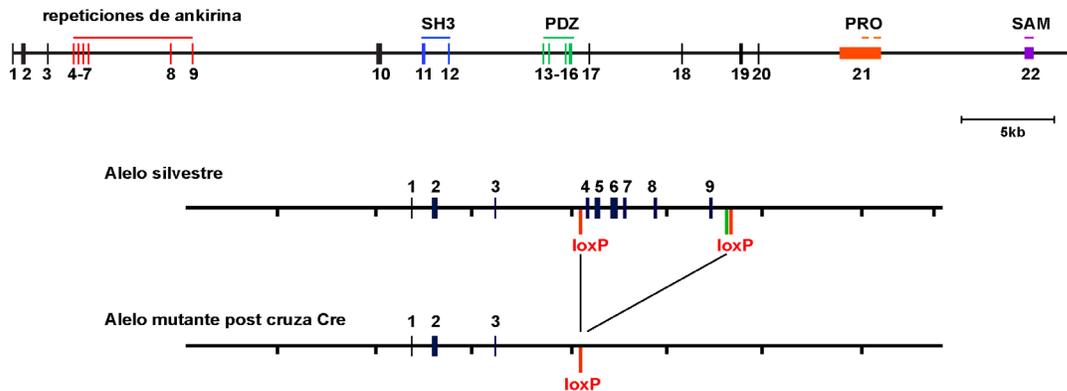
Región Cerebral	SHANK3A	SHANK3B	SHANK3C	SHANK3D	SHANK3E
Cuerpo estriado	alta	baja	baja	baja	alta
Corteza	presente	baja	baja	baja	presente
Hipocampo	presente	baja	baja	bbaja	presente
Tálamo	presente	baja	baja	baja	presente
Amígdala	presente	baja	baja	baja	presente
Cerebelo	baja	baja	alta	alta	baja

### 1.3. Modelo murino del síndrome Phelan-McDermid

Shank3 es un gen muy conservado que se expresa en moscas, peces, ratas, ratones y primates no humanos (Jiang & Ehlers, 2013; Meshalkina et al., 2018; Monteiro & Feng, 2017; Wu et al., 2017; Zhao et al., 2017). A la fecha se han creado ratones con diversas mutaciones en el gen *Shank3* localizado en el cromosoma 15E3 (Monteiro & Feng, 2017). Estas mutaciones incluyen deleciones en el dominio ANK, PDZ o SH3; siendo el dominio de repeticiones de anquirina (ANK) eliminado en todos los modelos existentes. Se considera un modelo de autismo pues los ratones con esta deleción presentan déficits en la interacción social, comportamientos repetitivos y estereotipados, así como algunas vocalizaciones anormales (en menor cantidad, de mayor duración, con más bandas de frecuencia y una mayor modulación entre frecuencias respecto a ratones silvestres) (Jiang & Ehlers, 2013).

Uno de los modelos murinos más cercanos a la mutación reportada en pacientes humanos es aquel en el que la región de repeticiones de anquirina (ANK) es deletado. Este modelo se desarrolló usando el sistema Cre recombinasa, eliminando los exones del 4 al que fueron flanqueados por sitios loxP. Esta porción eliminada en un solo alelo corresponde al dominio repetido de anquirina (ANK) del gen *Shank3*, lo cual impide la transcripción de las isoformas *SHANK3a* y *SHANK3b* (Fig.3). Esta deleción impide que la expresión de SHANK3 sea completa, pues reduce en un 50% la expresión de mRNA/proteína en la densidad post-sináptica (ver glosario) (Bozdagi et al., 2010). La haploinsuficiencia de Shank3 genera un fenotipo conductual “autista” donde los ratones presentan menos interacción entre pares (olfateos ano-genitales y aproximaciones frente a frente), menor número de vocalizaciones ultrasónicas y conductas estereotipadas-repetitivas (acalamiento). Electrofisiológicamente presentan una amplitud disminuida en los mEPCs (por sus siglas en inglés: miniature Excitatory Postsynaptic Currents) (ver glosario) del hipocampo, lo cual implica alteraciones en la neurotransmisión basal de glutamato en una de las estructuras centrales para la consolidación de la

memoria. La plasticidad sináptica (ver glosario) también resulta alterada pues la LTP (por sus siglas en inglés: Long Term Potentiation) es incapaz de mantenerse, al igual que el crecimiento de espinas asociado a potenciación, lo que implica que la plasticidad estructural también se encuentra alterada (Bozdagi et al., 2010).



**Figura 3. 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 Anquirina 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.

#### 1.4 Alteraciones en el procesamiento neuronal de la información visual en el autismo

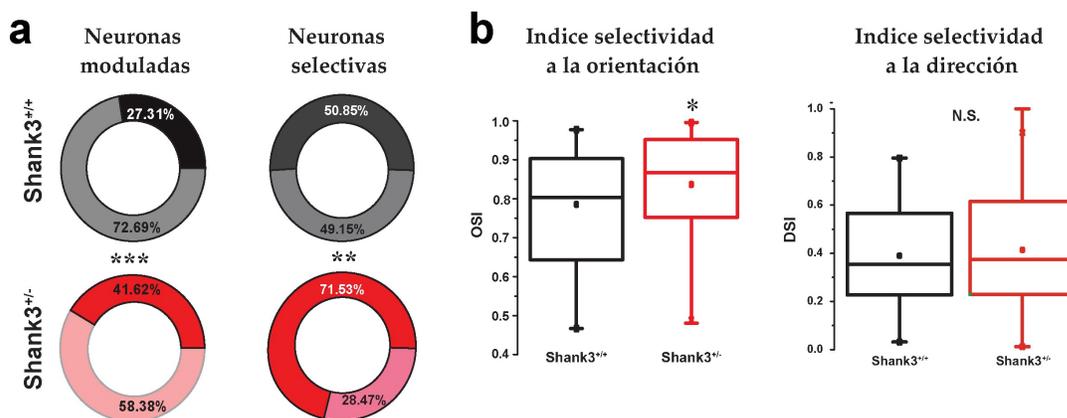
Actualmente el TEA ha sido descrito como un trastorno general del procesamiento neuronal (Belmonte, Allen, et al., 2004; Belmonte, Cook Jr, et al., 2004). Al respecto, avances en la imagenología funcional por resonancia magnética (fMRI) han reportado la existencia de alteraciones de la actividad neuronal ligadas a diversos trastornos neurológicos, uno de ellos, el TEA. Se ha reportado que en pacientes con TEA existe un exceso de activación de las neuronas de las cortezas sensoriales ante estímulos atendidos y no atendidos, es importante destacar que esta activación es poco selectiva; también existen alteraciones en la sincronización interhemisférica en distintas regiones de la corteza cerebral (específicamente en el

Giro Superior Temporal), donde se muestra una baja relación en la actividad de ambos hemisferios; además se hacen presentes alteraciones anatómicas en hipocampo (estructura con una mayor densidad de neuronas), amígdala (en esta estructura también existe una mayor densidad de neuronas) y corteza (donde hay un incremento en la presencia de materia gris) (Belmonte, Allen, et al., 2004; Belmonte, Cook Jr, et al., 2004; Belmonte & Yurgelun-Todd, 2003; Dinstein et al., 2012; Dinstein et al., 2011).

Un meta análisis de ALE (por sus siglas en inglés: Activation Likelihood Estimation) (ver glosario) mostró que las publicaciones de 1995 a 2009 reportaban un incremento de la actividad neuronal en regiones cerebrales relacionadas con la integración visual en comparación con individuos sin autismo (Samson, Mottron, Soulières, & Zeffiro, 2012). También se ha reportado que individuos diagnosticados con TEA presentan un incremento de la actividad neuronal en regiones cerebrales relacionadas con la integración visual en comparación con sujetos humanos sin autismo (Keehn, Shih, Brenner, Townsend, & Müller, 2013; Samson et al., 2012). Además, presentan una atención visual atípica a través de múltiples niveles y categorías de objetos pues los pacientes con TEA tienen un sesgo por el centro de las imágenes sin importar la distribución de los objetos y pasan menos tiempo mirando rostros o los objetos principales dentro de la imagen (S. Wang et al., 2015). Adicionalmente se sugiere que el procesamiento sensorial de “segundo orden” (variaciones en el contraste local o la textura de imágenes) se encuentra afectado pues los pacientes diagnosticados con TEA son incapaces de discriminar estímulos basados en texturas o movimiento, además de mostrar actividad anormal en las vías visuales ventral y dorsal (Baum, Stevenson, & Wallace, 2015; Dumoulin, Baker Jr, Hess, & Evans, 2003). Se ha reportado que los campos receptivos de V2, V3 y V4 son más grandes en personas con TEA en comparación con pacientes sin autismo (Schwarzkopf, Anderson, de Haas, White, & Rees, 2014). Estos reportes sugieren que en el TEA existen alteraciones de la actividad neuronal, siendo la actividad asociada al procesamiento visual una de las más estudiadas. Se desconocen las causas que conllevan a estas alteraciones que a su vez influyen en

las afecciones neurológicas de las personas con autismo, se sugiere que desregulaciones en la estructura sináptica o en la conectividad entre ciertas áreas son las responsables de estas alteraciones.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran alteraciones en la actividad neuronal de la corteza visual primaria en ratones SHANK3. Mediante microscopía de excitación de dos fotones *in vivo* se registró la actividad de V1, gracias a esto sabemos que las proporciones de neuronas moduladas (ver glosario y de neuronas selectivas (ver glosario) a estímulos visuales (patrones de enrejados presentados en distintas orientaciones y direcciones) son mayores respecto a ratones silvestres. Además, observamos que la población de neuronas selectivas esta preferentemente sintonizada a la orientación y no a la dirección (Fig. 4) (Ortiz Cruz, 2017).



**Figura 4. Mayor proporción de neuronas selectivas en ratones SHANK3.** a) Proporción de neuronas selectivas y no selectivas en animales silvestres y SHANK3. 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. b) Índice de selectividad a la orientación y a la dirección Prueba de U de Mann-Whitney N.S.  $P=0.80$ . Ortiz- Cruz, et al., in prep.

Por otro lado, se ha descrito la existencia de alteraciones en el aprendizaje perceptual de pacientes diagnosticados con TEA, además en esta condición la

inflexibilidad (ver glosario) cognitiva es muy frecuente. En pacientes diagnosticados con TEA este fenómeno fue observado experimentalmente usando un protocolo de aprendizaje perceptual (discriminación de texturas) (Harris et al., 2015). En este protocolo los participantes debían juzgar la orientación de tres barras verticales (estímulo diana) respecto a un patrón dominante de barras horizontales (fondo), el estímulo presentado durante la tarea se componía del estímulo diana sobre el fondo y era presentado durante 40 milisegundos, posteriormente un estímulo distractor era presentado durante 100 milisegundos para de nuevo dar paso al estímulo compuesto por el estímulo diana y el fondo, esta tarea se les presentó durante cuatro días, pasado ese tiempo se cambió la locación del estímulo diana y se presentó esta tarea durante cuatro días más. Dos grupos de participantes fueron evaluados, un grupo estaba conformado por pacientes diagnosticados con TEA y el otro por participantes sin algún padecimiento psiquiátrico.

El desempeño de los participantes fue medido por la aparición de respuestas que indicarán la orientación del estímulo diana en función de el intervalo temporal entre la aparición del estímulo y la aparición del estímulo distractor. Se encontró que los tiempos de reacción y el desempeño de ambos grupos no fue distinto mientras el estímulo diana estuvo en la primera locación. Cuando el estímulo diana cambio de lugar se observaron mayores tiempos de reacción y un desempeño menor en los participantes diagnosticados con TEA respecto al grupo control. Este efecto se siguió observando cuatro sesiones después. Estos resultados sugieren la existencia de un fenómeno llamado sobre-especificidad del aprendizaje (ver glosario) (Harris et al., 2016), que es definido como una ineficiente adquisición de la tarea que refleja inflexibilidad cognitiva y una falla en los mecanismos cognitivos que permiten generalizar una regla (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016).

## **1.5 Psicofísica y Neurometría**

La psicofísica es la disciplina encargada de relacionar las propiedades físicas de los

estímulos (luz, sonido, temperatura, etc) con la percepción de estos por parte de un sistema biológico (Armington, 2012; Fechner, 1966). Actualmente es una rama de la psicología ampliamente usada en la investigación de los sistemas perceptuales. En neurociencias es usada para intentar entender como los patrones de actividad eléctrica del cerebro se relacionan con los fenómenos cognitivos, dando origen a una disciplina llamada neurometría. Esto mediante el uso de funciones que relacionan un aspecto cuantitativo de algún estímulo sensorial con un juicio emitido por el sujeto o funciones que relacionan las respuestas neuronales (o conductuales) y los estímulos (Armington, 2012; Fechner, 1966; Read, 2015; Zoccolan & Di Filippo, 2018).

La teoría de detección de señales busca medir la capacidad de un sistema (participante, modelo animal o sistema computacional) para diferenciar estímulos (esta teoría los denomina como señales) de patrones aleatorios (nombrados como ruido) (Stanislaw, Todorov, & computers, 1999). Las elecciones cerradas de un sistema son catalogadas de acuerdo a su capacidad de emitir un juicio correcto acerca de la presencia del estímulo, dándonos la posibilidad de clasificar el comportamiento en Omisiones, Aciertos, Rechazos Correctos y Falsas Alarmas. Esta metodología nos permite inferir objetivamente que tan bueno es un organismo para discriminar y clasificar estímulos.

**Tabla 2.** Clasificación de las respuestas en función de la aparición del estímulo que se pretende detectar.

**Respuesta: “Estimulo Ausente”      Respuesta: “Estimulo Presente”**

<b>Estímulo Presente</b>	Omisión	Acierto
<b>Estímulo Ausente</b>	Rechazo Correcto	Falsa Alarma

Desde mediados del siglo pasado se comenzó a mezclar la psicofísica con la teoría de detección señales, permitiendo analizar el proceso de aprendizaje perceptual de un organismo pues mezclando ambas disciplinas se permite dar una retroalimentación al sujeto. Generalmente los aciertos y los rechazos correctos

llevaran al organismo a ser recompensado de forma positiva y por ende a aumentar la probabilidad de repetición de esa conducta mientras que las Omisiones y Falsas alarmas le proporcionaran un castigo, se espera que mientras más veces se repitan esas contingencias (ver glosario) el sujeto sea capaz de discriminar efectivamente entre el estímulo deseado y el ruido proporcionado en la tarea. En investigación del sistema visual se busca que el organismo identifique características de un estímulo particulares (color, contraste, frecuencia espacial, orientación y dirección) (Armington, 2012; Ramesh, Burgess, Sugden, Gyetvan, & Andermann, 2018; Stanislaw & Todorov, 1999).

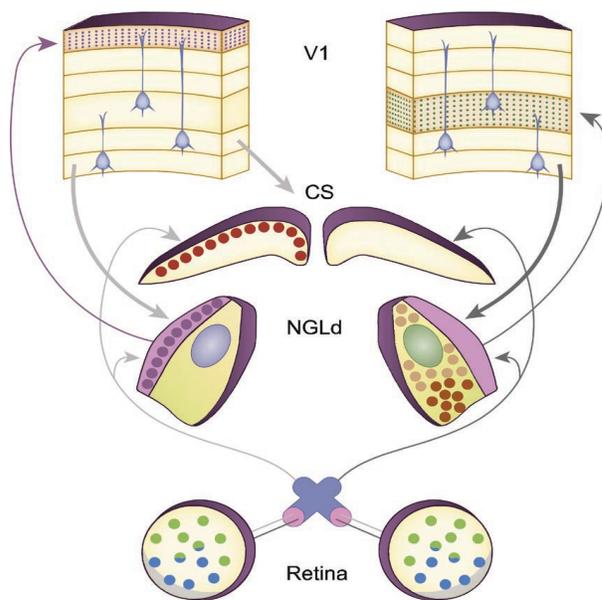
### **1.6 Organización de la vía visual y flujo de la información visual en ratones**

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 ofrece la ventaja de realizar manipulaciones genéticas que permiten la disección anatómica y fisiológica de los circuitos neuronales. Una de las mayores diferencias del sistema visual de 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 (Keck et al., 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 (Keck et al., 2013).

La vía visual comienza en la retina, donde las células ganglionares retinianas envían proyecciones al Núcleo Geniculado Lateral Dorsal y al Colículo Superior, el Núcleo Geniculado Lateral Dorsal envía axones a la Corteza Visual Primaria y esta, a su vez, envía proyecciones de regreso al Colículo Superior (Fig. 5)(Busse, 2018).

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. 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. 5) (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, Tan, Mensh, & Ji, 2016).



**Figura 5. La vía visual de ratón.** La información entra por la retina, donde los fotorreceptores convierten las ondas de luz en impulsos nerviosos. Decusa en el Quiasma Óptico y llega al Núcleo Geniculado Lateral dorsal o al Colículo Superior. Del Núcleo Geniculado Lateral dorsal la información es enviada a las Capas 1 y 4 de la Corteza Visual Primaria (V1). (Busse, 2018).

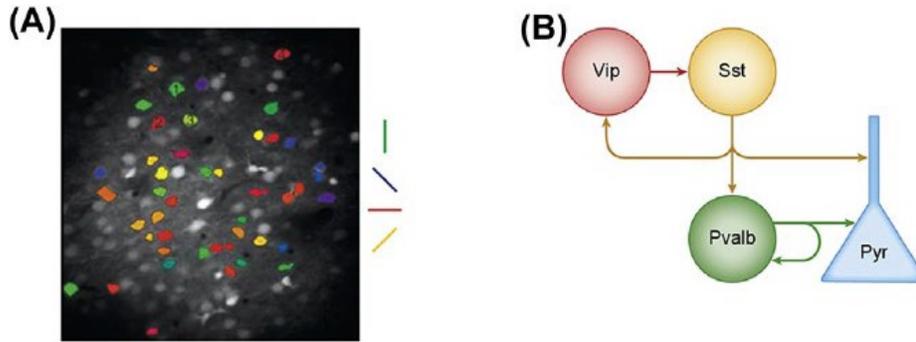
En la retina podemos encontrar tres tipos de fotorreceptores, bastones, conos S (sensibles a luz UV) y conos M (sensibles a luz verde); los bastones son los fotorreceptores que se expresan en una mayor cantidad, proporcionando visión acromática en la mayoría del campo visual del ratón. Existen 12 tipos de células bipolares en la retina del ratón, esta clasificación está basada en los tipos de receptores de glutamato expresados, la morfología y los canales iónicos presentes en ellas. El mismo criterio de clasificación aplica para las células ganglionares resultando en 30 tipos distintos (Busse, 2018; Naarendorp et al., 2010).

