



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Dinámica de la actividad neuronal de la corteza visual primaria durante el aprendizaje de una tarea de discriminación visual en un modelo genético de autismo (Shank3)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Carlos Alberto Ortiz Cruz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS

Dra. Yazmín Ramiro Cortés

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Comité Tutor

Dr. Luis Alberto Carrillo Reid

Instituto de Neurobiología, UNAM.

Comité Tutor

Dr. José Fernando Peña Ortega

Instituto de Neurobiología, UNAM.

CD. MX.

JUNIO de 2021



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
OFICIO CPCB/538/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

LIC. DIANA GONZÁLEZ NIETO

Directora de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria(virtual) del día 26 de abril de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **ORTIZ CRUZ CARLOS ALBERTO** con número de cuenta **310126355** con la tesis titulada **“Dinámica de la actividad neuronal de la corteza visual primaria durante el aprendizaje de una tarea de discriminación visual en un modelo genético de autismo (Shank3)”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. JOSÉ GERARDO ROJAS PILONI
Vocal: DR. FRANCISCO XAVIER SOTRÉS BAYÓN
Vocal: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
Vocal: DRA. ZEIDY VANESSA MUÑOZ TORRES
Secretario: DRA. VIOLETA GISSELLE LÓPEZ HUERTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de junio de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Dinámica de la actividad neuronal de la corteza visual primaria durante el aprendizaje de una tarea de discriminación visual en un modelo genético de autismo (Shank3)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Carlos Alberto Ortiz Cruz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS

Dra. Yazmín Ramiro Cortés

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Comité Tutor

Dr. Luis Alberto Carrillo Reid

Instituto de Neurobiología, UNAM.

Comité Tutor

Dr. José Fernando Peña Ortega

Instituto de Neurobiología, UNAM.

MÉXICO, CD. MX. JUNIO de 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
OFICIO CPCB/538/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

LIC. DIANA GONZÁLEZ NIETO

Directora de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria(virtual) del día 26 de abril de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **ORTIZ CRUZ CARLOS ALBERTO** con número de cuenta **310126355** con la tesis titulada **“Dinámica de la actividad neuronal de la corteza visual primaria durante el aprendizaje de una tarea de discriminación visual en un modelo genético de autismo (Shank3)”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. JOSÉ GERARDO ROJAS PILONI
Vocal: DR. FRANCISCO XAVIER SOTRÉS BAYÓN
Vocal: DRA. ZEIDY VANESSA MUÑOZ TORRES
Vocal: DRA. VIOLETA GISSELLE LÓPEZ HUERTA
Secretario: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de junio de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Proyecto CONACYT- Ciencia Básica 254878 y al Proyecto Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/UNAM (PAPIIT)-IA201915 por el apoyo económico

Finalmente, a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, Tutora Principal, al Dr. Luis Carrillo Reid y al Dr. José Fernando Peña Ortega, miembros del Comité Tutor.

Agradecimientos personales

A mi familia, padres y hermanos que me han apoyado y han admirado mi labor.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo en la realización de este proyecto y por hacer que este tiempo fuera una grata experiencia,

A los compañeros y amigos del BL-202. Por su apoyo académico y personal. Así como todas las inolvidables experiencias.

Al Lic. Martín García, por su apoyo en el ámbito computacional y aspectos de programación, así como por su amistad.

A mis profesores del posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Su labor es admirable.

| | |
|--|----|
| Índice | |
| Resumen..... | 1 |
| 1. Introducción | 3 |
| 1.1 Trastorno de espectro autista..... | 3 |
| 1.2 Síndrome Phelan-McDermid y SHANK3 | 3 |
| 1.3 Modelo genético de autismo PMS (ratones Shank3)..... | 6 |
| 1.4 Alteraciones en el procesamiento neuronal de la información visual en el autismo | 8 |
| 1.5 Actividad neuronal de la corteza visual primaria de ratones asociada a aprendizaje | 9 |
| 1.6 Imagenología de calcio con microscopía de excitación de dos fotones | 11 |
| 1.7 Antecedentes de la actividad neuronal en modelos murinos de patologías del neurodesarrollo..... | 12 |
| 2. Planteamiento del Problema..... | 14 |
| 3. Hipótesis..... | 15 |
| 4. Objetivo general..... | 16 |
| 4.1 Objetivos particulares | 16 |
| 5. Métodos | 16 |
| 5.1 Animales..... | 16 |
| 5.2 Cirugías estereotáxicas..... | 17 |
| 5.3 Protocolos conductuales | 19 |
| 5.4 Imagenología de calcio in vivo a través de microscopia de excitación de dos fotones. | 23 |
| 5.5 Obtención y análisis de datos..... | 25 |
| 5.6 Análisis de imagenología de calcio..... | 26 |
| 5.7 Estadística..... | 28 |
| 6. Resultados | 29 |
| 6.1. Los ratones Shank3 muestran un mejor desempeño en la realización de la tarea de discriminación visual | 29 |
| 6.2 Cambio en las proporciones de neuronas con actividad modulada por los estímulos en respuesta a la tarea Go - No Go | 35 |
| 6.3 Cambios en la intensidad de la actividad neuronal asociados al aprendizaje | 38 |
| 6.4 Dinámica temporal de la actividad neuronal asociada al aprendizaje..... | 39 |
| 7. Discusión | 43 |
| 8. Conclusiones..... | 47 |
| 9. Referencias..... | 48 |

Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA), es un trastorno del neurodesarrollo. Se caracteriza por cuatro síntomas centrales: deficiencias en el lenguaje, deficiencias en la interacción social, movimientos repetitivos o estereotipados y alteraciones sensoriales. Dentro de las alteraciones sensoriales más estudiadas en el TEA, están los procesos visuales, como atención visual atípica, percepción atípica del movimiento global, incremento de la actividad en áreas de procesamiento visual, entre otros. Sin embargo, se desconocen los mecanismos neuronales subyacentes y cómo las alteraciones neuronales repercuten en la conducta.

Para el estudio de los mecanismos neuronales del TEA, utilizamos un modelo genético de autismo, ratones heterocigotos *Shank3*, un modelo basado en el síndrome Phelan-McDermid, causado por la delección haploide del gen *Shank3*. Sabemos que estos ratones presentan mayor proporción de neuronas que responden a estímulos visuales, además estas neuronas poseen un mayor índice de selectividad a la orientación en comparación a ratones silvestres. En estos ratones evaluamos como la haploinsuficiencia de *Shank3* afecta la actividad neuronal de la corteza visual primaria durante el aprendizaje en una tarea de discriminación visual de tipo Go-No go. Los resultados muestran que los ratones *Shank3* aprenden más rápido la tarea, y su actividad neuronal es más dinámica sin cambiar la magnitud de su respuesta, lo cual sugiere que puede haber cambios a nivel intracortical que procesen de manera diferente la información en los ratones *Shank3*–

Abstract

Autism spectrum disorder or ASD is a neurodevelopment disorder whose hallmarks are characterized by social deficits, language impairment, repetitive or stereotyped behaviors, and sensory abnormalities. Visual processing in ASD is one of the most studied sensory alterations, for instance has been reported that patients with ADS shown atypical visual attention, atypical perception in global motion, and increased neuronal activity in visual processing brain areas. However, is it unknown the neuronal bases of ASD and how neuronal alterations may affect the behavior.

Our goal is to study the neural activity in the primary visual cortex (V1) of a genetic mouse model of ASD, specifically, a Phelan McDermid syndrome, caused by a deletion of the Shank3 gene in one allele chromosome 22 in humans. Thus, using heterozygous Shank3 mice, which showed a higher proportion of modulated neurons in response to visual gratings. Moreover, these neurons display a higher orientation selectivity index in comparison to wild-type mice.

Herein, using Shank3 mice we evaluated how the haploinsufficiency of Shank3 might affect the neuronal activity of V1 during learning in response to a Go-No go visual discrimination task. Our results show that Shank3 mice learn quickly in comparison to wild-type mice. Regarding neuronal activity, we found out that the neuronal activity is more dynamic with change the magnitude, this suggests that intracortical changes may occur which may alter the cortical processing in Shank3 mice.

1. Introducción

1.1 Trastorno de espectro autista.

El trastorno de espectro autista (TEA) es considerado un desorden del neurodesarrollo, sus síntomas centrales son deficiencias en la comunicación verbal y no verbal, deficiencias en la interacción social, conductas repetitivas o estereotipadas, y alteraciones en la percepción sensorial (Association 2013) . Así mismo, existe una comorbilidad con otras condiciones médicas o psiquiátricas tales como discapacidad intelectual, epilepsias, dificultades en el control motor, ansiedad, trastorno por déficit de atención por hiperactividad, desórdenes del sueño, problemas gastrointestinales, entre otros (Bourgeron 2015, Schroeder et al 2017). Actualmente se considera que el TEA es un desorden común, ya que se estima que la prevalencia global es de 1 en 160 niños de acuerdo con el último reporte de la OMS (Elsabbagh et al 2012).

1.2 Síndrome Phelan-McDermid y SHANK3

A la fecha, se desconocen las causas del TEA. Sin embargo, se ha reportado que existe un componente genético importante. Algunas alteraciones genéticas detectadas en el TEA afectan genes asociados a la estructura y función sináptica, por lo que a algunos trastornos de espectro autista se les ha denominado sinaptopatías (Bagni & Zukin 2019).

Un ejemplo de sinaptopatía es el síndrome Phelan-McDermid (PMS, por sus siglas en inglés), un trastorno que por su sintomatología es considerado dentro del espectro autista. Se caracteriza por hipotonía muscular neonatal, retraso o ausencia del desarrollo del habla y discapacidad intelectual de grado variable (Peça et al 2011, Wilson et al 2003).

Este síndrome es causado por una deleción en el brazo q del cromosoma 22, provocando la 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 del gen *Shank3*.

Shank3 codifica para la proteína del mismo nombre (SHANK3), un miembro de la familia SHANK (SHANK1, SHANK2, SHANK3), es una proteína de anclaje de la densidad postsináptica de 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 α -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 y con las proteínas SAPAP1 (por sus siglas en inglés: SAP90/PSD95- associated protein 1”), que a su vez interactúan con los receptores NMDA. En la región rica en prolina, se une la contractina y la proteína Homer, la cual interactúa con los receptores mGlu. Finalmente se encuentra el dominio SAM, el cual es requerido para la localización de SHANK3 a la densidad postsináptica (Monteiro & Feng 2017, Tu et al 1999) (Fig. 1).

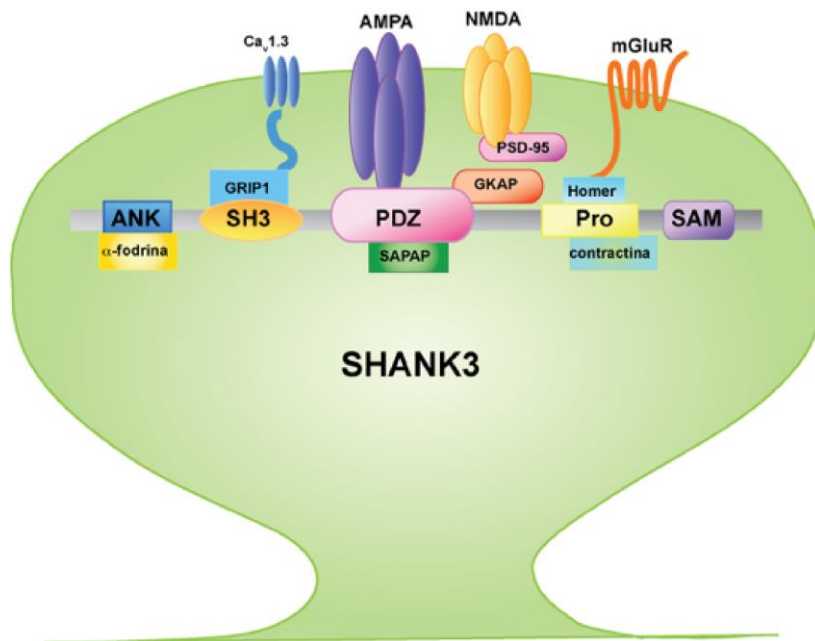


Figura 1. Proteína SHANK3. El esquema ilustra a la proteína SHANK3 (gris) con sus respectivos dominios de unión a proteínas, repeticiones de anquirina (ANK), SH3, PDZ, región rica en Prolina (Pro) y SAM, y su expresión en la postsinapsis. Además muestra los sitios de unión a proteínas para los receptores glutamatérgicos y el canal de calcio Cav 1.3. Modificado de Jiang y Ehlers, 2013.

SHANK3 se expresa en grandes cantidades en corazón, y de forma moderada en cerebro y bazo. En el cerebro se encuentra altamente expresada en sinapsis corticoestriatales, tálamo, hipocampo y cerebelo (Lim et al 1999, Wang et al 2014). Existen cinco isoformas de esta proteína que se expresan de forma diferencial en función del estadio de desarrollo, tipos celulares o regiones cerebrales. Además, varían en la composición de los dominios de unión a proteínas que las componen, SHANK3A, SHANK3C y SHANK3E contienen los dominios PRO y SAM, mientras que SHANK3B carece de los dominios PRO y SAM (Bozdagi et al 2010, Carbonetto 2014, Jiang & Ehlers 2013, Monteiro & Feng 2017).

1.3 Modelo genético de autismo PMS (ratones Shank3)

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

A la fecha se han creado ratones con diversas mutaciones en el gen *Shank3* localizado en el cromosoma 15E3 (Monteiro & Feng 2017). Estas mutaciones incluyen deleciones en el dominio ANK, PDZ o SH3. Cada uno presenta fenotipos específicos o alteraciones celulares particulares, que son válidos para el estudio del TEA, pues en humanos se han reportado gran diversidad de deleciones de *Shank3* que provocan un mosaico de variabilidad de las condiciones neurológicas. Sin embargo, uno de los modelos donde la mutación en *Shank3* es similar a la condición humana, es el ratón heterocigoto de *Shank3*, similar a lo que ocurre en los humanos donde la mutación se presenta en una condición haploide. Este modelo es un ratón genéticamente modificado en el que, por medio del sistema de Cre recombinasa, se eliminaron los exones del 4 al 9, que fueron flanqueados por sitios loxP (Fig. 2). Esta porción eliminada en un sólo alelo corresponde al dominio repetido de anquirina (ANK) del gen *Shank3*. 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 (Bozdagi et al 2010).