En el Núcleo Geniculado Lateral de roedores no existe una cito arquitectura clara, pero se pueden observar dos regiones bioquímicamente distintas pues la región central es positiva a parvoalbumina y la región del caparazón es positiva a

calbindina-D28k. La región central proyecta preferentemente a la capa 4 de la corteza visual primaria y la región del caparazón a las capas 1 y 3 de esa misma corteza (Busse, 2018; C. Chen, Bickford, & Hirsch, 2016; Fitzpatrick, 1996).

El Colículo Superior es una estructura de integración de información multisensorial. En el ratón tiene un volumen mayor al de V1. En la capa superficial es donde las proyecciones de las células ganglionares retinianas son recibidas, esta región tiene aglomerados de células sensibles a distintos componentes espaciales. Esto último permite la creación de “mapas espaciales” pre corticales, estos “mapas” están contruidos con base en la retinotopía y su preferencia es aquella que maximice el flujo óptico (Busse, 2018; Drager & Hubel, 1975; Ito & Feldheim, 2018).

Finalmente, V1 tiene una organización retino tópica (quince áreas han sido identificadas), que se origina de los procesos entrantes desde el núcleo geniculado lateral dorsal, sin embargo, existe poca evidencia de organización columnar (Busse, 2018; Ohki & Reid, 2007). Las agrupaciones de neuronas codificantes ante estímulos visuales se encuentran dispersas de forma aleatoria, a esto se le llama estructura de “sal y pimienta” (Fig. 6) (Busse, 2018). Las células que conforman a esas agrupaciones tienen una respuesta preferencial ante características específicas de los estímulos, como son: orientación, dirección y contraste. A su vez, estas neuronas pueden ser clasificadas de acuerdo con un criterio bioquímico donde existen neuronas Piramidales (positivas a CaMKII), neuronas positivas a PV (Parvoalbumina), SOM (Somatostatina) y VIP (por sus siglas en inglés: Vaso Intestinal Peptide (Fig. 6) (Ramesh et al., 2018). V1 es esencial para procesos de discriminación de la orientación (Glickfeld, Histed, & Maunsell, 2013; Marques et al., 2018), navegación (Poort et al., 2015) y aprendizaje sensorial (Khan et al., 2018; Ramesh et al., 2018).

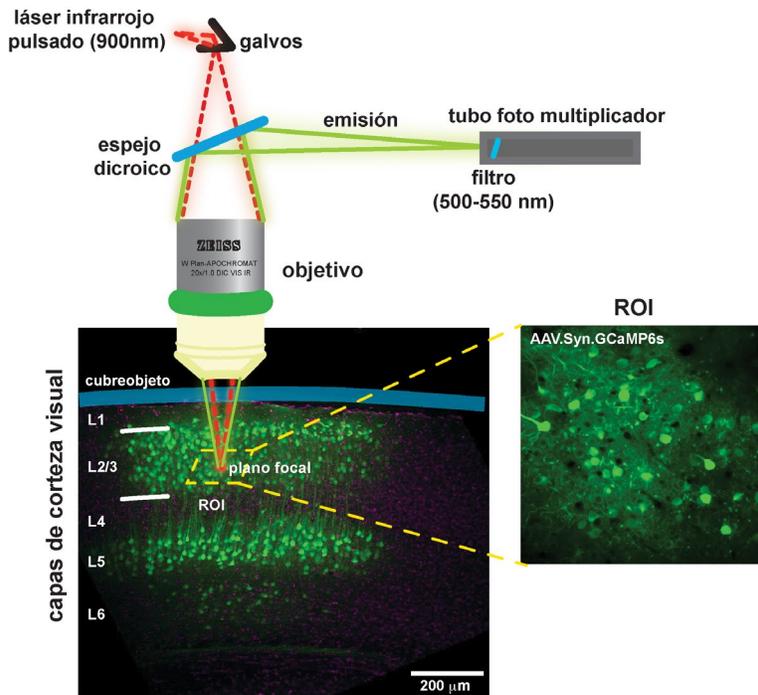


**Figura 6. organización de la Corteza Visual Primaria de ratón. A)** En este corte horizontal se muestra la estructura de “sal y pimienta” donde las neuronas selectivas a distintas orientaciones (colores) se muestran disgregadas a lo largo de la zona de imagen. **B)** Esquema con los tipos de neuronas de la Corteza Visual Primaria y sus patrones de conexión.

### 1.7 Microscopía de excitación de dos fotones y sensores de calcio genéticamente codificados

Para entender como el sistema nervioso responde a la interacción con el medio ambiente, es necesaria una herramienta de registro que permita inferir la actividad de cientos de neuronas a lo largo del tiempo (Dylda, Pakan, & Rochefort, 2019; Poll & Fuhrmann, 2019). La microscopía de excitación de dos fotones permite hacer imagenología de estructuras profundas (aproximadamente hasta 500  $\mu\text{m}$ ) en animales despiertos con la finalidad de registrar simultáneamente la actividad neuronal y la conducta (Denk & Svoboda, 1997).

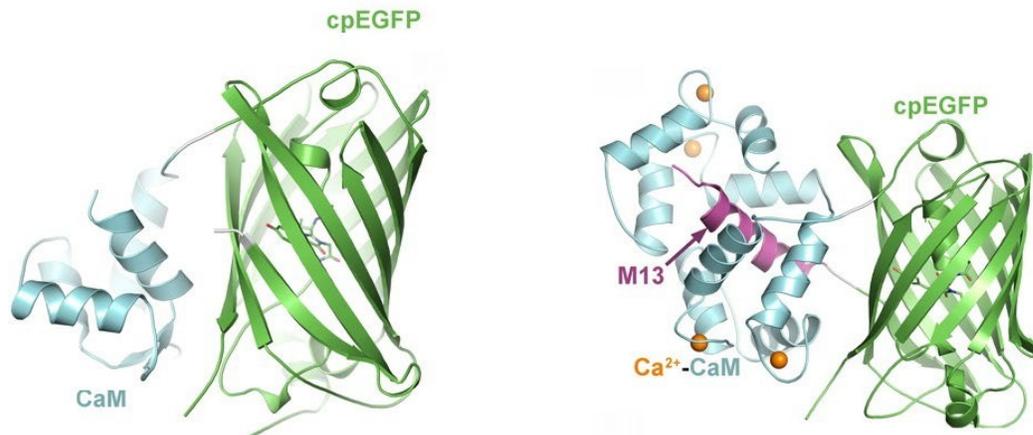
La microscopía de excitación de dos fotones, como su nombre lo indica, hace referencia a la absorción de dos fotones sólo en el plano focal a través de un láser de luz infrarroja pulsado, lo que permite hacer imágenes profundas sin dañar el tejido a través del uso de un sistema de galvanómetros (Dylda et al., 2019; Svoboda & Yasuda, 2006) (Fig. 7).



**Figura 7. Esquema de los componentes de la microscopía de excitación de dos fotones.** Parte inferior, muestra neuronas positivas a GCaMP6s en las diferentes capas de V1. Izquierda: magnificación del sitio de infección con AAV1.GCaMP6s. Todos los componentes ópticos que conforman un microscopio de dos fotones.

Para registrar y cuantificar la actividad neuronal es necesario el uso de moléculas “reporteras” con una buena relación señal-ruido y que permitan marcar tipos celulares específicos. Los GECIs (por sus siglas en inglés: Genetically Encoded Calcium Indicators) permiten todo lo anterior. Uno de los más ampliamente usados es el GCaMP (T. W. Chen et al., 2013; Dylda et al., 2019). Este indicador es una proteína de fusión entre la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés: Green Fluorescent Protein), el péptido M13 y la proteína Calmodulina (CaM). El aumento de la concentración de calcio intracelular provoca la unión de CaM y M13, esto a su vez altera la estructura  $\beta$  barril de la GFP permitiendo la liberación de energía en forma de un fotón (Fig. 8) (T. W. Chen et al., 2013; Dylda et al., 2019; Helassa, Podor, Fine, & Török, 2016). Este constructo proteico llega a las células por medio de infecciones virales o de transfecciones con plásmidos, ambos métodos permiten la expresión de la proteína en la membrana celular, lo cual permite la visualización de un cambio en fluorescencia de somas o procesos (T. W. Chen et al., 2013; Dana et al., 2018). Se sugiere que este cambio en la fluorescencia corresponde a un incremento en la actividad de la célula y posteriormente a un

incremento en el número de potenciales de acción (Pnevmatikakis, Merel, Pakman, & Paninski, 2013; Pnevmatikakis et al., 2016; Zhou et al., 2018).



**Figura 8. 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.

El uso conjunto de microscopía de excitación de dos fotones y GECIs se denomina Imagenología de Calcio *In Vivo* con Microscopía de Dos Fotones. Esta metodología nos permite hacer un seguimiento longitudinal de la actividad de un mismo grupo de neuronas en un animal despierto.

## 2. Planteamiento del problema

Reportes en pacientes humanos con autismo muestran la existencia de alteraciones en la actividad neuronal y en la sincronización de esta en diferentes regiones corticales (Dinstein et al., 2012; Dinstein et al., 2011; Samson et al., 2012). Recientemente se reportó que en pacientes con TEA que aprenden una tarea visual fija, son incapaces de aprender otra tarea visual posterior a aprender la tarea fija (tarea de sobre-especificidad), lo cual sugiere que los circuitos neuronales carecen de plasticidad para aprender nuevas tareas (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). Sin embargo, se desconocen las bases neurológicas asociadas a las alteraciones de los procesos cognitivos en el TEA. Por lo tanto, en este proyecto se plantea evaluar la existencia de inflexibilidad cognitiva ante el cambio de contingencias

determinadas por estímulos visuales en un modelo genético de autismo (SHANK3), y la posible contribución de las alteraciones en la actividad neuronal sobre la inflexibilidad mostrada en el comportamiento.

### **3. Hipótesis**

Los ratones SHANK3 serán más propensos a desarrollar sobre especificidad del aprendizaje debido a alteraciones en la actividad neuronal asociada al procesamiento de información, esto como consecuencia de la haploinsuficiencia de Shank3.

### **4. Objetivo general**

Evaluar si la haploinsuficiencia de Shank3 causa alteraciones en el aprendizaje perceptual y la actividad neuronal en corteza visual primaria.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- 1) Evaluar la flexibilidad cognitiva de ratones silvestres y de ratones SHANK3 en una tarea de discriminación visual.
- 2) Detectar y cuantificar la actividad neuronal por medio de imagenología de calcio a través de microscopía de excitación de dos fotones en animales despiertos mientras realizan una tarea de discriminación visual.
- 3) Analizar la actividad neuronal a través de los cambios en la fluorescencia del indicador de calcio genéticamente codificado (GCaMP6s) expresado en las neuronas de la capa 2/3 de corteza visual primaria, mediante algoritmos generados en Matlab y asociar esta actividad con la conducta.
- 4) Analizar la existencia de una relación entre las deficiencias de flexibilidad cognitiva observadas en la tarea de discriminación visual y las alteraciones en la actividad de V1.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Animales

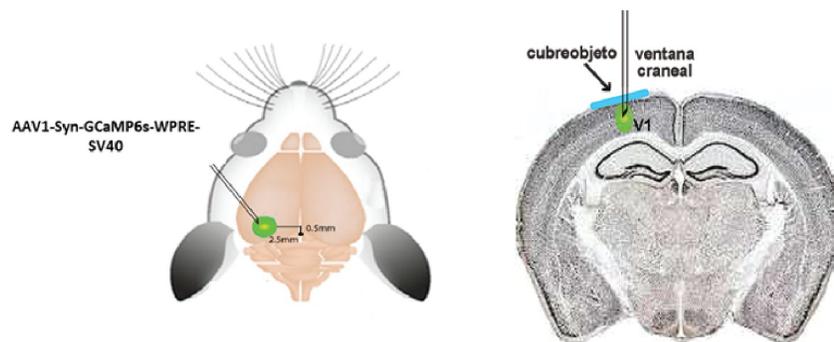
Todos los procedimientos llevados a cabo en este proyecto fueron previamente aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo No. YRC94-16).

Se utilizaron ratones machos y hembras 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. Se dividió a los animales en dos grupos experimentales: Ratones heterocigotos (SHANK3<sup>+/-</sup>) conformaron el grupo de “fenotipo autista” ( $n_{SHANK3}=5$ ) y ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>) el grupo control ( $n_{silvestres}=3$ ), de estos mismos ratones se seleccionó un par de cada genotipo para realizar los experimentos de microscopia de excitación de dos fotones en animales despiertos. Todos los experimentos fueron realizados a dobleciego.

### 5.2 Ventanas craneales, Infecciones virales y la modalidad cabeza fija

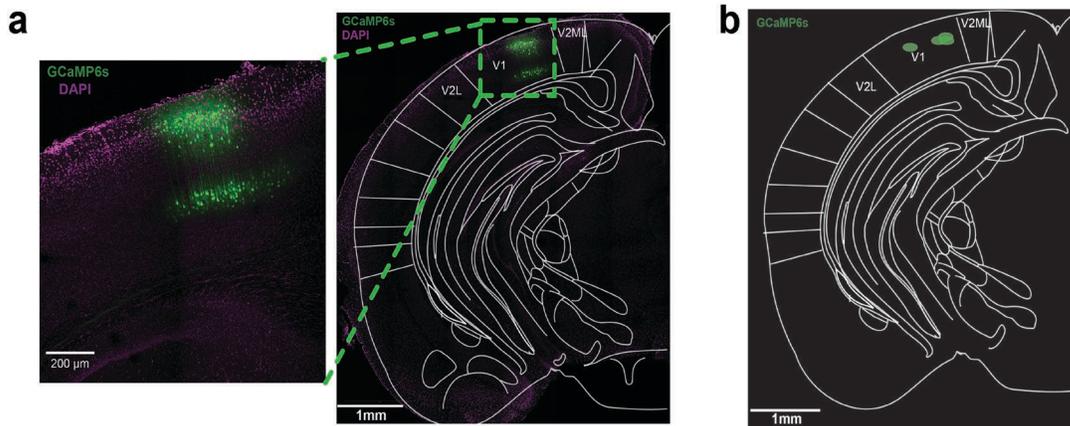
El protocolo utilizado, para las cirugías de ventanas craneales, fue el publicado por Holtmaat (Holtmaat et al., 2009). Todas las cirugías fueron realizadas en un cuarto aséptico de bioseguridad nivel 2 junto con la utilización de equipo de protección personal (guantes desechables de nitrilo, cofia, cubrebocas, cubre zapatos y bata quirúrgica desechable). Los animales fueron anestesiados en una cámara de infusión de anestesia con isoflurano (2-3%) al iniciar la cirugía, una vez anestesiados (frecuencia respiratoria = 1/seg) se posicionaron en un estereotáxico con conexión a un sistema de anestesia (isoflurano 1-1.5%) y un colchón térmico para regular la temperatura del animal durante la cirugía. Los ojos fueron cubiertos con un ungüento ocular de uso veterinario (Duralagrima, Laboratorios Grin), esto para evitar la resequedad e irritación.

Posteriormente se removió una sección del pelo de la cabeza y se desinfecto la piel con Yoduro de Sodio. Una vez desinfectada la piel se procedió a exponer el cráneo y se alineo en el estereotáxico para obtener las coordenadas de la Corteza Visual Primaria (V1) que son 2.5 mm lateral y 0.5 mm anteroposterior con respecto a Lambda (Franklin & Paxinos, 2008; Holtmaat et al., 2009) (Fig. 9). Ya alineado se marcó el diámetro de la ventana (2.5 mm) y se procedió a usar un taladro dental con una fresa de 1/4" para realizar la craneotomía, una vez descubierto el tejido cerebral se mantuvo hidratado con una solución llamada Buffer de Corteza (NaCl<sub>2</sub> 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). En caso de sangrado excesivo se utilizaron esponjas hemostáticas (Spongostan, Ethicon) humedecidas en Buffer de Corteza.



**Figura 9 Esquema de las coordenadas de las transfecciones virales con AAV1.Syn.GCaMP6s en corteza visual primaria (V1).** Craneotomía (3 mm de diámetro, 2.5 mm lateral y 0.5 mm anterior a lambda) e infección viral de GCaMP6s (250  $\mu$ m de profundidad, 3 sitios, 50 nl por sitio).

Se procedió a inyectar el virus adenoasociado AAV1-Syn- GCaMP6s-WPRE-SV40 (Penn Vector Core), a una profundidad de 250  $\mu$ m, área que corresponde a las capas 2 y 3 de la corteza visual primaria del ratón. Para cada animal se inyectó un total de 150 nl ( $1.5 \times 10^9$  vg/ml) en el mismo trepano, este volumen fue dividido en tres inyecciones de 50 nl cada una, estas inyecciones fueron hechas en diferentes sitios, se utilizó un nano inyector Nanoject 2.0 (Drummond Scientific) con pipetas de borosilicato de 0.5  $\mu$ m, a las pipetas se les biselo la punta a 45 grados aproximadamente. Se espero 10 minutos entre cada inyección con la intención de permitir la difusión del virus en el tejido (Fig. 10).



**Figura 10. Esquema de un corte coronal de cerebro de ratón. a)** Corte coronal de cerebro de ratón, muestra zona de infección con GCaMP6s y tinción con DAPI. A la izquierda magnificación de la zona de infección. **b)** Esquema de corte coronal de cerebro de ratón. Los puntos verdes muestran los sitios de infección del virus AAV.Syn.GCaMP6s en corteza visual primaria, n=4 ratones ( $n_{\text{SHANK3}} = 2$  y  $n_{\text{Silvestres}} = 2$ ).

Una vez finalizada la difusión del virus en el tejido se colocó sobre el tejido expuesto un cubreobjetos circular de 3mm de diámetro con un espesor #1 (Warner Instruments, 64-0720), previo a esto se colocó una gota de Buffer de Corteza para preservar la humedad en el tejido. El cubreobjetos fue adherido por las orillas al cráneo con cianoacrilato (Loctite Super Glue Gel, Loctite).

Posteriormente se colocó una barra de acero (Diseñada por Takaki Komiyama, Janelia Research Campus) para que el animal fuera sometido al protocolo de “Cabeza Fija”(Guo et al., 2014), la barra se posicionó en la parte más anterior del cráneo posible, alejándola un poco de la ventana craneal, la superficie debajo de la barra fue previamente raspada con una navaja de bisturí para asegurar una mayor superficie de contacto entre el cianoacrilato, la barra y el cráneo. Se dejó secar por completo el cianoacrilato y se cubrió el cráneo y la piel expuesta con acrílico dental negro (Ortho-jet, LANG DENTAL MFG) (Guo et al., 2014).