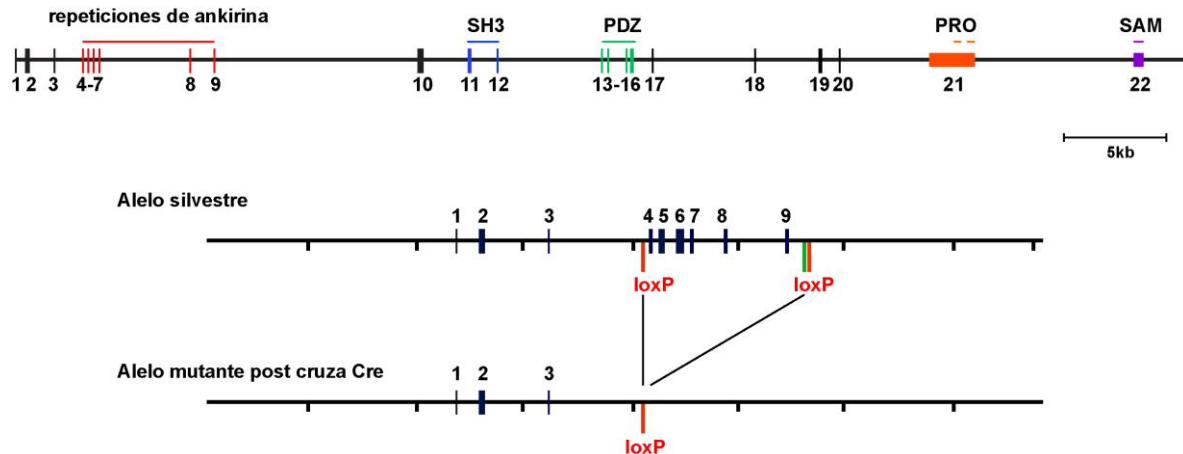


Figura 2. Modelo genético de autismo con haploinsuficiencia de *Shank3*. Estructura genómica de *Shank3*, los números representan los exones. Abajo: Localización de los sitios loxP flanqueando los exones 4-9 para la delección de dominio de repeticiones de Ankirina en un alelo silvestre. Posterior se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

Los ratones heterocigotos para *Shank3* son un modelo genético de TEA, fenotípicamente presentan deficiencias en la interacción social, incremento en conductas repetitivas (acicalamiento), vocalizaciones ultrasónicas reducidas (Bozdagi et al 2010, Jaramillo et al 2016, Yang et al 2012) e hiposensibilidad al dolor (Han et al 2016). A nivel neurofisiológico presentan una disminución en la transmisión glutamatérgica, reducción en el cociente NMDA/AMPA de sinapsis excitatorias, así como una potenciación sináptica reducida (Bozdagi et al 2010, Yang et al 2012).

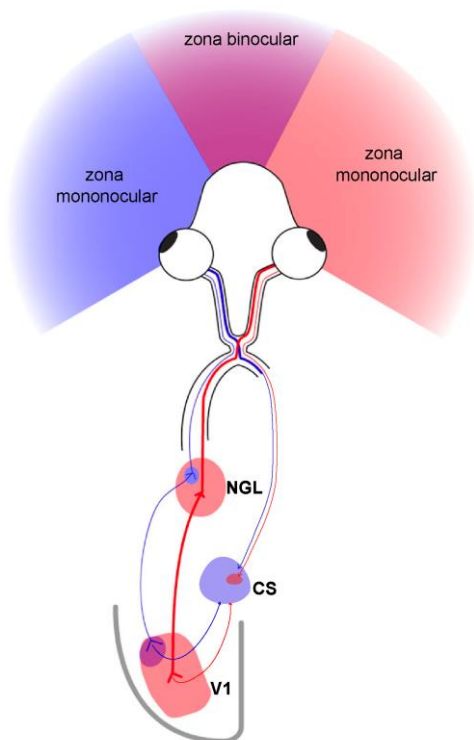
1.4 Alteraciones en el procesamiento neuronal de la información visual en el autismo

El autismo ha sido descrito como un trastorno general del procesamiento neuronal (Belmonte et al 2004). Al respecto, se ha reportado que en pacientes con TEA existen alteraciones en la actividad neuronal, y en la sincronización inter-hemisférica en diferentes regiones corticales, lo cual no ocurre en pacientes control (Dinstein et al 2012, Dinstein et al 2011). Además, en individuos autistas se ha reportado un incremento de la actividad neuronal en regiones cerebrales relacionadas con la integración visual en comparación con individuos no autistas (Lee et al 2007, Samson et al 2012a). Recientemente se reportó que presentan una atención visual atípica a través de múltiples niveles y categorías de objetos, presentando 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 (Wang et al 2015).

Un estudio de meta análisis de ALE (por su siglas en inglés: Activation Likelihood Estimation) mostró que las publicaciones de 1995 a 2009 reportaban un incremento de la actividad neuronal en regiones cerebrales relacionadas con la integración visual (Samson et al 2012b). Estos reportes sugieren que en el TEA existe alteraciones de la actividad neuronal, siendo la percepción visual una de las más estudiadas. Sin embargo, se desconocen las causas que conllevan a estas alteraciones que a su vez influyen en las afecciones neurológicas de las personas con autismo.

1.5 Actividad neuronal de la corteza visual primaria de ratones asociada a aprendizaje

A pesar de las diferencias en la complejidad biológica entre 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, ofrece la posibilidad de realizar manipulaciones genéticas para estudiar fenómenos particulares. En los ratones los estímulos visuales llegan a retina y éstos son transformados en señales eléctricas por los foto-receptores, y a través de un procesamiento intra-retinal la información es enviada al cerebro por las células ganglionares de la retina. Estas mandan sus proyecciones al colículo superior (CS), y al núcleo geniculado lateral del tálamo (NGL). Las neuronas del NGL proyectan a la corteza primaria visual (Fig. 3) (Priebe & McGee 2014, Wilks et al 2013) específicamente a la capa 4 de corteza visual, y éstas neuronas a su vez proyectan a capas 2/3 y éstas a capa 5, donde la información es relevada hacia núcleos de procesamiento superior como la corteza retrosplenial, la corteza motora, el hipocampo,



el área tegmental ventral, entre otras (Makino & Komiyama 2015, Pakan et al 2018, Sun et al 2016).

Figura 3. Sistema visual de ratón. Esquema del sistema visual del ratón, donde se muestran las zonas de visión binocular y monocular. Donde las células ganglionares de retina mandan sus proyecciones al núcleo geniculado lateral (NGL), o al colículo superior (CS). El NGL envía sus proyecciones a corteza primaria visual. Modificado de Priebe and McGee, 2014.

Es importante mencionar que el modelo murino resulta conveniente ya que es amplio el conocimiento que se tiene sobre la fisiología neuronal de la corteza visual primaria (V1). Al respecto, se sabe que las neuronas de las capas 2/3 de V1 de ratones responden a propiedades particulares de los estímulos visuales, tales como contraste, la dirección del movimiento y la orientación (Atallah et al 2012, Chen et al 2013, Glickfeld et al 2013, Sun et al 2016). Así mismo, diversos estudios sostienen que procesos de aprendizaje conllevan a cambios dinámicos en la actividad neuronal de los distintos tipos celulares de la corteza visual y que éstos contribuyen a la formación de modelos internos para predecir y codificar eficientemente la información proveniente del ambiente. Además, se considera que la dinámica en la actividad neuronal de V1 es necesaria para el aprendizaje de tareas visuales (Bastos et al 2012, Makino & Komiyama 2015, Poort et al 2015).