Durante la cirugía se administraron fármacos antiinflamatorios, antibióticos y supresores del dolor además de una inyección subcutánea de Lactato Ringers para prevenir la deshidratación. El antiinflamatorio dexametasona ( $2 \mu\text{g/g-1}$  peso) fue

aplicado vía intramuscular y los antibióticos sulfametoxazol (1 mg/ml) y trimetoprima (0.2 mg/ml) fueron aplicados subcutáneamente. Una vez terminada el proceso quirúrgico se retiró al animal del estereotáxico y se monitoreó su recuperación durante una hora, una vez despierto y sano se le mantuvo en el área de recuperación durante 48 horas. Posteriormente fue trasladado al vivarium donde permaneció mientras el protocolo experimental se realizó.

### **5.3 Recuperación post quirúrgica y habituación a la modalidad Cabeza Fija**

Los animales tuvieron un periodo de 2 semanas para la completa recuperación de la cirugía antes descrita, durante la primera semana de la recuperación se les administró carprofeno (0.50 mg/ml) vía intraperitoneal y enrofloxacin (5 µg/g-1 peso) vía oral.

La manipulación comenzó inmediatamente después del término de la segunda semana. Esto consistió en privar a los animales de agua durante un día para que posteriormente el experimentador los retire de la caja, los coloque en su mano y les ofrezca una gota de agua (entregada por medio de una pipeta de transferencia estéril) mientras los manipula, esto con la finalidad de generar un interés por parte del ratón para ser manipulado. Este proceso fue repetido durante 3 días (o más en caso de ser necesario) en lapsos de 30 minutos para cada ratón. Se procuró mantener el peso de los animales al 85% de su peso basal.

Superada esta etapa se pasó a la habitación de los animales a la modalidad de cabeza fija, primero se les dejó explorar libremente la estación de trabajo, cuando los ratones comenzaron a pasar más tiempo dentro del tubo se tomó su cabeza con delicadeza y se le posicionó en los postes de la estación de trabajo, una vez asegurada la barra en su lugar, se ajustaron un par de tornillos para evitar el movimiento excesivo del animal. Una vez fijado en la estación se les ofreció agua y comida con el objetivo de permitir la relajación del sujeto, esto se llevó a cabo

durante cuatro días en sesiones de 5, 10, 20 y 30 minutos respectivamente.

#### **5.4 Microscopía de excitación de dos fotones en animales despiertos**

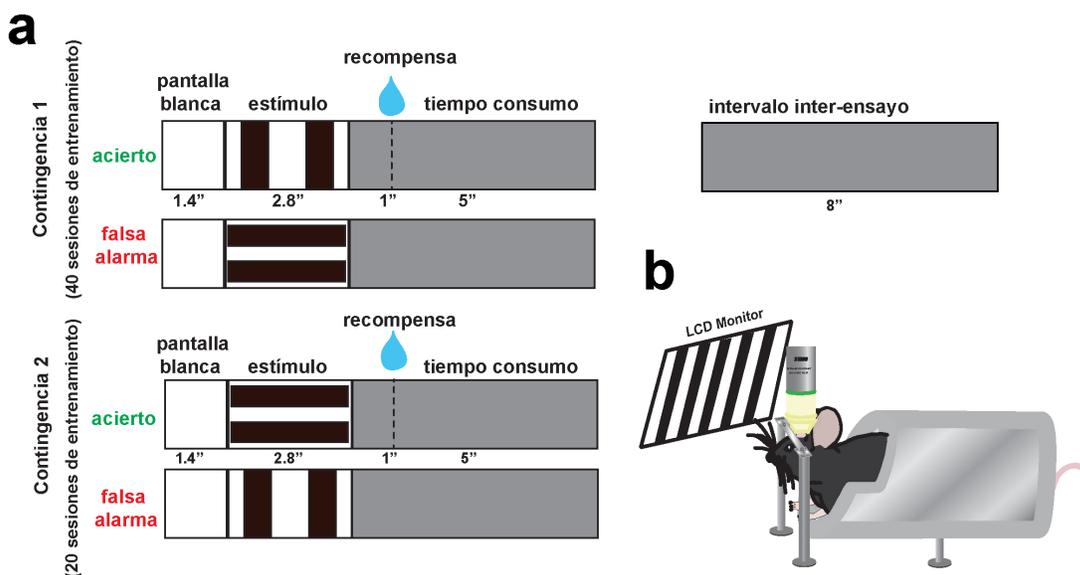
Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio de excitación de dos fotones Zeiss LSM 710, el objetivo 20x Plan Apochromat de inmersión de agua con 1.0 de Apertura Numérica y 2.4 mm de distancia de trabajo y un láser infrarrojo pulsado Chameleon Ultra II (Coherent). El GCamP6s se excitó a una longitud de onda de 900 nanómetros.

Las imágenes fueron adquiridas a una tasa de 5 Hz (200 ms por cada cuadro adquirido). Se utilizó un circuito diseñado a medida con una placa Arduino UNO (Arduino) y una interfaz de Python para controlar el inicio y final de la adquisición de imágenes.

La estación de trabajo para el modo de cabeza fija fue colocada debajo del cabezal para objetivos del microscopio, a la ventana craneal del ratón previamente fijado se le puso una gota de agua para permitir la transmisión de fotones entre el microscopio y el cerebro del animal. Antes de la presentación de la tarea visual se cubrió el objetivo del microscopio con un forro de tela color negro para evitar el impacto de luz, proveniente del monitor, en los fotomultiplicadores y así reducir la contaminación lumínica durante la adquisición de imágenes (Fig. 11b).

Se realizaron cuatro sesiones de imágenes para cada animal. Estas sesiones correspondían a 4 etapas dentro del aprendizaje pues la Primera Sesión de Imagen fue adquirida en el primer día de entrenamiento de los ratones (la primera vez que la tarea les fue presentada), la segunda sesión de imagen fue llamada Previa al Cambio de Contingencia y correspondió a la sesión 40 (última de la primera fase de

entrenamiento), la tercera sesión de imagen se adquirió durante el primer día donde los sujetos fueron sometidos al Cambio de Contingencia y fue nombrada de esa forma. Por último se realizó una sesión de imagen durante la última sesión de entrenamiento de los ratones en la segunda fase. Esto con la intención de capturar información del sistema siendo novato (primeros días de ambas contingencias) o experto (últimos días de ambas contingencias) en la discriminación de patrones visuales (Fig. 11a).



**Figura 11. Tarea visual en modo “cabeza fija”** a) Esquema de la tarea visual de sobre-especificidad. Se muestran los componentes de la tarea, y la duración de cada uno de estos para ambas contingencias. b) Esquema de la estación de entrenamiento para el modo cabeza fija y estimulación visual (monitor LED de 22" posicionado en 70 grados y a una distancia de 20 cm del ojo contralateral a la ventana).

### 5.5 Tarea de detección de patrones visuales

Se entrenó a los sujetos bajo un paradigma de condicionamiento clásico donde la presencia de un estímulo de enrejado fue apareada con la presencia de una gota de leche de soya que era entregada por medio de un dispensador/operando y la presencia de un estímulo diferente fue apareada con un “tiempo fuera” de 8 segundos. La presencia de la gota de leche de soya y la privación de líquidos en el animal favorecía la aparición de lengüeteos en el dispensador/operando. Para evitar la aparición sin control de lengüeteos los estímulos fueron presentados de

forma semi aleatoria pues existía un 33.3% de probabilidad de que el estímulo apareado con la gota apreciara, un 33.3% de probabilidad de que el patrón de enrejado apareado con el “tiempo fuera” y un 33.3% de probabilidad de que la pantalla gris continuara por 8 segundos más. Esta estrategia permitió que con el paso de las sesiones los animales emitieran lengüeteos cada vez más cercanos al tiempo de aparición de la recompensa y, en las últimas sesiones, lengüeteos antes de la aparición de la recompensa. Esto último, junto con la ausencia de lengüeteos en la condición apareada con el “tiempo fuera”, fungió como criterio para asumir que los animales entendieron la contingencia = patrón de enrejado específico -> gota de leche de soya -> lengüeteo / patrón de enrejado opuesto -> tiempo fuera -> no lengüeteo.

El experimento consistió en dos fases, la Contingencia 1 tuvo una duración de 40 Sesiones y la Contingencia 2 tuvo una duración de 20 Sesiones, cada sesión estaba compuesta de la presentación de alrededor de 150 ensayos (aproximadamente 30 minutos). Un ensayo consistía en la aparición de una pantalla blanca durante 1.4 segundos seguida inmediatamente de la presentación de un patrón de enrejado en movimiento con duración de 2.8 s, finalizando la presentación del patrón de enrejado se presentaba una pantalla gris de 1 segundo que podría ser seguida de la presentación de un reforzador o la ausencia de este. En caso de estar presente el reforzador la pantalla duraría 5 segundos más, en caso de la ausencia del reforzador la presencia de la pantalla se alargaría por 8 segundos más. En la Contingencia 2 las reglas fueron invertidas y ahora el patrón de enrejado que estaba apareado con el reforzador se apareo con el “tiempo fuera” y el patrón de enrejado que estaba apareado con el “tiempo fuera” fue apareado con el reforzador.

Para llevar a cabo este experimento se utilizó la estación de trabajo para “Modalidad Cabeza Fija” y una computadora que por medio de la interacción

Python-Arduino controlaba un circuito que a su vez controlaba una bomba peristáltica (Adafruit) capaz de dispensar una gota de 8  $\mu$ l, ese mismo circuito permitía detectar los lengüeteos del animal y registrar el tiempo en que los eventos ocurrían. El componente visual de la tarea fue programado en Python, usando las bibliotecas Psychopy (Peirce, 2007) y el control electromecánico de las bombas y el control de los circuitos se logró utilizando la biblioteca Pyduino que permite el control de una placa Arduino UNO (Arduino) desde Python.

Ambos “patrones de enrejado” (ver glosario) tenían una frecuencia espacial de 4 ciclos por segundo, un contraste de 100% (estaban compuestos por barras blancas y negras dentro de un espacio RGB), con un tamaño de 1920 por 1080 pixeles y ambos se movían con frecuencia de 1 Hertz, el “patrón de enrejado 1” tenía una orientación de 270 grados y el “patrón de enrejado2” una orientación de 0 grados, de tal suerte que el primero se desplazaba caudalmente respecto al animal y el segundo dorsalmente, también respecto al animal. Todo fue presentado en un monitor Dell p2414h con resolución Full HD (1920 x 1080 p), de retro iluminación LED, con un brillo máximo de 250 cd/m<sup>2</sup>, un rango de presentación de color de 2000000:1 y un ángulo de visibilidad de 178°/178°.

La estación de trabajo para la modalidad “Cabeza Fija” era posicionada aproximadamente a 20 cm del monitor y el monitor en una orientación de 70° respecto a la estación de trabajo, esto con la finalidad de abarcar una buena parte del campo de visión monocular de los ratones. El dispensador/operando era colocado aproximadamente a 0.5 cm de la cabeza del ratón (Fig. 11b).

## 5.6 Histología

Una vez finalizados los experimentos se anestesió a los animales con Xilacina/Ketamina (15/85%) para posteriormente perfundirlos con PBS al 0.9% y posteriormente con PFA al 4% con la finalidad de fijar el tejido cerebral. Los

cerebros fueron extraídos y se dejaron fijando en PFA al 4% por 3 días, pasados esos 3 días se cambiaron a PBS con Azida de Sodio al 0.01%. Se uso un criostato para obtener cortes coronales de 50  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron montados en un portaobjetos con VectaShield-DAPI. Finalmente se usó el Zeiss LSM 710 para corroborar los sitios de infección. El GCaMP6s fue excitado a 488 nm, se usó un filtro de emisión 500-550 nm, DAPI fue excitado a x nm y se usó un filtro de emisión 358 nm, el objetivo utilizado fue C. Apochromat 10x de inmersión de agua, con apertura numérica de 0.45 y distancia de trabajo 1.8 mm) (Fig. 9, 10).

### 5.7 Procesamiento de Imágenes y obtención de señales

Se uso Turboreg, un plugin de ImageJ (Thevenaz, Ruttimann, & Unser, 1998) para corregir el movimiento horizontal de las imágenes adquiridas in vivo con microscopia de excitación de dos fotones (Zeiss LSM 710). Para la extracción de señales se utilizó el algoritmo CNMF-E, en su versión para Matlab, (Zhou et al., 2018) en la configuración “Endoscopio” pues se buscaba eliminar el ruido de fondo (contaminación lumínica debido al monitor) lo más detallado posible. Una vez extraídos los componentes espaciales y temporales, de las neuronas registradas, se alinearon respecto a los tiempos registrados por los circuitos creados para el control del microscopio y el control electrónico de los actuadores de la estación. Con un código escrito en Matlab, y la alineación de las señales, se logró determinar el cambio en la fluorescencia de las neuronas en los tiempos en los que los eventos de la tarea fueron sucediendo. Para la obtención del  $\Delta F/F$  se tomaron los tiempos de inicio de cada ensayo (el primer tiempo desde que se mostró una Pantalla Blanca) y se tomaron los 3 segundos anteriores como el periodo basal de actividad, para el tiempo de interés respectivo a los Patrones de Enrejado se consideraron los tiempos de inicio de cada uno de esos estímulos más los 2.4 segundos que estuvieron presentes, posteriormente se ocupó la ecuación:

$$\Delta F/F = \frac{(F - F_0)}{F_0}$$

Donde  $F$  = La fluorescencia durante el periodo que los estímulos fueron presentados y  $F_0$  = la fluorescencia durante el periodo basal.

## 5.8 Evaluación de la selectividad de las neuronas ante los diversos tipos de estímulos

Con las señales obtenidas por el análisis anterior se procedió a evaluar la responsividad de las neuronas ante los distintos componentes de la tarea (Respuestas ante la Pantalla Blanca, el Patrón de Enrejado 1, el Patrón de Enrejado 2 y el Reforzador). Una neurona responsiva fue definida como aquella con un incremento en su  $\Delta F/F$  al menos dos veces mayor al existente en su periodo basal y estadísticamente diferente al mismo periodo basal (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

El grupo de neuronas Responsivas después fue evaluado para Selectividad (SI). La Selectividad de una neurona fue definida como la capacidad de una neurona para responder a uno y solo uno de los componentes de la tarea antes descritos. El método de clasificación usado fue el publicado por el grupo de Sonja B Hofer en (Poort et al., 2015), los nombres en la ecuación fueron modificados para este experimento de tal suerte que la ecuación utilizada fue:

$$SI = \frac{(\bar{R}_{E1} - \bar{R}_{E2})}{s_p^R}$$

Donde  $\bar{R}_{E1}$  = media del  $\Delta F/F$  perteneciente al Evento 1,  $\bar{R}_{E2}$  = media del  $\Delta F/F$  perteneciente al Evento 2 y  $s_p^R$  = la desviación estándar total de ambas respuestas a los Eventos. La obtención de un número real positivo indicaba preferencia al Evento 1 y la obtención de un real negativo indicaba preferencia al Evento 2. Al ser 4 los eventos, que posiblemente modularan la actividad de las neuronas, se optó por una estrategia de comparación excluyente, el orden de

comparaciones fue el siguiente:

- Neuronas Moduladas a Pantalla Blanca vs Neuronas Moduladas a Patrón de Enrejado 1 y Neuronas Moduladas a Patrón de Enrejado 2.
- Neuronas Moduladas a Pantalla Blanca vs Neuronas Moduladas a Reforzador.
- Neuronas Moduladas a Reforzador vs Neuronas Moduladas a Patrón de Enrejado 1 y Neuronas Moduladas a Patrón de Enrejado 2.
- Neuronas Moduladas a Patrón de Enrejado 1 vs Neuronas Moduladas a Patrón de Enrejado 2.

Vale la pena aclarar que la categorización fue excluyente ya que ninguna neurona podía pertenecer a más de un grupo, cuando esto llegó a suceder se revisaron los valores del *SI* y se agrupó a la neurona de acuerdo con que tan fuerte era su respuesta ante un grupo.

### **5.9 Evaluación del desempeño de los animales durante la tarea de discriminación**

Se utilizó Teoría de Detección de señales para clasificar las respuestas de los ratones de tal suerte que un Acierto fue definido como una secuencia de más de 3 lengüeteos durante los primeros tres segundos comprendidos entre el inicio de la presentación del patrón de enrejado (que estuvo apareado con el reforzador) y la entrega del reforzador. Una Falsa Alarma como una secuencia de más de 3 lengüeteos durante los primeros tres segundos comprendidos entre el inicio de la presentación del patrón de enrejado opuesto al que generaba un Acierto (es decir, el patrón de enrejado apareado con un “tiempo fuera”), una Omisión como la ausencia de la secuencia de lengüeteos antes descrita durante los primeros tres segundos comprendidos entre el inicio de la presentación del patrón de enrejado apareado con la recompensa y finalmente un Rechazo Correcto como la ausencia de la secuencia de lengüeteos antes descrita durante los primeros tres segundos comprendidos entre el inicio de la presentación del patrón de enrejado apareado con el “tiempo fuera”.

Con estas categorías definidas se utilizó el estadístico  $d'$  (ver glosario) para inferir el desempeño de los sujetos durante el protocolo. El  $d'$  fue obtenido para cada sesión de cada sujeto y posteriormente promediado para cada grupo experimental. La ecuación para determinar el  $d'$  fue la siguiente:

$$d' = Z(A) - Z(FA)$$

Donde  $Z(A)$  = el inverso de la función de distribución acumulativa de la distribución Gaussiana para la tasa de Aciertos y  $Z(FA)$  = el inverso de la función de distribución acumulativa de la distribución Gaussiana para la tasa de Falsas Alarmas.

Se realizó un Análisis de Varianza de medidas repetidas para determinar si cada grupo tenía un desempeño diferente a lo largo del tiempo y una prueba t para determinar si los grupos eran diferentes entre ellos, para corroborar estas diferencias también se utilizó un análisis ROC. Se hizo lo mismo para las Tasas de Aciertos y de Falsas Alarmas.

## **5.10 Estadística**

Antes de cada comparación estadística se realizó una prueba de normalidad para así determinar la naturaleza de los datos, las pruebas de normalidad aplicadas fueron Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov. Dependiendo de la normalidad de los datos fueron usadas la media o la mediana como medidas de tendencia central. En todas las pruebas de hipótesis fue usado un intervalo de confianza al 95%.

En la sección donde se buscó inferir la modulación de las células se utilizó una prueba Kruskal-Wallis entre el periodo de interés y el periodo basal. Para inferir si la variación entre las proporciones de células que conforman cada grupo de Neuronas Selectivas era debido al genotipo se utilizó una prueba F de Fisher. Para

comparar las amplitudes de respuesta en cada grupo de neuronas selectivas, y así determinar la saliencia de un evento, se utilizó una prueba t de student. Para comparar las latencias al punto máximo de la señal en cada grupo de neuronas selectivas se utilizó una prueba t de student. Para corroborar las diferencias observadas en los valores de las amplitudes y las latencias se hizo un análisis ROC.