Por ejemplo, se ha propuesto un cambio en la actividad neuronal en respuesta a un aumento en las entradas sinápticas provenientes de la vía *top-down* y una disminución en la fuerza sináptica de la vía *bottom-up* asociadas al aprendizaje visual (Makino & Komiyama 2015). Por otro lado, se ha reportado que la interconectividad de V1 con otras cortezas, como la motora primaria (M1), pueden modular su actividad después de un aprendizaje que involucre a ambas regiones (Pakan et al 2018).

1.6 Imagenología de calcio con microscopía de excitación de dos fotones

Con la finalidad de evaluar la respuesta de sistema nervioso ante estímulos sensoriales o el aprendizaje, se ha vuelto esencial registrar la actividad neuronal simultáneamente con la conducta. Esto se logra gracias a la imagenología de calcio con microscopía de excitación de dos fotones en ratones despiertos. Esta técnica consiste en visualizar los cambios intracelulares de la concentración calcio proveniente de la actividad neuronal mediante indicadores fluorescentes de calcio genéticamente codificados (GECIs, por sus siglas en inglés *Genetically Encoded Calcium Indicators*), siendo el GCaMP uno de los más usados en la actualidad. 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). En ausencia o bajas concentraciones de calcio intracelular, CaM y M13 se encuentran separadas entre sí, y cpGFP emite bajos niveles de fluorescencia. Cuando aumenta la concentración de calcio intracelular en respuesta a potenciales de acción, éste se une a CaM, promoviendo la unión entre ella y M13; esta unión promueve un cambio conformacional en cpGFP ocasionando un aumento en la fluorescencia que emite cuando es excitada con longitudes de onda de 450 a 490nm (Broussard et al 2014) o de 900 a 940 nm cuando se utiliza microscopía de excitación de dos fotones (Figura 4)(Chen et al 2013). La secuencia genética de este indicador se puede introducir al genoma de las células a través de transfecciones con plásmidos o vectores virales, lo que permite la expresión de estas proteínas en las células de interés.

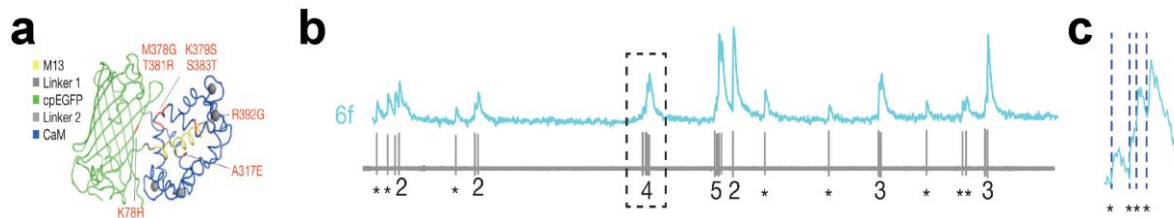


Figura 4. Indicadores de calcio genéticamente codificados (GECI) para el estudio de la actividad neuronal. **a)** Esquema del indicador de calcio GCaMP6f, el cual se expresó en neuronas de V1 de ratones mediante infecciones con vectores virales. Se indican las regiones y dominios específicos para GCaMP6f. T381R, S383T R92G y A317E son dominios de unión al ión calcio. **b)** Correlación de los cambios en la fluorescencia (denominados transitorios de calcio, línea color azul) y el registro electrofisiológico (línea color gris) en una neurona (ilustrada en el recuadro superior izquierdo) que expresa GCaMP6f. **c)** Ampliación del recuadro indicado en b, donde se muestra la sensibilidad en los cambios de fluorescencia de GCaMP6f a partir de un potencial de acción. Modificado de Chen et al., 2013.

1.7 Antecedentes de la actividad neuronal en modelos murinos de patologías del neurodesarrollo

Debido a que las alteraciones en la percepción sensorial son uno de los síntomas centrales del TEA, se han realizado estudios para evaluar el procesamiento sensorial en modelos murinos del síndrome del X frágil ($Fmr1^{-/-}$), la forma más común de retraso mental heredada en humanos. En uno de estos estudios, se evaluó el índice de selectividad a la orientación (OSI, por sus siglas en inglés: Orientation Selectivity Index) de las neuronas piramidales de V1, y el desempeño de éstos ratones en una tarea de discriminación visual de tipo Go - No go. Al respecto, observaron una disminución en la selectividad de las neuronas, es decir que una sola neurona responde a varias orientaciones de los estímulos visuales. Además, encontraron que dicha disminución en la selectividad corresponde con una disminución en el desempeño de los ratones en la tarea de discriminación visual (Goel et al 2018). En otro estudio, con el mismo modelo, analizaron las oscilaciones corticales de V1 asociadas a la experiencia, así como la interconectividad de esta región cerebral.

Encontraron diferencias en las oscilaciones, tales como decrementos en las magnitudes oscilatorias y perfiles temporales alterados, así como disminuciones en la interconectividad de las capas de V1 (Kissinger et al 2020).

Además de estos estudios, recientemente se analizó respuesta sensorial en un ratón *knockout* para *Shank3*, se analizó la actividad neuronal en la corteza somatosensorial en respuesta a la estimulación de vibrisas. Se encontró que existe una hiperexcitabilidad en las neuronas piramidales y una disminución en la actividad de las interneuronas GABAérgicas. Estos resultados sugieren que la hiperreactividad sensorial reportada en el TEA puede ser producto de un desbalance en la inhibición neuronal (Chen et al 2020).

Respecto a la actividad neuronal en V1, en nuestro laboratorio hemos analizado la actividad de esta región en ratones haploinsuficientes de *Shank3*. Mediante imagenología de calcio *in vivo* con microscopia de excitación de dos fotones, observamos diferencias en la actividad neuronal de las capas 2/3 de V1 en ratones SHANK3 en comparación de los ratones silvestres. De forma breve, encontramos en ratones Shank3 una mayor proporción de neuronas con actividad modulada por los estímulos visuales, de forma particular encontramos que las neuronas de éstos ratones presentan un mayor índice de selectividad a la orientación (Fig. 5). Estos datos demuestran que la haploinsuficiencia de *Shank3* altera la sintonización a la orientación en neuronas de corteza visual primaria (CA. 2017).

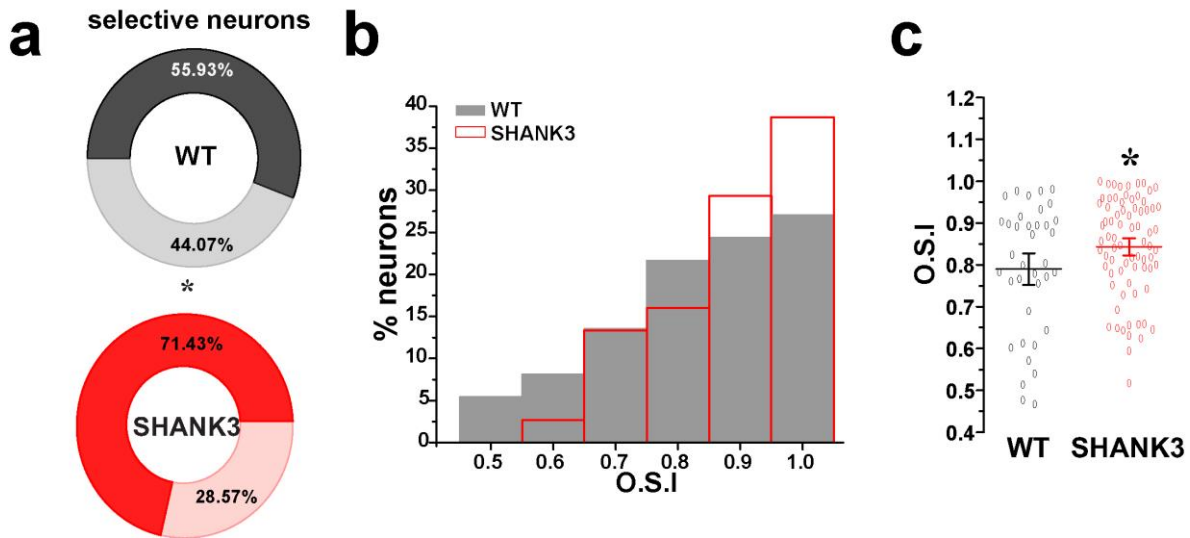


Figura 5. Incremento en la sintonización a la orientación en neuronas de V1 de ratones Shank3. a) Proporción de neuronas selectivas en ratones silvestres y *Shank3*. **b)** Histograma del índice de selectividad a la orientación (O.S.I) en ratones silvestres y *Shank3*. **c)** Cuantificación de la selectividad a la orientación.

2. Planteamiento del Problema

Datos obtenidos de nuestro laboratorio muestran, por primera vez, que en ratones haploinsuficientes de *Shank3* (*Shank3*) existe diferencias en la actividad neuronal de corteza visual primaria en comparación con ratones silvestres. Hemos observado que existe una mayor proporción de neuronas con actividad modulada por la estimulación visual en los ratones *Shank3*. Así mismo, existen un mayor número de neuronas selectivas en ratones *Shank3* y además, éstas presentan una mayor selectividad a la orientación de los estímulos visuales en comparación a los ratones silvestres. Esto sugiere que en los ratones *Shank3* existe una alteración a nivel de procesamiento neuronal en la corteza visual, que es la responsable de codificar la selectividad a la orientación

Por otro lado, se ha propuesto que procesos de aprendizaje conllevan a cambios dinámicos en la actividad neuronal de los distintos tipos celulares de la corteza visual que contribuyen a la formación de modelos internos para predecir y codificar eficientemente la información proveniente del ambiente, y que esta dinámica en la actividad neuronal de V1 es necesaria para el aprendizaje de tareas visuales (Bastos et al 2012, Makino & Komiyama 2015, Poort et al 2015).

Por lo tanto, de los estudios realizados en el laboratorio con ratones *Shank3*, que muestran alteraciones en el procesamiento de la información visual en corteza visual primaria, así como en los antecedentes que involucran a la actividad de V1 en el aprendizaje, nos planteamos evaluar *si la haploinsuficiencia de Shank3 altera la actividad de las neuronas que responden a una tarea de discriminación visual de tipo Go-No go y consecuentemente el aprendizaje.*

3. Hipótesis

La haploinsuficiencia de *Shank3* altera la actividad neuronal de corteza visual primaria (capas 2/3), que en consecuencia pueden modificar el desempeño en la ejecución de una tarea de discriminación visual.

4. Objetivo general

Analizar *in vivo* la actividad neuronal de la capa 2/3 de la corteza visual primaria en ratones Shank3^{+/-} y silvestres (Shank3^{+/+}) asociada a la realización de una tarea de discriminación visual.

4.1 Objetivos particulares

1. Entrenar ratones heterocigotos (Shank3^{+/-}) y silvestres (Shank3^{+/+}) a aprender una tarea de discriminación visual de tipo *Go-No go*.
2. Evaluar el desempeño de ratones Shank3^{+/-} y Shank3^{+/+} en la realización de la tarea de discriminación visual.
3. Realizar imagenología de calcio con microscopía de excitación de dos fotones *in vivo* de las capas 2/3 de la corteza visual, mientras realizan la tarea de discriminación visual. En las diferentes etapas de aprendizaje de la tarea.
4. Analizar la actividad neuronal (derivada de señales de calcio provenientes de GCaMP6f) con algoritmos de Matlab de las neuronas de la corteza visual en función del comportamiento.

5. Métodos

5.1 Animales

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

Se utilizaron ratones macho de la cepa B6(Cg)-*Shank3tm1.2Bux/J* (Jackson Laboratory, Lote no. 017890) de 8 a 16 semanas de edad. Los grupos experimentales se formaron con ratones heterocigotos (*Shank3^{+/-}*) (fenotipo tipo autista) y silvestres (*Shank3^{+/+}*) de la misma cepa. Todos los experimentos se realizaron a doble ciego, lo que implica que el experimentador desconocía el genotipo de los animales hasta que se concluye el análisis de los datos obtenidos.

5.2 Cirugías estereotáxicas

Las cirugías se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Holtmaat (Holtmaat et al 2009) para la elaboración de ventanas craneales. Se realizaron en un cuarto de bioseguridad nivel 2, y se utilizó equipo de protección personal (guantes de nitrilo, cofia, cubrebocas y bata quirúrgica desechable), todo esto en un ambiente aséptico. Los animales se anestesiaron en una cámara de isofluorano, a un nivel de saturación de 4% para iniciar la cirugía. Una vez anestesiados (frecuencia respiratoria = 1/seg), se posicionaron en el estereotáxico que está conectado a un sistema de anestesia (isofluorano 1.5%), sobre un colchón térmico para mantener la temperatura del animal durante el procedimiento quirúrgico. Los ojos de los ratones se protegieron de la deshidratación e irritación aplicando un ungüento ocular de uso veterinario.

Posteriormente se expuso el cráneo del animal en cirugía y se alineó en el estereotáxico para ubicar la región de V1 en el hemisferio izquierdo con las siguientes coordenadas: 2.5 mm lateral y 0.5 mm anteroposterior respecto a lambda. Se procedió a la realización de la ventana craneal de aproximadamente 2.5 mm de diámetro con un

taladro dental de $\frac{1}{4}$ "', evitando dañar la dura. Una vez que se accedió al tejido cerebral se mantuvo hidratado con una solución de iones denominada buffer de corteza estéril (NaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 2 mM, pH 7.4). Para evitar el sangrado excesivo durante la craneotomía se utilizaron esponjas hemostáticas humedecidas con el buffer de corteza. Posteriormente se realizó la inyección del virus adenoasociado AAV1-Syn-GCaMP6f-WPRE-SV40 (Penn Vector Core), en el área donde se realizó la craneotomía (2.5 mm lateral y 0.5mm antero-posterior respecto a lambda), a una profundidad de 250 μ m, área que corresponde a las capas 2/3 de la corteza visual primaria de los ratones. En cada animal se realizaron tres inyecciones de 50 nl cada una, en diferentes sitios, utilizando un micro-inyector Nanoject 2.0 (Drummond Scientific) y pipetas de borosilicato de 0.5 μ m, con una punta biselada a 45° aproximadamente. Después de cada inyección se dejó difundir el virus durante aproximadamente 15 minutos para cada inyección.

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

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

cráneo. Se dejó secar por completo el adhesivo y se cubrió el cráneo y la piel expuesta con acrílico dental (Orthojet).

Durante la cirugía se administraron fármacos para reducir la inflamación y el dolor, así como para evitar infecciones y deshidratación. Se aplicaron dexametasona (2 mg/g-1 peso) vía intramuscular, solución de Ringer lactato 19 (0.015ml/g-1 peso) vía subcutánea, sulfametoxazol (1 mg/ml) y trimetoprima (0.2 mg/ml) vía subcutánea. Al finalizar la cirugía, se retiró al animal del estereotáxico y su recuperación fue monitoreada durante 60 minutos posteriores a la cirugía. Si la recuperación resultó favorable, se mantuvo en el área de recuperación por 48 horas, posterior a este período se traslada al vivario donde permaneció para fines experimentales.