Se calcularon los coeficientes de variación para los conjuntos de datos correspondientes al  $d'$ , las amplitudes de los grupos neuronales selectivos y las latencias de los grupos neuronales selectivos. Esto se hizo con la finalidad de evaluar una posible subcategorización de los ratones SHANK3 de acuerdo a sus conductas o respuestas neuronales.

Finalmente, para determinar si el aprendizaje de los grupos fue estadísticamente diferente se utilizó una prueba t de student y una prueba Wilcoxon y el área bajo la curva de una caracterización ROC. Las pruebas estadísticas fueron realizadas mayoritariamente en Matlab 2017a o Graph Pad Prism 5.

## **6. Resultados**

### **6.1 Los ratones SHANK3 muestran incapacidad para detectar el cambio en la contingencia**

Para analizar el desempeño de ratones silvestres y SHANK3 en respuesta a una tarea de discriminación visual, utilizamos el  $d'$  como un parámetro para medir la capacidad de diferenciar los estímulos presentados. Para el análisis se dividieron los datos en cuatro etapas de diez sesiones cada una, aunque también se presentan los datos graficando cada una de las sesiones (Fig. 12a,b).

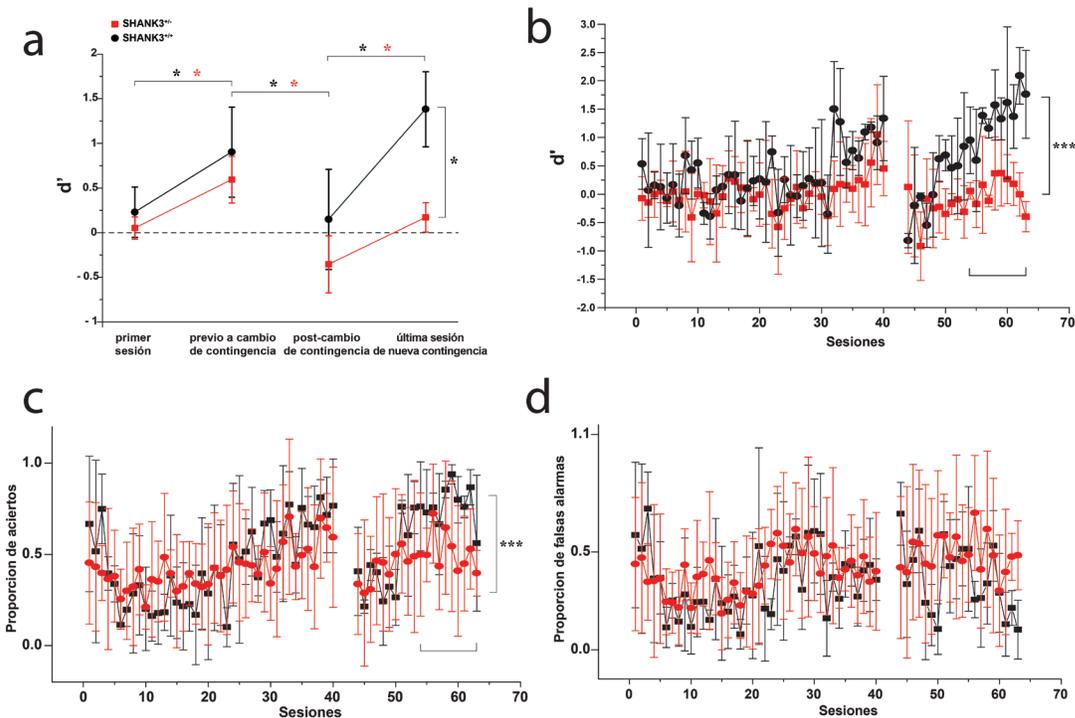
Las gráficas correspondientes a este análisis representan los promedios de las

primeras 10 sesiones, las 10 sesiones previas al cambio de contingencia, las 10 sesiones posteriores al cambio de contingencia y las 10 últimas sesiones del protocolo de aprendizaje. Esto se hizo con la finalidad de representar el aprendizaje de los sujetos en las etapas donde eran inexpertos y expertos en cada una de las contingencias (Fig. 12a).

Al analizar los datos de cada genotipo encontramos que, durante la etapa de aprendizaje correspondiente a la primera contingencia, ambos grupos presentaron un  $d'$  mayor a 0.5 (silvestres primeras sesiones =  $0.22 \pm 0.28$ , silvestres previo a cambio =  $0.90 \pm 0.50$ , SHANK3 primeras sesiones =  $0.05 \pm 0.12$ , SHANK3 previo a cambio =  $0.59 \pm 0.26$ ). Respecto a la etapa del cambio de contingencia, ambos grupos considerados expertos mostraron una reducción en el  $d'$  (silvestres previo a cambio =  $0.90 \pm 0.50$ , silvestres post cambio =  $0.14 \pm 0.56$ , SHANK3 previo a cambio =  $0.59 \pm 0.26$ , SHANK3 post cambio =  $0.35 \pm 0.32$ ), mientras que en el bloque de la última sesión los ratones silvestres mostraron un  $d'$  mayor a 1 ( $1.38 \pm 0.42$ ), mientras que los ratones SHANK3 presentaron un  $d'$  de 0.17 ( $0.17 \pm 0.16$ ). Al analizar la diferencia entre genotipos, encontramos que durante las dos etapas de la primera contingencia no existen diferencias significativas de los ratones SHANK3 ( $0.59 \pm 0.26$ ) con respecto a los silvestres ( $0.90 \pm 0.50$ ). Sin embargo, durante la segunda contingencia encontramos un  $d'$  menor de los ratones SHANK3 ( $0.17 \pm 0.16$ ) en comparación con los ratones silvestres ( $1.38 \pm 0.42$ ). Se realizó una prueba ANOVA de una vía para comparar las 4 etapas,  $F(7,72) = 22.98$ ,  $p = 0.0003$ . Comparaciones post hoc de Tukey indicaron diferencias en las medias de los conjuntos de datos pertenecientes a la primera etapa respecto a la segunda en ambos grupos, de la tercer respecto a la cuarta y de la cuarta etapa de los sujetos silvestres respecto a la misma etapa en los sujetos heterocigotos,  $p < 0.05$ .

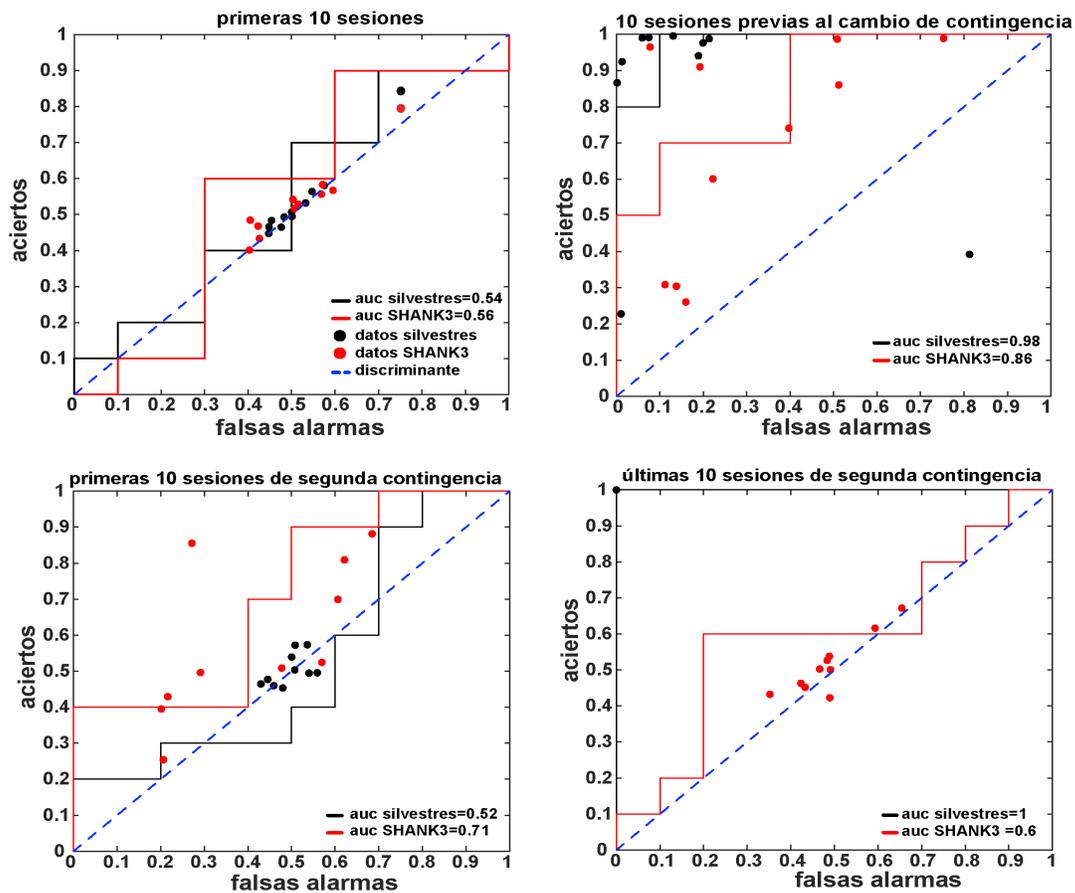
Por otra parte, analizamos la proporción de aciertos y falsas alarmas para cada uno de los grupos, encontramos que los ratones SHANK3 presentan una menor

proporción de aciertos ( $0.23 \pm 0.11$ ) en las últimas diez sesiones de la segunda contingencia en comparación a los ratones silvestres ( $0.82 \pm 0.16$ ) (Fig. 12c). Sin embargo, cuando analizamos la proporción de falsas alarmas no encontramos diferencias significativas entre ambos genotipos, aunque se observa una tendencia al alta de los ratones SHANK3 ( $0.47 \pm 0.11$ ) con respecto a los silvestres ( $0.31 \pm 0.15$ ) (Fig.12d). Esto sugiere que el fenómeno conocido como sobre especificidad del aprendizaje también se encuentra presente en el modelo murino del síndrome de Phelan-McDermid pues los ratones SHANK3 tuvieron un menor desempeño en la segunda etapa de la tarea.



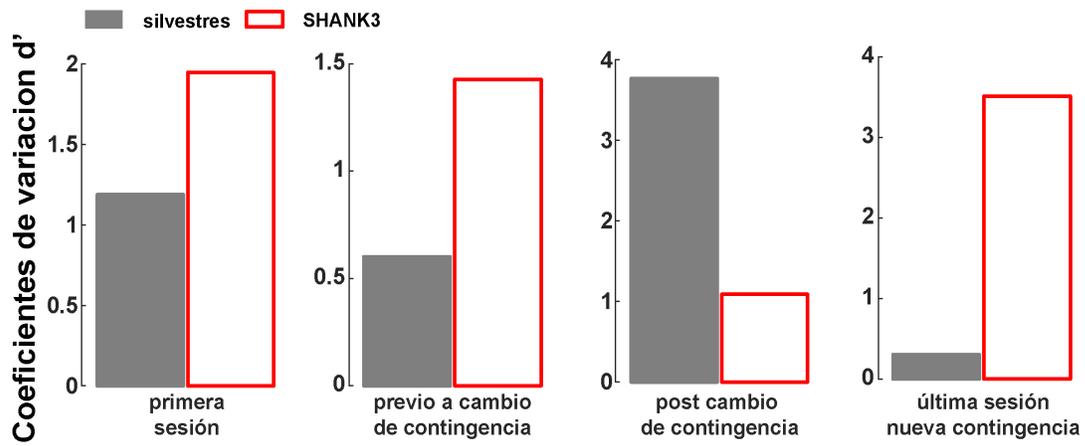
**Figura 12. Desempeño ratones SHANK3 y silvestres en respuesta a una tarea de discriminación visual.** a) Índice de discriminación ( $d'$ ) durante las cuatro etapas del aprendizaje de la tarea visual en ratones SHANK3 (SHANK3<sup>-/-</sup>) ( $n_{SHANK3} = 5$ ) y silvestres (SHANK3<sup>+/-</sup>) ( $n_s = 5$ ) ( $F(7,72) = 22.98$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). b) Índice de discriminación ( $d'$ ) graficado para cada una de las sesiones de la tarea. Wilcoxon Signed-Ranks Test,  $p < 0.001$ . c,d) Cuantificación de la proporción de aciertos y falsas alarmas respectivamente para cada una de las sesiones. Wilcoxon Signed-Ranks Test,  $Z = 58$ , \*  $p < 0.001$ . Los datos representan la media  $\pm$  E.S.

Finalmente, usando las medias, se calcularon las curvas de  $d'$  en un espacio creado por un análisis de Característica Operativa del Receptor (por sus siglas en inglés, ROC) y se midió el área bajo la curva AUC (por sus siglas en inglés: Área Under the Curve) para inferir la sensibilidad de los ratones a la presencia del estímulo. Este análisis se hizo para las cuatro etapas de aprendizaje antes descritas (Fig. 13). Durante la primera etapa, las áreas bajo la curva para ambos genotipos son muy similares ( $AUC_{\text{silvestres}} = 0.54$ ,  $AUC_{\text{SHANK3}} = 0.56$ ), lo cual impide clasificar a los ratones de cualquier genotipo como expertos y distinguir entre genotipos. Respecto a la etapa previa al cambio de contingencia, tanto los ratones silvestres como los SHANK3 muestran valores altos para el área bajo la curva ( $AUC_{\text{silvestres}} = 0.98$ ,  $AUC_{\text{SHANK3}} = 0.86$ ), sugiriendo una alta sensibilidad y detección de los estímulos recompensados para ambos genotipos. Para la etapa del cambio de contingencia observamos valores bajos del área bajo la curva ( $AUC_{\text{silvestres}} = 0.52$ ,  $AUC_{\text{SHANK3}} = 0.71$ ), estos valores tampoco nos permiten discernir contundentemente el genotipo de los ratones. Para el último bloque, los valores del área bajo la curva para los ratones silvestres ( $AUC_{\text{silvestres}} = 1$ ) fueron muy superiores respecto a los valores para los ratones SHANK3 ( $AUC_{\text{SHANK3}} = 0.6$ ), esta diferencia de valores nos permite discriminar el genotipo de los ratones en función de su sensibilidad ante la presencia del estímulo recompensado. Este análisis nos permite inferir la sensibilidad a la presencia de estímulo recompensado, y de esta forma evidenciar las diferencias entre los ratones silvestres y SHANK3 específicamente en la etapa final de la tarea.



**Figura 13.** Área bajo la curva ROC para ratones SHANK3 y silvestres. Áreas bajo la curva para las primeras 10 sesiones de ratones SHANK3 y silvestres ( $auc_{\text{Silvestres}} = 0.54$ ,  $auc_{\text{SHANK3}} = 0.56$ ). Áreas bajo la curva para las 10 sesiones previas al cambio en la contingencia ( $auc_{\text{Silvestres}} = 0.98$ ,  $auc_{\text{SHANK3}} = 0.86$ ). Áreas bajo la curva para las 10 primeras sesiones de la segunda contingencia ( $auc_{\text{Silvestres}} = 0.52$ ,  $auc_{\text{SHANK3}} = 0.71$ ). Áreas bajo la curva para las últimas 10 sesiones de la segunda contingencia ( $auc_{\text{Silvestres}} = 1$ ,  $auc_{\text{SHANK3}} = 0.6$ ).

También se evaluaron los coeficientes de variación del  $d'$  para ambos genotipos en las cuatro etapas de la tarea (Fig. 14). Se observó mayor dispersión de los datos correspondientes a la sensibilidad de los ratones SHANK3 en todas las etapas ( $CV_{\text{SHANK3}} \text{ primeras sesiones} = 1.9454$ ,  $CV_{\text{silvestres}} \text{ primeras sesiones} = 1.1875$ ,  $CV_{\text{SHANK3}} \text{ previo a cambio} = 1.4270$ ,  $CV_{\text{silvestres}} \text{ previo a cambio} = 0.6016$ ,  $CV_{\text{SHANK3}} \text{ últimas sesiones} = 3.5139$ ,  $CV_{\text{silvestres}} \text{ últimas sesiones} = 0.3041$ ) excepto ( $CV_{\text{SHANK3}} \text{ post cambio} = 1.0884$ ,  $CV_{\text{silvestres}} \text{ post cambio} = 3.7689$ ). Este análisis sugiere que dentro del grupo de ratones SHANK3 existe una mayor variación de la conducta, es decir, dentro del grupo hay sujetos que son mejores en su desempeño que otros por lo menos en tres diferentes etapas.



**Figura 14. Coeficientes de variación del  $d'$  para ratones SHANK3 y silvestres durante las 4 etapas.** Para las primeras sesiones los valores de los coeficientes son  $CV_{SHANK3} = 1.9454$ ,  $CV_{silvestres} = 1.1875$ , para las sesiones previas al cambio en la contingencia  $CV_{SHANK3} = 1.4270$ ,  $CV_{silvestres} = 0.6016$ , posterior al cambio en la contingencia  $CV_{SHANK3} = 1.0884$ ,  $CV_{silvestres} = 3.7689$  y durante las últimas sesiones de la nueva contingencia  $CV_{SHANK3} = 3.5139$ ,  $CV_{silvestres} = 0.3$

## 6.2 Cambios en la proporción de neuronas selectivas durante el aprendizaje de la tarea visual

Las imágenes de calcio se realizaron en la primera y última sesión de cada contingencia, posteriormente se cuantificó la proporción de neuronas selectivas (ver Materiales y métodos) para cada uno de los componentes de la tarea. Esto nos permitió conocer el porcentaje de neuronas, dentro de la población, que tenían una respuesta preferencial ante un único componente y cómo estas proporciones varían respecto a las diferentes etapas de la tarea.

Comparamos cada una de las sesiones correspondientes a las diferentes etapas de la tarea con la finalidad de determinar si existían cambios en las proporciones de las neuronas respecto al desempeño de los ratones en la tarea.

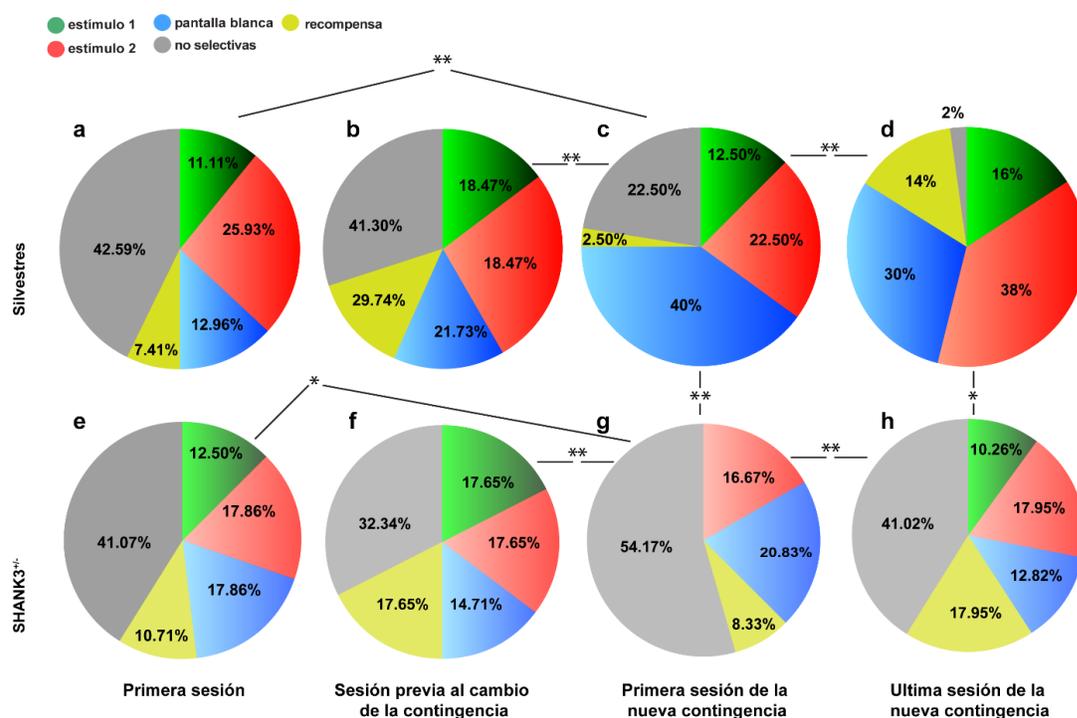
En los ratones silvestres encontramos que la proporción de neuronas selectivas cambia en la primera sesión de la nueva contingencia respecto a la sesión previa al cambio de contingencia, mientras que no encontramos diferencias de la primera sesión respecto a la sesión previa al cambio de contingencia (Fig. 15 a,b). Encontramos un incremento en la proporción de neuronas selectivas a la Pantalla Blanca (de 21.73% a 40%), una disminución en la proporción a la recompensa (de 29.74% a 2.50%), y una disminución de neuronas no selectivas (de 41.30% a 22.50%) (Fig. 15 b,c) en la primer sesión de la nueva contingencia respecto a la sesión previa al cambio de contingencia. También registramos cambios en la última sesión respecto a la primera sesión de la nueva contingencia, donde incrementa la proporción de neuronas selectivas al estímulo 2 (de 22.50% a 38%), a la recompensa (de 2.50% a 14%), mientras que disminuye la proporción a la pantalla blanca (de 40% a 30%), y la proporción de neuronas no selectivas (de 22.50% a 14%) (Fig. 15c,d) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). Al comparar la primera sesión de la primera

contingencia con la primera sesión de la segunda contingencia, observamos que no existen diferencias en las proporciones de neuronas selectivas ante los estímulos, sin embargo la proporción de neuronas selectivas a la pantalla blanca incrementan (de 12.96% a 40%) y disminuye la proporción de neuronas no selectivas (de 42.59% a 22.50%) (Fig.15 a,c). Observamos un cambio en la proporción de neuronas entre la primera sesión de la primera contingencia y la última sesión de la última contingencia, incrementan la proporción de neuronas selectivas al estímulo 2 (de 25.93% a 38%), a la pantalla blanca (de 12.96% a 30%) y disminuye la proporción de neuronas no selectivas (de 42.59% a 2%) (Fig.15 a,d).

En los ratones SHANK3 encontramos una disminución en la proporción de neuronas selectivas al estímulo 1 (de 17.65% a 0%) y un incremento en la proporción de neuronas no selectivas (de 32.34% a 54.17%) (Fig. 15 f,g) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). Mientras que no encontramos diferencias de la primera sesión respecto a la sesión previa al cambio de contingencia (Fig.15 e,f) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). También registramos cambios en la última sesión respecto a la primera sesión de la nueva contingencia, donde solo se observó un incremento en la proporción de neuronas selectivas al estímulo 1 (de 0% a 10.26%) (Fig.15 g,h) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). Al comparar la primera sesión de la primera contingencia con la primera sesión de la segunda contingencia solo observamos una disminución en la proporción de neuronas selectivas al estímulo 1 (de 12.50% a 0%) (Fig.15 e,g) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ).

Cuando comparamos entre grupos, observamos que los ratones SHANK3 muestran una disminución en la proporción de neuronas selectivas al estímulo 1 (12.50% en silvestres y 0% en SHANK3), una disminución en la proporción de neuronas selectivas a la pantalla blanca (40% en silvestres y 20.83% en SHANK3) y un aumento en la proporción de neuronas no selectivas (22.50% en silvestres y 54.17% en SHANK3) (Fig. 15 c,g) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). También se observaron

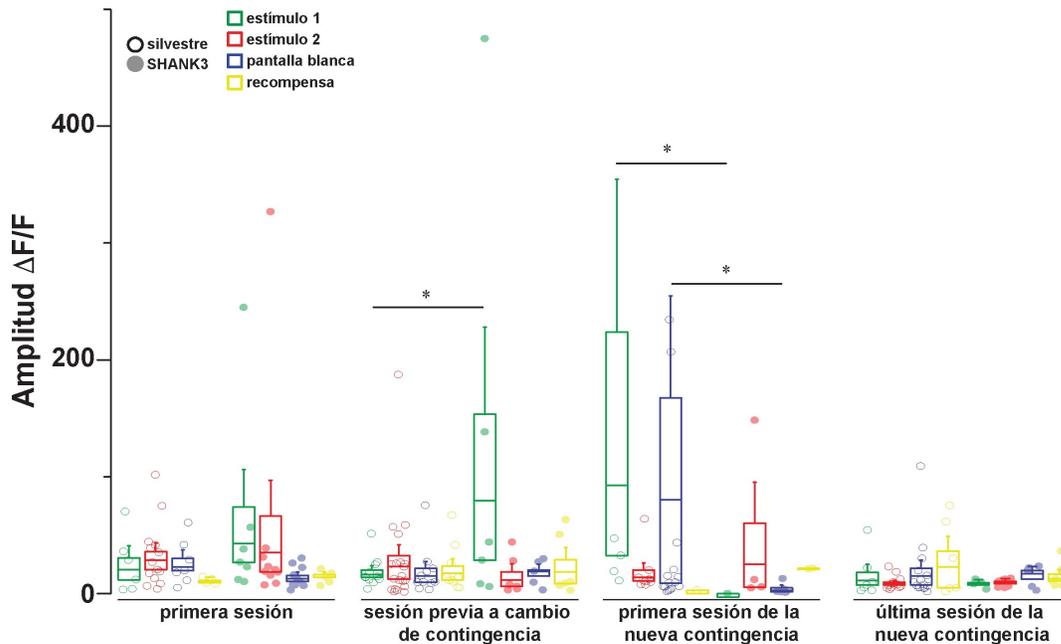
diferencias entre genotipos en la última sesión de la nueva contingencia, en esta ocasión se observó una menor proporción de neuronas selectivas al estímulo 2 en los ratones SHANK3 respecto a los ratones silvestres (38% en silvestres y 17.95% en SHANK3), además existe un menor proporción de neuronas selectivas a la pantalla blanca en ratones SHANK3 respecto a los ratones silvestres (30% en silvestres y 12.82% en SHANK3), finalmente se encontró una mayor proporción de neuronas no selectivas en los ratones SHANK3 respecto a los ratones silvestres (2% en silvestres y 41.02% en SHANK3) (Fig. 15 d,h) (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). Esto sugiere que durante las distintas fases de la tarea existe una evolución diferencial de los procesos que se encargan de elegir a las neuronas selectivas ante los componentes en la tarea, es decir, que los procesos de selección de neuronas con respuestas únicas ante un estímulo son distintos en ratones SHANK3 y silvestres, pero solo cuando el aprendizaje perceptual está involucrado.



**Figura 15. Proporciones de neuronas con respuesta exclusiva ante alguno de los componentes de la tarea. a-d)** Proporción de neuronas selectivas a los diferentes componentes de la tarea en ratones silvestres, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , F de Fisher. **e-h)** Proporción de neuronas selectivas a los diferentes componentes de la tarea en ratones heterocigotos, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , F de Fisher.

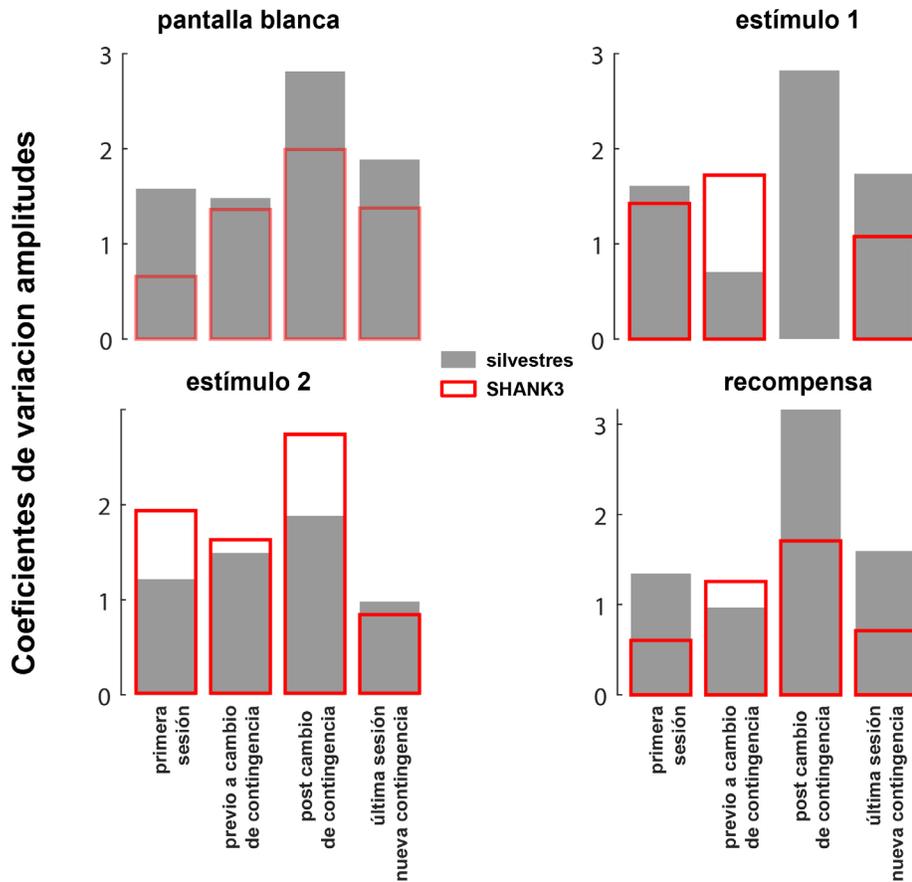
### 6.3 Cambios en la amplitud de los transitorios de calcio en respuesta a los distintos componentes de la tarea visual

Para inferir la saliencia de los eventos ante las poblaciones neuronales, se midieron las amplitudes de los transitorios de calcio evocados para cada componente de la tarea, restando los valores máximos y mínimos de las señales de calcio. Este procedimiento fue hecho en los grupos neuronales anteriormente descritos y en cada una de las sesiones de imagenología. Al respecto, se observan diferencias significativas entre las amplitudes presentadas por las neuronas de los ratones SHANK3 respecto a los ratones silvestres ante el estímulo 1 en la Sesión previa al cambio de contingencia (F de Fisher,  $p < 0.05$ ). Con el mismo procedimiento se encontraron diferencias en la misma categoría, pero esta vez en la Primera sesión de la nueva contingencia (F de Fisher,  $p < 0.05$ ) y entre las amplitudes de la pantalla blanca (F de Fisher,  $p < 0.05$ ) (Fig. 16).



**Figura 16. Amplitud de transitorios de calcio en respuesta a los diferentes componentes de la tarea.** Se observan las medias  $\pm$  E.S. de las amplitudes para cada grupo de neuronas selectivas en cada una de las cuatro fases donde se realizó imagenología de calcio, los puntos muestran los datos de cada neurona. Para determinar si el incremento de las amplitudes se debía a la sesión o al genotipo, se utilizó un análisis F de Fisher con un intervalo de confianza al 95%. Se muestran diferencias entre genotipos para las amplitudes correspondientes al estímulo 1 durante la sesión previa al cambio de contingencia (F de Fisher,  $p < 0.05$ ); durante la primera sesión de la nueva contingencia existen diferencias entre genotipos para las amplitudes registradas ante el estímulo 1 (F de Fisher,  $p < 0.05$ ) y la pantalla blanca (F de Fisher,  $p < 0.05$ ).

Los coeficientes de variación fueron calculados para inferir la variabilidad de los datos de ambos genotipos en todas las etapas (Fig. 17). Los gráficos muestran una menor variabilidad en los datos obtenidos para las neuronas de los ratones SHANK3 respecto a los silvestres, esto para sus respuestas ante la pantalla blanca ( $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 0.6570,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.5779,  $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 1.3605,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 1.4823,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 1.9913,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 2.8138,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 1.3759,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 1.8835). Esto se mantiene para las amplitudes correspondientes al estímulo 1 ( $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 1.4266,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.6097,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 0,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 2.8217,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 1.0771,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 1.7358) salvo por las sesiones previas al cambio de la contingencia ( $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 1.7225,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 0.7043). La variación correspondiente al estímulo 2 fue más grande para las neuronas de los ratones SHANK3 respecto a los silvestres ( $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 1.9192,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.2179,  $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 1.6132,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 1.4915,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 2.7210,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 1.8823), excepto en la última sesión ( $CV_{SHANK3}$  última sesión = 0.8264,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 0.9827). Finalmente, para los datos correspondiente a la recompensa, se observaron mayores valores para las neuronas correspondientes a los ratones silvestres respecto a los SHANK3 ( $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 0.6041,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.3460,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 1.7080,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 3.1623,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 0.7103,  $CV_{silvestres}$  últimas sesiones = 1.5952), excepto en la sesión previa al cambio en la contingencia ( $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 1.2558,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 0.9670). Estos datos muestran que la variación es dependiente de los estímulos y de la etapa de la tarea.



**Figura 17. Coeficientes de variación para las amplitudes de los transitorios de calcio a lo largo de las cuatro etapas de la tarea.** Para la pantalla blanca en todas las etapas los valores son los siguientes: CV SHANK3 primera sesión = 0.6570, CV silvestres primera sesión = 1.5779, CV SHANK3 previo a cambio = 1.3605, CV silvestres previo a cambio = 1.4823, CV SHANK3 post cambio = 1.9913, CV silvestres post cambio = 2.8138, CV SHANK3 última sesión = 1.3759, CV silvestres última sesión = 1.8835. Para el estímulo 1: CV SHANK3 primera sesión = 1.4266, CV silvestres primera sesión = 1.6097, CV SHANK3 previo a cambio = 1.7225, CV silvestres previo a cambio = 0.7043, CV SHANK3 post cambio = 0, CV silvestres post cambio = 2.8217, CV SHANK3 última sesión = 1.0771, CV silvestres última sesión = 1.7358. En el estímulo 2 los coeficientes de variación fueron los siguientes: CV SHANK3 primera sesión = 1.9192, CV silvestres primera sesión = 1.2179, CV SHANK3 previo a cambio = 1.6132, CV silvestres previo a cambio = 1.4915, CV SHANK3 post cambio = 2.7210, CV silvestres post cambio = 1.8823, CV SHANK3 última sesión = 0.8264, CV silvestres última sesión = 0.9827. Finalmente, para la recompensa se presentaron los siguientes valores: CV SHANK3 primera sesión = 0.6041, CV silvestres primera sesión = 1.3460, (SHANK3 previo a cambio = 1.2558, CV silvestres previo a cambio = 0.9670, CV SHANK3 post cambio = 1.7080, CV silvestres post cambio = 3.1623, CV SHANK3 última sesión = 0.7103, CV silvestres última sesión = 1.5952.

## 6.4 Cambios en la actividad neuronal en respuesta a la tarea visual

Para estimar como la actividad neuronal se modificaba en función del aprendizaje, identificamos los grupos de neuronas que respondían selectivamente a cada componente (estímulo 1, estímulo 2, pantalla blanca, recompensa) de la tarea visual a lo largo de las diferentes etapas de la tarea. Posterior a la identificación de los grupos neuronales, se promediaron las señales selectivas ante cada componente, midiendo sólo los cambios en la fluorescencia respecto al basal. Una vez obtenidas estas señales, se realizó un análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Duhn) que nos permitiera comparar la actividad de estas neuronas en el periodo de tiempo correspondiente al 'onset' del estímulo.

Durante la primera sesión observamos respuestas de las neuronas a todos los componentes de la tarea para ambos grupos experimentales. Es importante destacar que para las neuronas de los ratones SHANK3 no existieron diferencias entre las señales evocadas por los estímulos 1 y 2. Sin embargo, la señal del estímulo 1 fue diferente a la señal evocada por la pantalla blanca ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) y a la señal evocada por la recompensa ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ); la señal del estímulo 2 fue diferente a la señal evocada por la recompensa ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ). Mientras que en las neuronas de los ratones silvestres sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la señales correspondientes al estímulo 1 y a la recompensa ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 a).

En la sesión previa al cambio de contingencia, donde cabe resaltar que los ratones conductualmente mostraron un desempeño alto a la detección de los estímulos, lo cual nos llevó a considerarlos expertos. En esta sesión encontramos que aparentemente las respuestas empiezan a refinarse, en otras palabras, las neuronas comienzan a responder preferencialmente a algunos de los componentes

de la tarea (Fig. 18 b). Cuantitativamente, en los ratones SHANK3 existen diferencias de las señales evocadas por el estímulo 1 respecto a las señales para la pantalla blanca ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) y las señales resultantes de la recompensa ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ); en los ratones silvestres se observan diferencias solo entre la señal correspondiente al estímulo 2 respecto a la señal evocada por la pantalla blanca ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ).

Para el día del cambio en la contingencia se observa una aparente desorganización de los patrones registrados el día anterior. Los ratones SHANK3 muestran diferencias entre las señales evocadas por la pantalla blanca y el estímulo 2 ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) o entre la pantalla blanca y la señal evocada por la recompensa ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ). Para los ratones silvestres se encuentran diferencias entre las señales de del estímulo 1 ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ), el estímulo 2 ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) y la pantalla blanca ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) respecto a la señal correspondiente a la recompensa ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 c). En la sesión final no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los grupos, sin embargo, se puede observar, para ambos grupos, que la señal de la recompensa predomina sobre todas las otras.