5.3 Protocolos conductuales

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

procurando mantener el peso de los animales al 85% de su peso al iniciar el programa privación de agua.

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

Se diseñó una tarea de discriminación visual de tipo *Go-No go*, mediante el desarrollo de algoritmos en la suite de desarrollo de Matlab y la librería de funciones Psychophysics Toolbox. Mediante los algoritmos se generarán estímulos visuales que consistirán en barras negras y blancas con dos orientaciones diferentes (90° y 0°) y que presentan movimiento (Fig. 6). La estructura de la tarea está basada en protocolos descritos previamente (Berditchevskaia et al 2016).

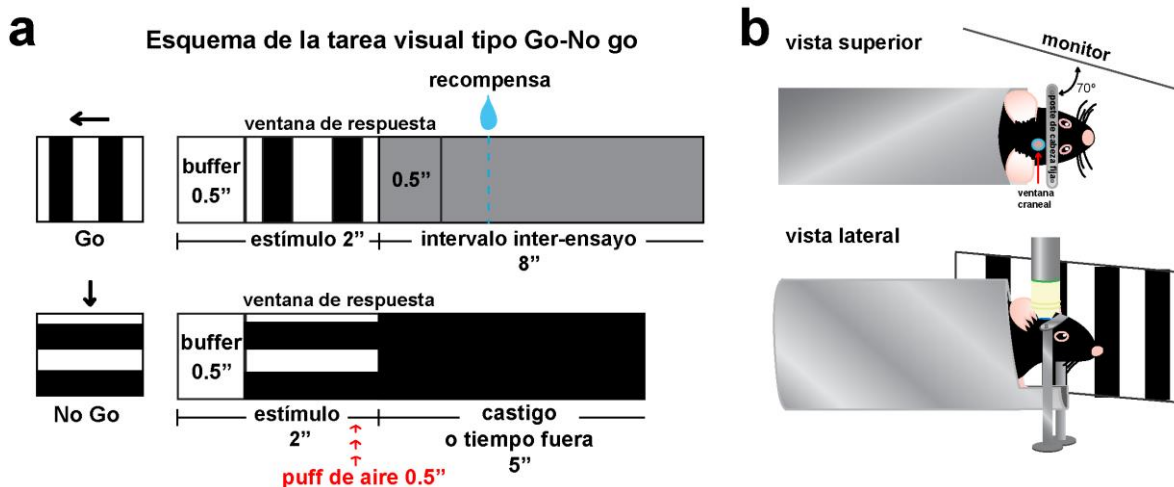


Figura 6. Esquema de la tarea de discriminación visual de tipo Go – No go. a) Se muestra el flujo temporal de la tarea de discriminación visual y los componentes durante la presentación de un estímulo *Go* (panel superior) y de un estímulo *No go* (panel inferior). En el caso del estímulo *go*, si hay respuesta por parte del ratón en la “ventana de respuesta”, se entrega una recompensa, mientras que, si hay respuesta en el estímulo *no go*, se dará un castigo, que consiste en un soplido de aire a presión y un tiempo fuera, que consiste en la presentación de una pantalla color negro. Los estímulos *Go* y *No go* son ortogonales entre ellos, es decir, su orientación está separada por 90°. b) Esquema de la estación de trabajo en modo de cabeza fija. Donde se observa en la vista superior que el monitor es colocado en el ojo contralateral a la ventana craneal en un ángulo de aproximadamente 70° y ~25 cm de distancia, a través del cual se proyectan los estímulos visuales.

El paradigma conductual de la tarea está dividido en las siguientes fases:

1. Fase de pre-entrenamiento (asociación estímulo-recompensa): Se presentó el estímulo *Go*, el estímulo a 90° o 225°, durante dos segundos, para posteriormente entregar una recompensa de forma automática, una vez que el estímulo haya terminado de presentarse. Esta fase consistió en una sola sesión

2. Fase de entrenamiento guiado: Se presentaron de forma semi-aleatoria los estímulos *Go* y *No go*, mediante un algoritmo que previene que el mismo tipo de estímulo se presente más de tres veces. El estímulo *Go* se presenta durante dos segundos e

inmediatamente después de finalizada la presentación del estímulo se liberará una recompensa. Cuando se presente el estímulo *No go*, no se liberará recompensa y durante esta fase, sí hay respuesta durante la presentación de este estímulo, no se aplica castigo. Esta fase se realiza por tres sesiones consecutivas.

Tarea de tipo *Go-No go*: Durante esta fase se presentaron de forma semi-aleatoria dos estímulos visuales, usando un algoritmo que evite que se presente el mismo estímulo más de tres veces consecutivas. En esta fase, los estímulos se presentaron durante dos segundos, de los cuales los primeros 500 ms corresponden al período *buffer* y una ventana temporal de respuesta de 1.5 s. Para que se considere un acierto o *hit*, el ratón deberá dar lengüetazos durante la presentación del estímulo *Go* y mantenerlos por al menos 500 ms después, y se entrega una recompensa 1s después de finalizar la presentación del estímulo visual. Si el ratón responde durante la presentación del estímulo *No go* (ángulo 0°), se considera como una Falsa alarma (FA) y se castiga al ratón con un pulso de aire comprimido dirigido a su rostro, inmediatamente se da un tiempo de castigo, en el que se presenta una pantalla negra durante 5 seg, en los que también se da pulsos de aire comprimido en caso de que haya lengüetazos por parte del animal.

Los estímulos visuales fueron presentados en un monitor LCD de 17" con resolución de 2.048 x 1.536 píxeles a 264 píxeles por pulgada, colocado a una distancia de aproximadamente 25 cm del centro del ojo derecho de los ratones (contralateral a la ventana craneal), y en una orientación aproximada de 70° respecto a la punta su nariz, con el fin de abarcar la mayor parte del campo visual monocular de los ratones.

5.4 Imagenología de calcio *in vivo* a través de microscopia de excitación de dos fotones.

Para la adquisición de imágenes de calcio *in vivo* en animales despiertos se utilizó un microscopio de excitación de dos fotones Zeiss LSM 710, objetivo 20x Plan Apochromat de inmersión de agua, 1.0 AN, 2.4 mm distancia trabajo, láser infrarrojo pulsado Chameleon Ultra II (Coherent). El GCaMP6f se excitó a una longitud de onda de 900 nm, y se realizó imagen a una profundidad de 250 micras (+/- 50micras) (Fig. 7).

La tasa de adquisición de imágenes fue de 5 Hz (200ms/cuadro). La estación de trabajo para el modo de cabeza fija fue colocada debajo del objetivo del microscopio, una vez fijado el ratón se colocó como interface una gota de agua entre el objetivo y el cubreobjetos de la ventana craneal. El objetivo fue cubierto con una película negra para evitar la contaminación de luz y la exposición de los fotomultiplicadores.

Para registrar la actividad conductual de los ratones durante la realización de la tarea, se construyeron circuitos electrónicos que se conectaron a microprocesadores (tarjetas Arduino UNO) y se desarrollaron algoritmos para registrar los eventos ocurridos durante la tarea en una resolución temporal de milisegundos. Se registraron los tiempos de estimulación, de liberación de recompensa, castigos y lengüetazos.

El inicio y el final de la adquisición de imágenes se controló usando una interfaz de Matlab y una tarjeta Arduino UNO, por medio de una serie de circuitos eléctricos conectados a un controlador electrónico del microscopio, el cual regresa una señal cada vez que se inicia la adquisición de un cuadro. Este circuito es el mismo que se utiliza para registrar los tiempos de cada evento de la tarea, y en las sesiones de microscopia, también se registraron los tiempos de inicio de cada cuadro.

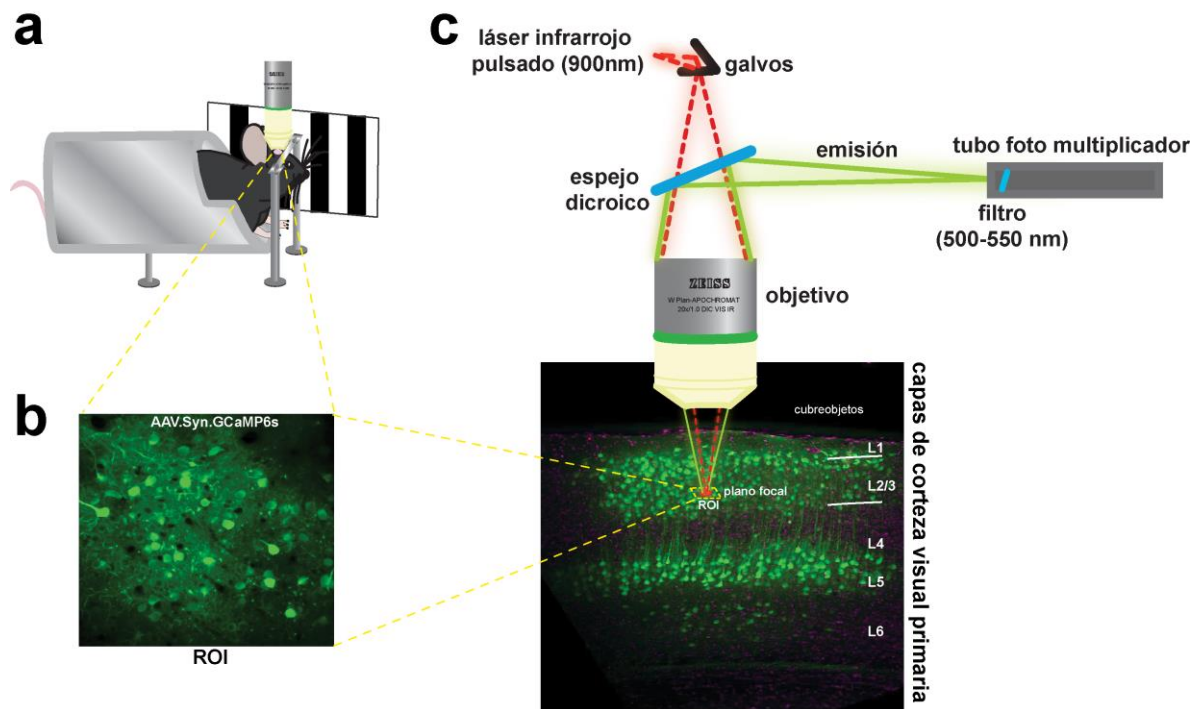


Figura. 7. Imagenología de calcio in vivo a través de microscopia de excitación de dos fotones. a) Esquema de la estación de trabajo en donde se coloca al ratón en modo de cabeza fija en el microscopio de excitación de dos fotones. **b)** Vista superior de cómo se observan las neuronas positivas a GCaMP6f a través de la ventana craneal, representa la región de interés (ROI). **c)** Componentes del microscopio de excitación de dos fotones basado en un sistema de escaneo por galvanómetros, usando un laser infrarrojo pulsado a 900nm para excitar GCaMP6f en las capas 2/3 de corteza visual.

5.5 Obtención y análisis de datos

El análisis de la conducta se realizó considerando los siguientes parámetros (Berditchevskaia et al 2016): la tasa de aciertos, la tasa de falsas alarmas e índice de discriminación. Para obtener estos parámetros se emplearon las siguientes ecuaciones

$$Hit = \frac{\text{total de aciertos}}{nGo}$$

Donde Hit es la tasa de aciertos y nGo es el número de ensayos *Go* que se presentaron en la sesión.

$$FA = \frac{\text{total falsas alarmas}}{nNoGo}$$

Donde FA es la tasa de falsas alarmas y $nNoGo$ es el total de estímulos *No Go* que se presentaron en la sesión

$$d' = z(Hit) - z(FA)$$

Donde d' es el índice de discriminación y $z(Hit)$ y $z(FA)$ son la distribución inversa normal cumulativa de la tasa de aciertos y de falsas alarmas, respectivamente.

Los valores de d' se analizaron de forma estadística mediante pruebas de ANOVA de una vía para discernir si existían diferencias estadísticamente significativas entre los ratones silvestres y los Shank3.

Así mismo, las distribuciones de frecuencias de aciertos y de falsas alarmas a lo largo de las sesiones de entrenamiento, se compararon con análisis de área bajo la curva

ROC (por sus siglas en inglés, *Receiver Operating Characteristic*), para determinar si existen diferencias entre ambas frecuencias.

5.6 Análisis de imagenología de calcio

Para el análisis de la actividad neuronal proveniente de la imagenología de calcio se realizó en primer lugar una corrección del movimiento mediante la extensión *Turboreg* del software de edición de imágenes *Fiji* y posteriormente los videos fueron analizados mediante el software de Matlab, haciendo uso de la biblioteca de códigos *CalMAn* (Calcium Imaging Analysis) (Giovannucci et al 2018). Este código analiza los componentes espaciotemporales del video, es decir, identifica la posición de las neuronas y la dinámica de sus cambios en la fluorescencia, así como la filtración de la señal, así como con códigos previamente desarrollados en el laboratorio. En este punto, todas las unidades de fluorescencia se normalizaron a la unidad $\Delta F/F_0$ con valores mínimos de cero (ya que sólo nos interesaron los cambios positivos de fluorescencia, que están asociados con potenciales de acción). En este proyecto, los análisis de la actividad neuronal se dividieron en tres categorías: número y proporción de neuronas con actividad modulada, intensidad de la actividad neuronal y dinámica temporal de la actividad.

Para el análisis de la actividad neuronal asociada con la tarea visual, se crearon rutinas en Matlab. Para conocer si la actividad de una neurona esta modulada por algún componente de la tarea (estímulos Go o No-go), se utilizaron criterios de análisis previamente establecidos: se analizaron y compararon los valores de $\Delta F/F_0$ durante un período basal (de dos segundos previos al inicio del estímulo visual) y durante la

presentación de los estímulos; si el promedio de los valores durante la presentación de estímulos fue mayor por tres desviaciones estándar de la fluorescencia basal, se considera ese como un ensayo positivo. Para considerar una neurona con actividad modulada, al menos el 20% de los ensayos debe ser positivo según dicho criterio (Makino & Komiyama 2015).

Para hacer un análisis de la intensidad de la actividad neuronal, se utilizaron análisis de AUROC y Bootstrap, en el que se analizaron los valores de $\Delta F/F_0$ durante un período basal, y durante la presentación de los estímulos visuales, basándonos en protocolos previamente descritos ((Makino & Komiyama 2015, Sun et al 2016).).