Para estimar si existen diferencias entre las diferentes etapas de la tarea se realizó el mismo análisis Kruskal-Wallis. Los ratones SHANK3 presentaron pues la señal correspondiente al estímulo 1 durante la primera sesión es distinta a la señal evocada por ese mismo estímulo en la última sesión de la segunda contingencia ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 a,d), esta señal también muestra cambios significativos entre la sesión previa al cambio de contingencia y la última sesión de la segunda contingencia ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 b,d); respecto al estímulo 2 se observaron diferencias entre las señales evocadas durante la primera sesión y la sesión previa al cambio de contingencia ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 a, b), además de durante la última sesión de la segunda contingencia ( $H(2) = 182.9$ ,

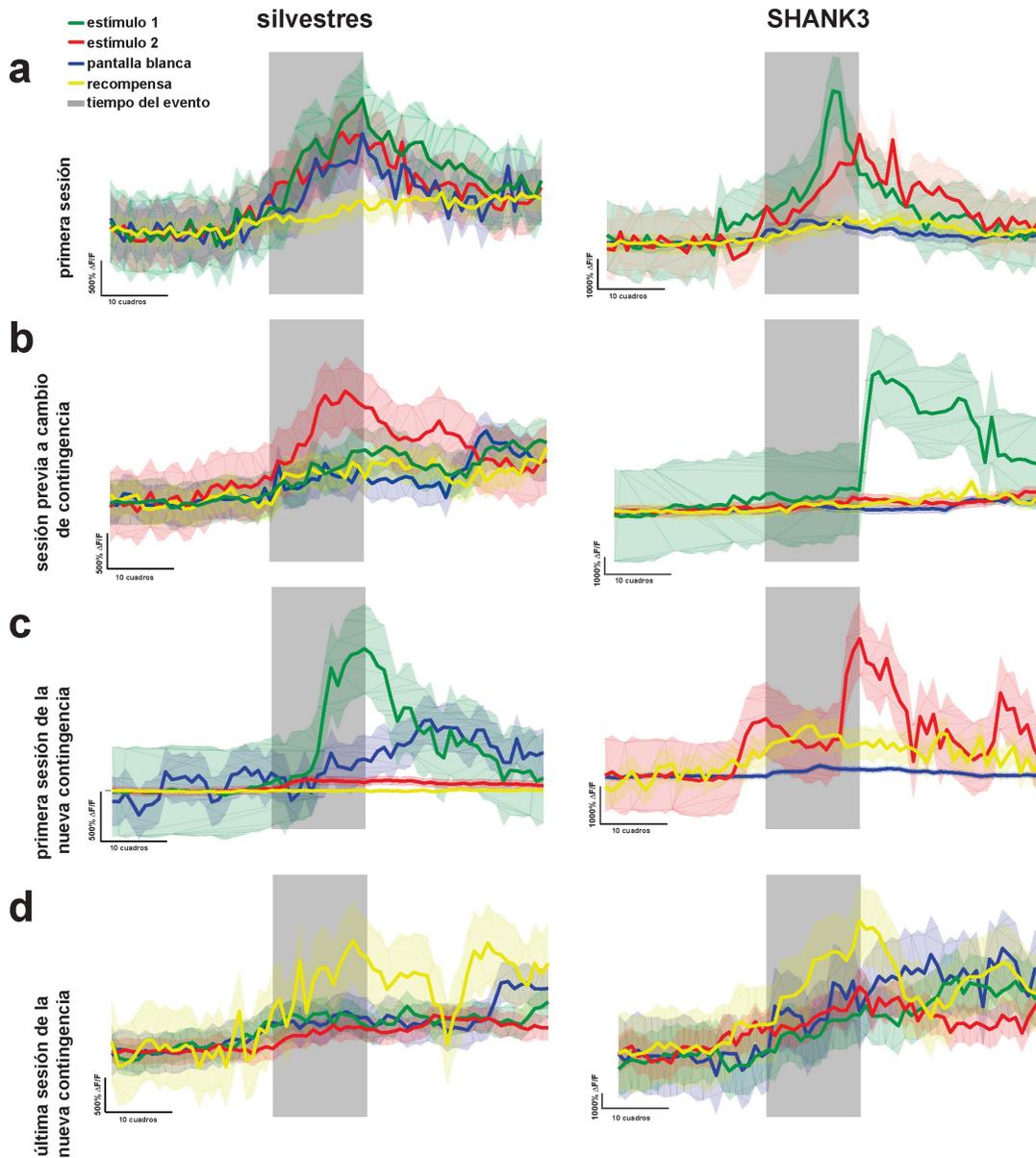
$p < 0.001$ ) (Fig. 18 a,d); respecto a la pantalla blanca solo existen diferencias entre la señales registradas en la primera sesión y las señales correspondientes a la primera sesión del cambio de contingencia ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 a,c ); finalmente, para la recompensa el único cambio fue entre las señales evocadas la sesión previa al cambio de contingencia y la primera sesión de la nueva contingencia ( $H(2) = 182.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig 18 b,c).

Para los ratones silvestres se registraron los siguientes cambios en las respuestas a los componentes de la tarea; el primero corresponde al observado en las señales del estímulo 1 durante la sesión previa al cambio de contingencia y la primera sesión de la nueva contingencia ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 b,c), durante las sesiones correspondientes a la primera sesión de la nueva contingencia y la última sesión de la nueva contingencia hay cambios significativos en las neuronas selectivas al estímulo 1 ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ); las neuronas selectivas al estímulo 2 durante la primera sesión generan una señal estadísticamente diferente a la generada durante la sesión final ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 a,d), de igual manera la señal es diferente entre la sesión previa al cambio de contingencia y la última sesión de la nueva contingencia ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 b,d), finalmente la señal del estímulo 2 durante la primera sesión de la nueva contingencia es distinta a la evocada durante la última sesión de la nueva contingencia ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 c,d); finalmente, la señal evocada por las neuronas selectivas a la recompensa durante la primera sesión de la nueva contingencia es distinta de la evocada por estas mismas neuronas en la última sesión de la nueva contingencia ( $H(2) = 145.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 c ,d).

Por último, se hicieron comparaciones entre los genotipos, estas se restringieron a comparar las señales de cada componente de la tarea en la misma sesión de imagen. Para la sesión previa al cambio de contingencia, se encontró que la señal que codificaba para el estímulo 1 es distinta entre genotipos ( $H(2) = 329.9$ ,

$p < 0.001$ ) (Fig. 18 b); para la primera sesión de la nueva contingencia se encontraron diferencias entre genotipos para las señales evocadas por la pantalla blanca ( $H(2) = 329.9$ ,  $p < 0.001$ ) y la recompensa ( $H(2) = 329.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig.18 c); en la sesión final solo se encontraron diferencias entre genotipos para la señal evocada por el estímulo 1 ( $H(2) = 329.9$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18 d).

Estos datos muestran por primera vez como la actividad neuronal se va modificando a lo largo del transcurso del protocolo de aprendizaje de manera diferencial entre los ratones SHANK3 y silvestres.



**Figura 18. Promedio de los transitorios de calcio evocados por los distintos componentes de la tarea.** a,b,c,d) Izquierda: Transitorios de calcio evocados por los diferentes componentes de la tarea en neuronas de ratones silvestres (SHANK3<sup>+/+</sup>). Derecha: Transitorios de calcio evocados por los diferentes componentes de la tarea en neuronas de ratones SHANK3 (SHANK3<sup>-/-</sup>). En cada panel se muestran las diferentes etapas de la adquisición de las señales de calcio con microcopia de excitación de dos fotones, la barra gris representa el tiempo en el que fue presentado el estímulo. Los datos representan el cambio en la en la fluorescencia respecto al basal.

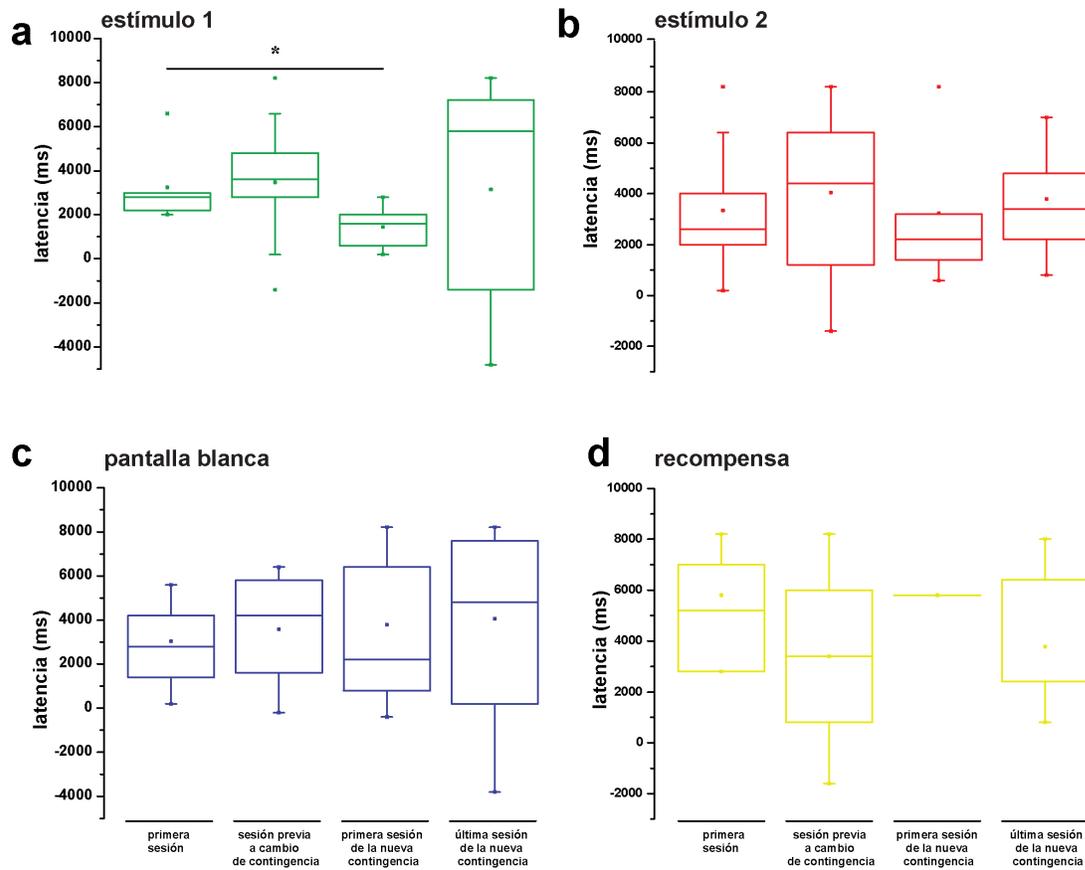
### 6.5 Latencias de respuesta de los transitorios de calcio ante los diferentes componentes de la tarea visual

Otro parámetro que se midió fue la latencia de respuesta a los diferentes

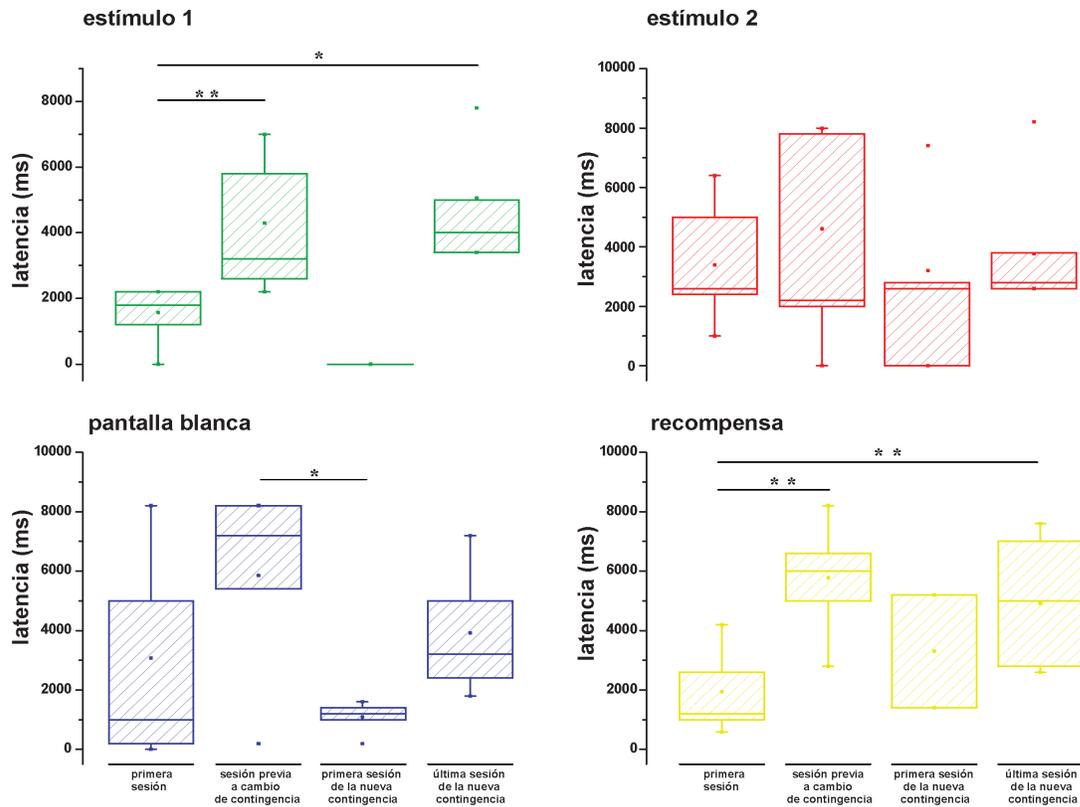
componentes de la tarea. Evaluamos las latencias calculando el tiempo transcurrido entre el inicio del evento y el punto máximo alcanzado por las respuestas de las poblaciones neuronales selectivas ante cada evento.

Respecto a lo anterior, encontramos que las neuronas ratones silvestres muestran diferencias significativas entre la primera sesión y la primera sesión de la nueva contingencia ante el Estimulo 1 (Prueba t de Welch  $t(8) = 2.43$ ,  $p < 0.05$ ). En este caso la latencia al punto máximo se redujo, mientras que en los demás casos no existieron diferencias significativas (Fig. 19).

Respecto a los ratones SHANK3 encontramos diferencias en respuesta a la pantalla blanca, entre las latencias de la sesión previa al cambio de contingencia y las latencias correspondientes a la primera sesión de la nueva contingencia (Prueba t de Welch  $t(4) = 3.133$ ,  $p < 0.05$ ), mostrando una disminución en la segunda etapa. Para las neuronas selectivas al estímulo 1 se presentaron diferencias significativas (t de Welch  $t(6) = 3.251$ ,  $p < 0.05$ ) entre las latencias durante la primera sesión y la sesión previa al cambio de contingencia. También se observaron diferencias significativas entre la primera sesión y la última sesión de la nueva contingencia (t de Welch  $t(3) = 3.418$ ,  $p < 0.05$ ); en ambas existe un aumento en las latencias. Finalmente existen diferencias a la recompensa entre la primera sesión y la sesión previa al cambio de contingencia (t de Welch  $t(9) = 4.209$ ,  $p < 0.05$ ), y entre la primera sesión y la última sesión de la nueva contingencia (t de Welch  $t(10) = 3.072$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 20).



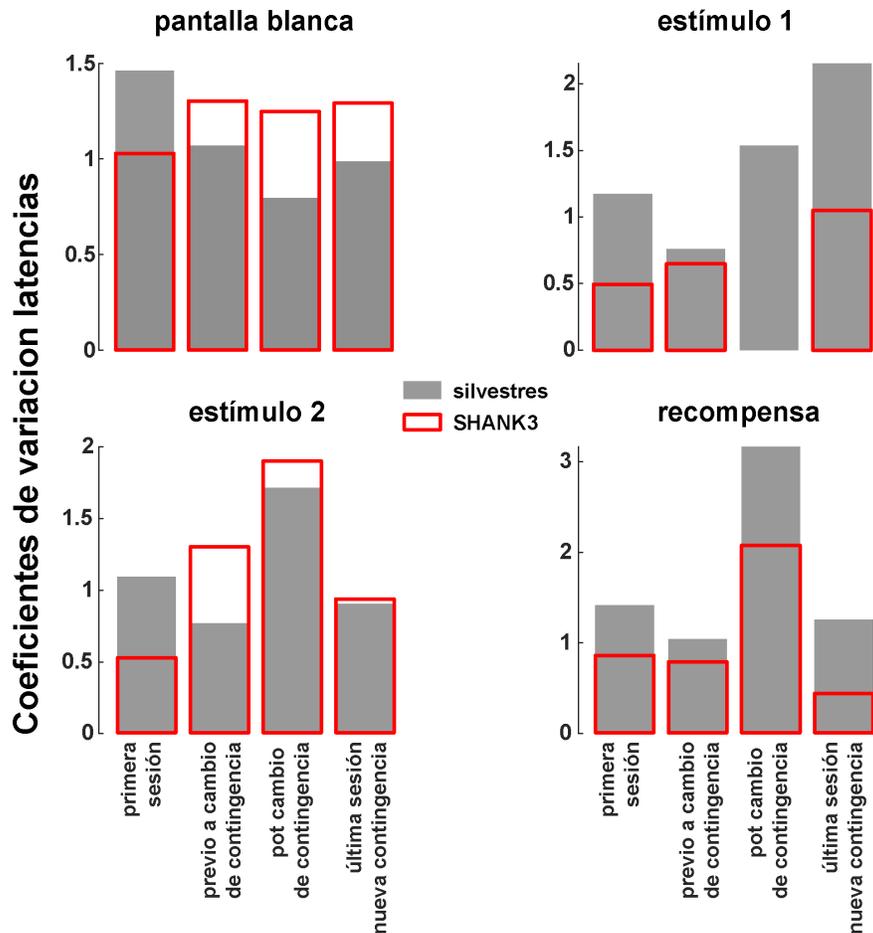
**Figura 19. Latencias de respuesta de los transitorios de calcio de ratones silvestres a los componentes de la tarea.** Se muestran las latencias al punto máximo de las señales obtenidas para cada uno de los eventos, el percentil más bajo (pctl 1) y el más alto (pctl 3) se representan en las observaciones en un rango percentil del 5 al 95; el diagrama también muestra la media y mediana de cada población de datos. Prueba t de Welch, \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 20. Latencias de respuesta de los transitorios de calcio de ratones SHANK3 a los componentes de la tarea.** Se muestran las latencias al punto máximo de las señales obtenidas para cada uno de los eventos, el percentil más bajo (pctl 1) y el más alto (pctl 3) se representan en las observaciones en un rango percentil del 5 al 95; el diagrama también muestra la media y mediana de cada población de datos. Prueba t de Welch,  $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$

Los coeficientes de variación fueron calculados para inferir la variabilidad de los datos de ambos genotipos (Fig. 21). Los gráficos muestran una menor variabilidad en los datos obtenidos para las neuronas de los ratones silvestres, respecto a los SHANK3, cuando hablamos de la pantalla blanca ( $CV_{SHANK3 \text{ previo a cambio}} = 1.3029$ ,  $CV_{\text{silvestres previo a cambio}} = 1.0646$ ,  $CV_{SHANK3 \text{ post cambio}} = 1.2475$ ,  $CV_{\text{silvestres post cambio}} = 0.7944$ ,  $CV_{SHANK3 \text{ última sesión}} = 1.2914$ ,  $CV_{\text{silvestres última sesión}} = 0.9867$ ), excepto para la primera sesión ( $CV_{SHANK3 \text{ primera sesión}} = 1.0288$ ,  $CV_{\text{silvestres primera sesión}} = 1.4612$ ) donde la variación es mayor para los ratones silvestres. Respecto de las latencias al estímulo 1, podemos concluir que la variación para las neuronas de los ratones SHANK3 es menor en los ratones silvestres para todas las sesiones ( $CV_{SHANK3 \text{ primera sesión}} = 0.4953$ ,  $CV_{\text{silvestres primera sesión}} = 1.1739$ ,  $CV_{SHANK3 \text{ previo a cambio}} = 0.6495$ ,  $CV_{\text{silvestres previo a$

cambio = 0.7581, CV SHANK3 post cambio = 0, CV silvestres post cambio = 1.5344, CV SHANK3 última sesión = 1.0502, CV silvestres última sesión = 2.1571). Respecto a las latencias al estímulo 2, los gráficos muestran una menor variabilidad en los datos obtenidos para las neuronas de los ratones silvestres, respecto a los SHANK3 (CV SHANK3 previo a cambio = 1.2966, CV silvestres previo a cambio = 0.7670, CV SHANK3 post cambio = 1.8954, CV silvestres post cambio = 1.7139, CV SHANK3 última sesión = 0.9325, CV silvestres última sesión = 0.9043), excepto para la primera sesión (CV SHANK3 primera sesión = 0.5237, CV silvestres primera sesión = 1.0940) donde la variación es mayor para los ratones silvestres. Finalmente, en las latencias respectivas a la recompensa, observamos que la variación para las neuronas de los ratones SHANK3 es menor a la de los ratones silvestres para todas las sesiones (CV SHANK3 primera sesión = 0.8526, CV silvestres primera sesión = 1.4172, CV SHANK3 previo a cambio = 0.7812, CV silvestres previo a cambio = 1.0431, CV SHANK3 post cambio = 2.0665, CV silvestres post cambio = 3.1623, CV SHANK3 última sesión = 0.4338, CV silvestres última sesión = 1.2585). Estos datos muestran que la variación es dependiente de los estímulos y de la etapa de la tarea.



**Figura 21. Coeficientes de variación para las amplitudes de los transitorios de calcio a lo largo de las cuatro etapas de la tarea.** Los valores de los coeficientes de variación para la pantalla blanca fueron:  $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 1.0288,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.4612,  $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 1.3029,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 1.0646,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 1.2475,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 0.7944,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 1.2914,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 0.9867. Para el estímulo 1 se presentaron los siguientes valores:  $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 0.4953,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.1739,  $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 0.6495,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 0.7581,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 0,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 1.5344,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 1.0502,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 2.1571. Respecto al estímulo 2 se encontraron los siguientes valores: ( $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 0.5237,  $CV_{silvestres}$  primera sesión = 1.0940,  $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 1.2966,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 0.7670,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 1.8954,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 1.7139,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 0.9325,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 0.9043. Finalmente, para la recompensa los valores fueron:  $CV_{SHANK3}$  primera sesión = 0.8526,  $CV_{silvestres}$  primeras sesiones = 1.4172,  $CV_{SHANK3}$  previo a cambio = 0.7812,  $CV_{silvestres}$  previo a cambio = 1.0431,  $CV_{SHANK3}$  post cambio = 2.0665,  $CV_{silvestres}$  post cambio = 3.1623,  $CV_{SHANK3}$  última sesión = 0.4338,  $CV_{silvestres}$  última sesión = 1.2585.

Estos datos en su conjunto muestran que las neuronas de ratones SHANK3 presentaron dinámicas similares al estímulo 1 y a la recompensa, en la primera sesión con respecto a la sesión previa al cambio de contingencia y a la última sesión, incrementando las latencias de respuesta para estos componentes. Contrario a lo que observamos en las neuronas de ratones silvestres donde sólo disminuyeron las latencias al estímulo 1 en la primera sesión y la sesión previa al cambio de contingencia, mientras que en el resto de las etapas de la tarea y los componentes no hubo cambios, las latencias permanecieron estables.

## **7. Discusión**

Los reportes acerca de las habilidades de discriminación en pacientes humanos con TEA muestran deficiencias en la flexibilidad cognitiva (American Psychiatric Association. & American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force., 2013; Harris et al., 2015; Harris et al., 2016; Izadi-Najafabadi, Mirzakhani-Araghi, Miri-Lavasani, Nejati, & Pashazadeh-Azari, 2015; Simmons et al., 2009). Esto se adapta a un estilo cognitivo ilustrado en la Hipótesis de la Función Perceptual Mejorada (Mottron, Dawson, Soulières, Hubert, & Burack, 2006), donde se explican las habilidades cognitivas superiores de los pacientes en relación a una desregulación de la actividad en las cortezas cerebrales sensoriales (Dakin & Frith, 2005). Actualmente sabemos que estas desregulaciones existen, que son morfológicas y fisiológicas, y consecuentemente promueven las alteraciones conductuales (Belmonte, Allen, et al., 2004; Belmonte, Cook Jr, et al., 2004; Belmonte & Yurgelun-Todd, 2003; Samson et al., 2012). En este proyecto fue utilizado un modelo genético de autismo, que emula las causas genéticas del síndrome de Phelan-McDermid produciendo un fenotipo de “tipo autista” en ratones, que como se mencionó anteriormente, es causado por la delección del gen Shank3 en una condición haploide (Bozdagi et al., 2010).

No existe un consenso respecto a las causas del TEA, sin embargo, tomando

ventaja de que se conoce la causa del Síndrome Phelan-McDermid, el modelo murino se convierte en un modelo ideal para el estudio de las alteraciones moleculares, y cómo éstas pueden alterar la actividad neuronal y por consiguiente el aprendizaje en el autismo.

Para dilucidar si la haploinsuficiencia de Shank3 participa en la inflexibilidad cognitiva reportada en pacientes con TEA, se entrenó a ratones SHANK3 y silvestres en un paradigma de discriminación de señales visuales. El paradigma diseñado para este experimento nos permitió evaluar la eficiencia de ambos genotipos en la discriminación de patrones y, al haber realizado un cambio en la contingencia, la flexibilidad cognitiva de los sujetos. Se observó que la capacidad de discriminar patrones visuales de los sujetos SHANK3 no es diferente a la presentada por los ratones silvestres pues durante las primeras 40 sesiones los sujetos de ambos genotipos alcanzaron un desempeño alto (con más del 70% de Aciertos). Sin embargo, durante la segunda contingencia hubo diferencias entre los grupos, en especial durante las últimas 10 sesiones pues el desempeño de los sujetos SHANK3 fue insuficiente para determinar que hubieran entendido la nueva contingencia (no más de 60% de Aciertos). El análisis detallado de la proporción de aciertos y falsas alarmas reveló que desde la onceava sesión de la Contingencia 2 los ratones silvestres eran capaces de aumentar su tasa de aciertos, mientras que los sujetos SHANK3 permanecían por debajo del 60% de aciertos. Con estos resultados podemos afirmar que, al menos durante el curso del experimento, los ratones SHANK3 fueron incapaces de aprender la nueva contingencia. Esto concuerda con los reportes en pacientes humanos, donde se presenta una ineficiente adquisición de tareas perceptuales debido a la previa exposición exacerbada de los sujetos a una contingencia (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). Concluimos que el fenómeno de sobre especificidad del aprendizaje también ocurre en el modelo murino de autismo SHANK3, y que la sobre especificidad del aprendizaje no parece deberse a diferencias en la adquisición de la primera tarea.

Adicionalmente existen datos de alteraciones en la actividad neuronal de los pacientes con TEA, en especial la información procesada por el sistema visual (Dakin & Frith, 2005; Dinstein et al., 2012; Dinstein et al., 2011; Just, Cherkassky, Keller, & Minshew, 2004; Shafai, Armstrong, Iarocci, & Oruc, 2015; S. Wang et al., 2015). Estas alteraciones usualmente hacen referencia a una sobre-activación de las áreas de procesamiento visual. Sin embargo no se ha podido realizar un análisis más fino debido a el tipo de técnicas disponibles. Datos recientes del laboratorio muestran alteraciones en la actividad neuronal de corteza primaria visual de ratones, pues presentan una mayor proporción de neuronas selectivas a la orientación (Ortiz Cruz, 2017). Sin embargo, se desconoce si la haploinsuficiencia de SHANK3 que provoca un fenotipo “tipo autista” altera la actividad neuronal, que pudiera estar relacionada con la inflexibilidad en reconocer una nueva contingencia en los ratones SHANK3.

Al explorar los cambios en las proporciones de neuronas selectivas para los componentes de la tarea notamos que las diferencias entre genotipos solo existen durante la segunda contingencia. Estos cambios en las proporciones se dan principalmente en los grupos de células selectivas a alguno de los estímulos presentados (patrones de enrejado), inclusive en los sujetos SHANK3 desaparece la categoría de neuronas selectivas al estímulo 1 durante la primera sesión del cambio en la contingencia, la señal perteneciente a la recompensa tiende a aumentar en la última sesión pero sin tener un cambio estadísticamente significativo. Estos datos muestran por primera vez como la actividad neuronal cambia en el transcurso de la evolución de una tarea de discriminación, y que es diferente en ratones SHANK3 respecto a los silvestres.

De las mismas poblaciones neuronales fueron evaluadas las amplitudes de las respuestas resultantes de la actividad grupal, esto se realizó para inferir la saliencia de estos estímulos en la población general de neuronas. Durante la Contingencia 1,

solo existen diferencias entre genotipos en la respuesta de las neuronas selectivas al Estimulo 1; en este caso las neuronas de los ratones SHANK3 presentan actividad hasta 5 veces mayor que sus contrapartes silvestres. Durante la Contingencia 2, las diferencias entre genotipos se observan en los Estímulos 1 y 2 pero solo en la Primera sesión de la nueva contingencia; en este caso las amplitudes de las señales generadas por las neuronas de los ratones SHANK3 son menores a las de los ratones silvestres. Estos datos podrían apoyar la teoría de Función Perceptual Mejorada (Mottron et al., 2006), especialmente en el apartado donde se dice que los pacientes con TEA son capaces de tener un desempeño superior en algunas actividades, siempre y cuando dependan de la identificación de estímulos sencillos (nivel bajo de procesamiento sensorial) (Dawson, Mottron, & Gernsbacher; Mottron et al., 2006; Samson et al., 2012) pues para el sistema se vuelven más salientes los componentes únicamente sensoriales.

Se ha reportado que cuando los organismos son expertos en la detección de algún estímulo sensorial, las latencias de respuesta a los estímulos son más cortas, sugiriendo esta latencia como un parámetro de predicción a aparición del estímulo (Ramesh et al., 2018). Si bien, no existen diferencias significativas entre genotipos, existen diferencias significativas intragrupalas a lo largo del experimento. Es importante resaltar que el mayor número de diferencias intragrupo se da en los ratones SHANK3 pues las neuronas de los sujetos silvestres solo muestran una disminución en las latencias de las neuronas selectivas al estímulo 1. Pareciera que las neuronas de los ratones SHANK3 son incapaces de mantener estable un patrón temporal en las repuestas.

En su conjunto estos datos concuerdan con lo reportado en pacientes con TEA, donde existe una inflexibilidad para aprender nuevas tareas después de una sobreexposición a una tarea previa similar (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016) lo que se observó en nuestro modelo de autismo. Además, estos datos muestran por

primera vez que la actividad neuronal y algunos parámetros son diferentes en los ratones SHANK3, lo que podría sugerir un diferente procesamiento de la información de la vía visual y consecuentemente una alteración en los patrones conductuales, lo cual se ha sugerido en la literatura (Motttron et al., 2006; Samson et al., 2012).

## 8. Conclusiones

1) Mediante un protocolo diseñado por nosotros, se evaluó la flexibilidad cognitiva de ratones silvestres y SHANK3. Los ratones SHANK3 mostraron deficiencias para entender un cambio en la contingencia que no podemos argumentar sea debido a problemas en la adquisición de la tarea, esto nos lleva a concluir que la sobre-especificidad del aprendizaje también existe en ratones con fenotipo “tipo autista”.

1.1) Se encontró que los ratones silvestres y SHANK3 no presentan diferencias en los  $d'$ , proporción de aciertos o proporción de falsas alarmas para la primera etapa de la tarea.

1.2) Las diferencias en el desempeño de la tarea se encontraron hasta las últimas 10 sesiones de la segunda contingencia, los valores de  $d'$  para los ratones SHANK3 sugieren la incapacidad de detectar que un estímulo diferente era recompensado y la baja tasa de aciertos corrobora esas observaciones.

1.3) El desempeño de los ratones durante la segunda contingencia nos permite catalogar con seguridad a los ratones como SHANK3 o silvestres.

1.4) La variación en el  $d'$  de los ratones SHANK3 es más alta que en los ratones silvestres, excepto en la primera sesión de la nueva contingencia.

2) Se cuantifico la actividad neuronal de V1 gracias a la implementación de exitosa de Microscopia de excitación de dos fotones en la corteza visual primaria para animales despiertos (Dombeck, Khabbaz, Collman, Adelman, & Tank, 2007; Goldey et al., 2014; Holtmaat et al., 2009).

2.1) Se encontraron que el número de neuronas selectivas ante algunos

componentes es diferente en ratones SHANK3 respecto a silvestres, esto para la etapa del cambio en la contingencia.

2.2) En la segunda contingencia, específicamente en la primera sesión donde esa regla fue presentada, se observaron diferencias en la actividad de las neuronas selectivas al estímulo 1 y la recompensa, esto comparando ratones silvestres y SHANK3.

2.3) Para la misma etapa se observaron diferencias en amplitudes de las respuestas a componentes clave (estímulo 2) entre ratones silvestres y SHANK3.

2.4) Las latencias al punto máximo de la señal de las neuronas de los ratones SHANK3 aumentan en función de las etapas de la tarea, excepto para el estímulo 2, donde no se observa ninguna modificación en este parámetro.

2.5) La variación en las respuestas se expresa en función de los componentes de la tarea y en función de las etapas.

3) Las diferencias en la actividad neuronal y en el desempeño de la tarea pueden ser explicadas por la haploinsuficiencia de SHANK3.

## 9. Glosario

1) **Densidad Post Sináptica**: región electrodensa de cientos de proteínas (MaGuk, ProSAP, Shank, cinasas, fosfatasas y ATPasas) que crean una interfase entre receptores, moléculas de adhesión, el citoesqueleto y vías de señalización; el arreglo de esta zona puede causar plasticidad estructural (Böckers, 2006).

2) **SHANK**: familia de proteínas que conforman y organizan proteínas de andamiaje intermedias, se encuentran en las sinapsis excitatorias donde son cruciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de las sinapsis (Monteiro & Feng, 2017).

3) **Haploinsuficiencia**: Situación donde una (de las dos) copia de un gen se encuentra inactiva o eliminada y la copia funcional restante no es adecuada para producir la cantidad necesaria de proteínas para mantener un correcto funcionamiento (National Cancer Institute at NIH, 2019).

4) **Receptores AMPA**: receptores ionotrópicos tetraméricos sensibles a L-Glutamato; su cinética es rápida y permite la rápida (en la escala de milisegundos) despolarización de la membrana post sináptica (Greger, Watson, & Cull-Candy, 2017).

5) **Receptores NMDA**: receptores ionotrópicos tetraméricos sensibles a L-Glutamato; se localizan en la pre y la post sinapsis, las subunidades de estos receptores puede cambiar en función del desarrollo, las enfermedades o procesos de plasticidad sináptica (Paoletti, Bellone, & Zhou, 2013).

6) **Receptores metabotrópicos (mGluR)**: recetores diméricos unidos a proteínas G sensibles a L-Glutamato; los receptores pertenecientes al Grupo I se encuentran unidos a proteínas Gq/G11, los receptores de los Grupos II y III se encuentran unidos a proteínas Gi/o; se localizan en sitios sinápticos (la post sinapsis) y extra sinápticos, son capaces de modificar la excitabilidad de las celular y la transmisión sináptica a través de vías de señalización (Niswender & Conn, 2010).

7) **Corrientes excitatorias postsinápticas miniatura (mEPC)**: corrientes que correlacionan con la liberación espontánea de un cuanto de neurotransmisor (Jones, 2002).

8) **Plasticidad sináptica**: modificaciones de la eficiencia sináptica dependientes de actividad (Abraham & Bear, 1996).

9) **Estimación de la probabilidad de activación (ALE)**: meta análisis que compara un voxel a la vez en estudios de neuro imagen; permite detectar diferencias, reportadas en distintas publicaciones, en la actividad cerebral relacionada a eventos (Samson et al., 2012).

10) **Flexibilidad cognitiva**: dimensión central de las funciones ejecutivas que permite el control de las acciones y la adaptación flexible ante ambientes cambiantes permitiendo el cambio entre distintas tareas (Buttelmann & Karbach, 2017).

a. Inflexibilidad Cognitiva: ausencia de flexibilidad cognitiva (Buttelmann & Karbach, 2017; Harris et al., 2015; Harris et al., 2016).

11) **Sobre-especificidad del aprendizaje**: estilo anómalo de aprendizaje que refleja una pobre (Ortiz Cruz, 2017) adquisición de la tarea y, por ende, una falla en la generalización de las reglas de aprendizaje mostradas en una tarea anterior (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016).

12) **Patrón de enrejado en movimiento**: estímulo que consiste en un patrón completo de enrejado sinusoidal que se mueve en una dirección perpendicular a la orientación del patrón de enrejado (Allen Institute, 2019).

13) **Contingencia**: relación entre una respuesta y una consecuencia que puede ser positiva (si aumenta la probabilidad de emisión de la respuesta) o negativa (si disminuye la probabilidad de emisión de la respuesta), también puede llamarse contingencia respuesta-reforzador (American Psychological Association, 2019).

14) **Neurona modulada**: célula con una respuesta significativamente mayor (respecto a su actividad basal) ante una característica (Ortiz Cruz, 2017).

15) **Neurona selectiva:** célula con una respuesta significativamente mayor (respecto a su actividad basal) ante una y solo una característica (Ortiz Cruz, 2017).

16)  **$d'$ :** medida usada en el campo de la Teoría de detección de señales que evalúa la distancia entre la señal (estimulo) y el ruido (ausencia de estímulo) en unidades de desviación estándar (Stanislaw et al., 1999).

## 10. Referencias

Abraham, Wickliffe C, & Bear, Mark F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*, 19(4), 126-130.

Allen Institute. (2019). Allen Brain Observatory: Visual Coding.

American Psychiatric Association., & American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (5th ed.). Washington, D.C.: American Psychiatric Association.

American Psychological Association. (2019). reinforcement contingency. Retrieved 5-16-2019, 2019, from <https://dictionary.apa.org/reinforcement-contingency>.

Armington, John. (2012). *Visual psychophysics and physiology: a volume dedicated to Lorrin Riggs*: Elsevier.

Baum, Sarah H, Stevenson, Ryan A, & Wallace, Mark T %J Progress in neurobiology. (2015). Behavioral, perceptual, and neural alterations in sensory and multisensory function in autism spectrum disorder. 134, 140-160.

Belmonte, Matthew K, Allen, Greg, Beckel-Mitchener, Andrea, Boulanger, Lisa M, Carper, Ruth A, & Webb, Sara J %J Journal of Neuroscience. (2004). Autism and abnormal development of brain connectivity. 24(42), 9228-9231.

Belmonte, Matthew K, Cook Jr, Edwin H, Anderson, George M, Rubenstein, John LR, Greenough, William T, Beckel-Mitchener, Andrea, . . . Levitt, Pat R %J Molecular psychiatry. (2004). Autism as a disorder of neural information processing: directions for research and targets for therapy. 9(7), 646.

Belmonte, Matthew K, & Yurgelun-Todd, Deborah A %J Cognitive brain research. (2003). Functional anatomy of impaired selective attention and compensatory processing in autism. 17(3), 651-664.

Böckers, Tobias M. (2006). The postsynaptic density. *Cell and tissue research*, 326(2), 409-422.

Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*, 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. *Mol Autism*, 1(1), 15. doi: 10.1186/2040-2392-1-15

Busse, Laura. (2018). The Mouse Visual System and Visual Perception *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 27, pp. 53-68): Elsevier.

Buttelmann, Frances, & Karbach, Julia. (2017). Development and plasticity of cognitive flexibility in early and middle childhood. *Frontiers in psychology*, 8, 1040.

Carbonetto, S. (2014). A blueprint for research on Shankopathies: a view from research on autism spectrum disorder. *Dev Neurobiol*, 74(2), 85-112. doi: 10.1002/dneu.22150

Chen, Chinfai, Bickford, Martha E, & Hirsch, Judith A %J Cell. (2016). Untangling the web between eye and brain. *165*(1), 20-21.

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

Costales, J. L., & Kolevzon, A. (2015). Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics*, 12(3), 620-630. doi: 10.1007/s13311-015-0352-z

Dakin, Steven, & Frith, Uta. (2005). Vagaries of visual perception in autism. *Neuron*, 48(3), 497-507.

Dana, Hod, Sun, Yi, Mohar, Boaz, Hulse, Brad, Hasseman, Jeremy P, Tsegaye, Getahun, Macklin, John J %J bioRxiv. (2018). High-performance GFP-based calcium indicators for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. 434589.

Dawson, Michelle, Mottron, Laurent, & Gernsbacher, Morton Ann. Learning in autism.

Denk, W., & Svoboda, K. (1997). Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, 18(3), 351-357.

Dhar, SU, Del Gaudio, D, German, JR, Peters, SU, Ou, Z, Bader, PI, Graham, BH. (2010). 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *American journal of medical genetics Part A*, 152(3), 573-581.

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., Eyler, 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

Dombeck, D. A., Khabbaz, A. N., Collman, F., Adelman, T. L., & Tank, D. W. (2007). Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron*, *56*(1), 43-57. doi: 10.1016/j.neuron.2007.08.003

Drager, U. C., & Hubel, D. H. (1975). Physiology of visual cells in mouse superior colliculus and correlation with somatosensory and auditory input. *Nature*, *253*(5488), 203-204.

Dumoulin, Serge O, Baker Jr, Curtis L, Hess, Robert F, & Evans, Alan C %J Cerebral Cortex. (2003). Cortical specialization for processing first-and second-order motion. *13*(12), 1375-1385.

Dylda, Evelyn, Pakan, Janelle MP, & Rochefort, Nathalie L. (2019). Chronic Two-Photon Calcium Imaging in the Visual Cortex of Awake Behaving Mice *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 28, pp. 235-251): Elsevier.

Fechner, Gustav. (1966). Elements of psychophysics. Vol. I.

Fitzpatrick, David %J Cerebral cortex. (1996). The functional organization of local circuits in visual cortex: insights from the study of tree shrew striate cortex. *6*(3), 329-341.

Franklin, Keith BJ, & Paxinos, George. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Vol. 3): Academic press New York:.

Gaugler, Trent, Klei, Lambertus, Sanders, Stephan J, Bodea, Corneliu A, Goldberg, Arthur P, Lee, Ann B, Reichert, Jennifer %J Nature genetics. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *46*(8), 881.

Glickfeld, L. L., Histed, M. H., & Maunsell, J. H. (2013). Mouse primary visual cortex is used to detect both orientation and contrast changes. *J Neurosci*, *33*(50), 19416-19422. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3560-13.2013

Goldey, Glenn J, Roumis, Demetris K, Glickfeld, Lindsey L, Kerlin, Aaron M, Reid, R Clay, Bonin, Vincent, Andermann, Mark L %J Nature protocols. (2014). Removable cranial windows for long-term imaging in awake mice. *9*(11), 2515.

Greger, Ingo H, Watson, Jake F, & Cull-Candy, Stuart G. (2017). Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins. *Neuron*, *94*(4), 713-730.

Guo, Zengcai V, Hires, S Andrew, Li, Nuo, O'Connor, Daniel H, Komiyama, Takaki, Ophir, Eran, Gutnisky, Diego %J PloS one. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *9*(2), e88678.

Han, Qingjian, Kim, Yong Ho, Wang, Xiaoming, Liu, Di, Zhang, Zhi-Jun, Bey, Alexandra L, Zhang, Yan. (2016). SHANK3 deficiency impairs heat hyperalgesia and TRPV1 signaling in primary sensory neurons. *Neuron*, *92*(6), 1279-1293.

Harris, Hila, Israeli, David, Minshew, Nancy, Bonneh, Yoram, Heeger, David J, Behrmann, Marlene, & Sagi, Dov %J Nature neuroscience. (2015). Perceptual learning in autism: over-

specificity and possible remedies. *18*(11), 1574.

Harris, Hila, Israeli, David, Minshew, Nancy J, Bonneh, Yoram S, Heeger, David J, Behrmann, Marlene, & Sagi, Dov %J *Frontiers in integrative neuroscience*. (2016). Response: Commentary: Perceptual learning in autism: over-specificity and possible remedies. *10*, 36.

Helassa, Nordine, Podor, Borbala, Fine, Alan, & Török, Katalin %J *Scientific reports*. (2016). Design and mechanistic insight into ultrafast calcium indicators for monitoring intracellular calcium dynamics. *6*, 38276.

Holtmaat, Anthony, Bonhoeffer, Tobias, Chow, David K, Chuckowree, Jyoti, De Paola, Vincenzo, Hofer, Sonja B, . . . Lee, Wei-Chung A %J *Nature protocols*. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *4*(8), 1128.

Huguet, Guillaume, Ey, Elodie, Bourgeron, Thomas %J *Annual review of genomics, & genetics, human*. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *14*, 191-213.

Ito, Shinya, & Feldheim, David A %J *Frontiers in neural circuits*. (2018). The mouse superior colliculus: an emerging model for studying circuit formation and function. *12*, 10.

Izadi-Najafabadi, Sara, Mirzakhani-Araghi, Navid, Miri-Lavasani, Negar, Nejati, Vahid, & Pashazadeh-Azari, Zahra %J *Research in developmental disabilities*. (2015). Implicit and explicit motor learning: Application to children with Autism Spectrum Disorder (ASD). *47*, 284-296.

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

Jones, Rachel. (2002). Synaptic plasticity: Scaling synaptic strength. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(8), 583.

Just, Marcel Adam, Cherkassky, Vladimir L, Keller, Timothy A, & Minshew, Nancy J %J *Brain*. (2004). Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *127*(8), 1811-1821.

Keck, Tara, Keller, Georg B, Jacobsen, R Irene, Eysel, Ulf T, Bonhoeffer, Tobias, & Hübener, Mark. (2013). Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo. *Neuron*, *80*(2), 327-334.

Keehn, Brandon, Shih, Patricia, Brenner, Laurie A, Townsend, Jeanne, & Müller, Ralph-Axel. (2013). Functional connectivity for an “island of sparing” in autism spectrum disorder: An fMRI study of visual search. *Human brain mapping*, *34*(10), 2524-2537.

Khan, Adil G, Poort, Jasper, Chadwick, Angus, Blot, Antonin, Sahani, Maneesh, Mrsic-Flogel, Thomas D, & Hofer, Sonja %J *Nature neuroscience*. (2018). Distinct learning-induced changes in stimulus selectivity and interactions of GABAergic interneuron classes in visual cortex. *1*.

Leblond, Claire S, Nava, Caroline, Polge, Anne, Gauthier, Julie, Huguet, Guillaume, Lumbroso, Serge, Mouzat, Kevin J PLoS genetics. (2014). Meta-analysis of SHANK mutations in autism spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *10*(9), e1004580.

Lim, Sangmi, Naisbitt, Scott, Yoon, Jiyoung, Hwang, Jong-Ik, Suh, Pann-Ghill, Sheng, Morgan, & Kim, Eunjoon. (1999). Characterization of the Shank Family of Synaptic Proteins MULTIPLE GENES, ALTERNATIVE SPLICING, AND DIFFERENTIAL EXPRESSION IN BRAIN AND DEVELOPMENT. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(41), 29510-29518.

Lord, Catherine, Elsabbagh, Mayada, Baird, Gillian, & Veenstra-Vanderweele, Jeremy %J The Lancet. (2018). Autism spectrum disorder.

Marques, T., Summers, M. T., Fioreze, G., Fridman, M., Dias, R. F., Feller, M. B., & Petreanu, L. (2018). A Role for Mouse Primary Visual Cortex in Motion Perception. *Curr Biol*, *28*(11), 1703-1713 e1706. doi: 10.1016/j.cub.2018.04.012

Meshalkina, Daria A, Kizlyk, Marina N, Kysil, Elana V, Collier, Adam D, Echevarria, David J, Abreu, Murilo S, Kyzar, Evan J %J Experimental neurology. (2018). Zebrafish models of autism spectrum disorder. *299*, 207-216.

Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*, *18*(3), 147-157. doi: 10.1038/nrn.2016.183

Mottron, Laurent, Dawson, Michelle, Soulieres, Isabelle, Hubert, Benedicte, & Burack, Jake. (2006). Enhanced perceptual functioning in autism: an update, and eight principles of autistic perception. *Journal of autism and developmental disorders*, *36*(1), 27-43.

Naarendorp, Frank, Esdaille, Tricia M, Banden, Serenity M, Andrews-Labenski, John, Gross, Owen P, & Pugh, Edward N %J Journal of Neuroscience. (2010). Dark light, rod saturation, and the absolute and incremental sensitivity of mouse cone vision. *30*(37), 12495-12507.

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, *23*(3), 569-582.

National Cancer Institute at NIH. (2019). NCI Dictionary of Genetics, haploinsufficiency. Retrieved 5-16-2019, 2019, from <https://http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/haploinsufficiency>

Niswender, Colleen M, & Conn, P Jeffrey. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *50*, 295-322.

Ohki, Kenichi, & Reid, R Clay %J Current opinion in neurobiology. (2007). Specificity and randomness in the visual cortex. *17*(4), 401-407.

Ortiz Cruz, Carlos Alberto. (2017). *Analisis de la actividad neuronal de la corteza visual de ratones tipo autista (SHANK3) in vivo en modo cabeza fija mediante microscopia de excitacion de dos fotones*. (Biologo), Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

Paoletti, Pierre, Bellone, Camilla, & Zhou, Qiang. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383.

Peirce, Jonathan W. (2007). PsychoPy—psychophysics software in Python. *Journal of neuroscience methods*, 162(1-2), 8-13.

Phelan, K, & McDermid, HE %J Molecular syndromology. (2011). The 22q13. 3 deletion syndrome (Phelan-McDermid syndrome). 2(3-5), 186-201.

Pnevmatikakis, Eftychios A, Merel, Josh, Pakman, Ari, & Paninski, Liam. (2013). *Bayesian spike inference from calcium imaging data*. Paper presented at the 2013 Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers.

Pnevmatikakis, Eftychios A, Soudry, Daniel, Gao, Yuanjun, Machado, Timothy A, Merel, Josh, Pfau, David, . . . Yang, Weijian %J Neuron. (2016). Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data. 89(2), 285-299.

Poll, Stefanie, & Fuhrmann, Martin. (2019). Long-Term In Vivo Imaging of Structural Plasticity in Rodents *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 28, pp. 253-262): Elsevier.

Poort, J., Khan, A. G., Pachitariu, M., Nemri, A., Orsolic, I., Krupic, J., Hofer, S. B. (2015). Learning Enhances Sensory and Multiple Non-sensory Representations in Primary Visual Cortex. *Neuron*, 86(6), 1478-1490. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.037

Priebe, Nicholas J, & McGee, Aaron W. (2014). Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. *Frontiers in neural circuits*, 8, 123.

Ramesh, Rohan N, Burgess, Christian R, Sugden, Arthur U, Gyetvan, Michael, & Andermann, Mark L J Neuron. (2018). Intermingled Ensembles in Visual Association Cortex Encode Stimulus Identity or Predicted Outcome. 100(4), 900-915. e909.

Read, JCA J Neuroscience. (2015). The place of human psychophysics in modern neuroscience. 296, 116-129.

Sala, Carlo, Vicidomini, Cinzia, Bigi, Ilaria, Mossa, Adele, & Verpelli, Chiara J Journal of neurochemistry. (2015). Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders. 135(5), 849-858.

Samson, Fabienne, Mottron, Laurent, Soulières, Isabelle, & Zeffiro, Thomas A J Human brain mapping. (2012). Enhanced visual functioning in autism: An ALE meta-analysis. 33(7), 1553-1581.

Schmeisser, Michael J, & Verpelli, Chiara. (2016). SHANK mutations in intellectual disability and autism spectrum disorder *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability* (pp. 151-160): Elsevier.

Schwarzkopf, D Samuel, Anderson, Elaine J, de Haas, Benjamin, White, Sarah J, & Rees, Geraint J *Journal of Neuroscience*. (2014). Larger extrastriate population receptive fields in autism spectrum disorders. *34*(7), 2713-2724.

Shafai, Fakhri, Armstrong, Kimberly, Iarocci, Grace, & Oruc, Ipek J *Journal of vision*. (2015). Visual orientation processing in autism spectrum disorder: No sign of enhanced early cortical function. *15*(15), 18-18.

Simmons, David R, Robertson, Ashley E, McKay, Lawrie S, Toal, Erin, McAleer, Phil, & Pollick, Frank E J *Vision research*. (2009). Vision in autism spectrum disorders. *49*(22), 2705-2739.

Stanislaw, Harold, & Todorov, Natasha (1999). Calculation of signal detection theory measures. *J Behavior research methods, instruments, computers*, *31*(1), 137-149.

Stanislaw, Harold, Todorov, Natasha %J *Behavior research methods, instruments, & computers*. (1999). Calculation of signal detection theory measures. *31*(1), 137-149.

Sun, Wenzhi, Tan, Zhongchao, Mensh, Brett D, & Ji, Na. (2016). Thalamus provides layer 4 of primary visual cortex with orientation-and direction-tuned inputs. *Nature neuroscience*, *19*(2), 308.

Svoboda, K., & Yasuda, R. (2006). Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*, *50*(6), 823-839. doi: 10.1016/j.neuron.2006.05.019

Thevenaz, Philippe, Ruttimann, Urs E, & Unser, Michael. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE transactions on image processing*, *7*(1), 27-41.

Wang, Shuo, Jiang, Ming, Duchesne, Xavier Morin, Laugeson, Elizabeth A, Kennedy, Daniel P, Adolphs, Ralph, & Zhao, Qi %J *Neuron*. (2015). Atypical visual saliency in autism spectrum disorder quantified through model-based eye tracking. *88*(3), 604-616.

Wang, Xiaoming, McCoy, Portia A, Rodriguiz, Ramona M, Pan, Yanzhen, Je, H Shawn, Roberts, Adam C, Bousquet-Moore, Danielle. (2011). Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Human molecular genetics*, *20*(15), 3093-3108.

Wilson, HL, Wong, ACC, Shaw, SR, Tse, WY, Stapleton, GA, Phelan, MC, McDermid, HE. (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.

World Health Organization. (2018). Autism spectrum disorders. Retrieved 05-14-2019, 2019, from <https://http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>

Wu, Song, Gan, Guangming, Zhang, Zhiping, Sun, Jie, Wang, Qifu, Gao, Zhongbao, Thomas, Ulrich. (2017). A Presynaptic Function of Shank Protein in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, *37*(48), 11592-11604.

Zhao, Hui, Tu, Zhuchi, Xu, Huijuan, Yan, Sen, Yan, Huanhuan, Zheng, Yinghui, Tian, Rui. (2017). Altered neurogenesis and disrupted expression of synaptic proteins in prefrontal cortex of SHANK3-deficient non-human primate. *Cell research*, 27(10), 1293.

Zhou, P., Resendez, S. L., Rodriguez-Romaguera, J., Jimenez, J. C., Neufeld, S. Q., Giovannucci, A., Paninski, L. (2018). Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data. *Elife*, 7. doi: 10.7554/eLife.28728

Zoccolan, Davide, & Di Filippo, Alessandro. (2018). Methodological Approaches to the Behavioural Investigation of Visual Perception in Rodents *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 27, pp. 69-101): Elsevier.

Zoghbi, Huda Y, & Bear, Mark F J Cold Spring Harbor perspectives in biology. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. a009886.