Para el análisis de la dinámica temporal se utilizó un método de análisis conocido como *ramp index* que evalúa la temporalidad del aumento de la fluorescencia de las neuronas durante la presentación de los estímulos visuales. De las neuronas moduladas, se obtuvo un promedio de los valores de $\Delta F/F_0$ de la primera y segunda mitad del tiempo en el que los estímulos visuales son presentados. Estos promedios son analizados para obtener un cociente mediante la fórmula (Makino & Komiyama 2015):

$$ramp\ index = \log_2\left(\frac{R2}{R1}\right)$$

Donde:

R2: promedio de $\Delta F/F_0$ durante el último segundo de la presentación del estímulo.

R1: promedio de $\Delta F/F_0$ durante el primer segundo de la presentación del estímulo.

5.7 Estadística

Todas las pruebas estadísticas se realizaron por medio de Software especializado; en conjunto se utilizaron Matlab (algoritmos desarrollados a medida), GraphPad Prism y Origin Pro.

Todos los conjuntos de datos se sometieron a pruebas para determinar si provenían de una distribución normal mediante los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson y Shaphiro-Wilk, utilizando un alfa de 0.05. Para considerar a los conjuntos de datos como normales, al menos dos de las pruebas mencionadas debieron ser significativas ($P \geq 0.05$), de lo contrario, se consideraban que los datos no cumplían el criterio de normalidad (Ghasemi & Zahediasl, 2012).

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los conjuntos de datos, se utilizaron diversos estadísticos de prueba, ya sean paramétricos o no paramétricos, según fuera el caso de las pruebas de normalidad previamente mencionadas. Todas las pruebas se realizaron con un alfa de 0.05. Los estadísticos de prueba utilizados para cada conjunto de datos se mencionan en el apartado correspondiente a los resultados.

La interpretación gráfica de los análisis estadísticos se realizó utilizando los mismos *softwares* ya mencionados y en ellos se indica los datos en donde se encontraron diferencias significativas. Las barras de error indican error estándar, a menos que en la

figura se indique otro parámetro. De igual manera, esto se describe a mayor detalle en el cuerpo del texto en el apartado de resultados y en los pies de figura correspondientes.

6. Resultados

6.1. Los ratones Shank3 muestran un mejor desempeño en la realización de la tarea de discriminación visual

Trabajos previos donde se utilizan modelos murinos de trastornos del neurodesarrollo, muestran una correlación entre las alteraciones en la neurometría de neuronas de V1 con el desempeño de los ratones en tareas de discriminación visual. En datos de nuestro laboratorio hemos encontrado que ratones Shank3 poseen una mayor proporción de neuronas selectivas a la orientación en V1, y que éstas neuronas tienen un mayor índice de selectividad a la orientación (Ortiz Cruz, 2017). Para evaluar el impacto de dicha actividad atípica en la conducta de ratones Shank3, elaboramos una tarea de discriminación visual de tipo *Go/No go* en la que entrenamos a los ratones a responder a una orientación denominada *Go*, asociada a una recompensa (una gota de agua de aproximadamente 4 μ L, y evitar responder a una orientación denominada *No go*, que es ortogonal a la orientación *Go*, es decir, que existe una diferencia de 90 grados entre ambas orientaciones, y que está asociada a un castigo (un soplido de aire a presión) (Fig. 6). Las respuestas de los ratones se registraron a lo largo de toda la realización de la tarea (Fig. 8), a partir de las cuáles se midió y evaluó su rendimiento.

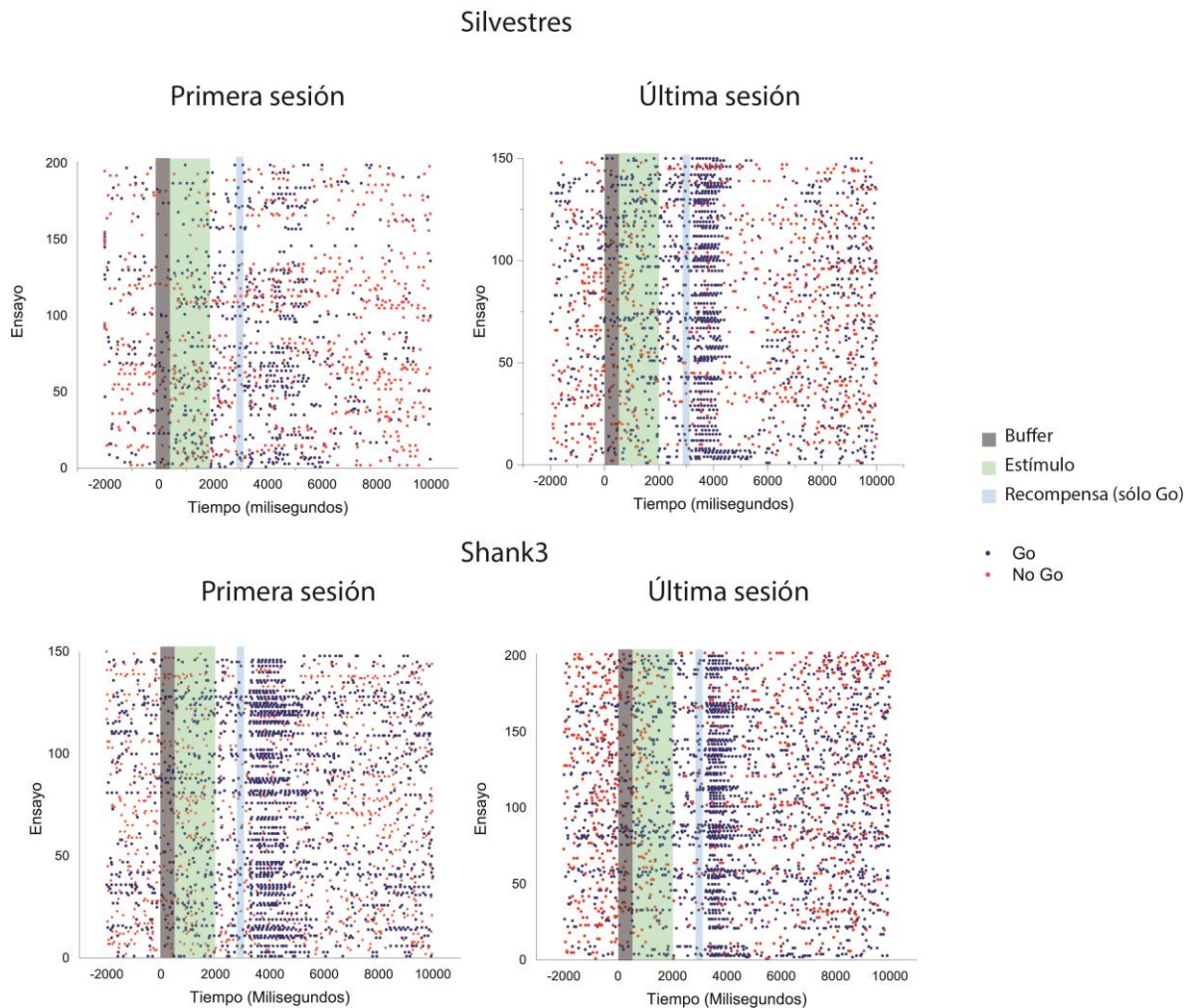


Figura 8. Respuestas de los ratones durante la realización de la tarea de discriminación visual. Gráficas de dispersión de datos representativas de cada grupo, antes y después del aprendizaje de la tarea (primera y última sesión, respectivamente). Cada punto representa un *lick* a lo largo de la tarea, para ensayos *Go* (azul) y *No Go* (rojo). El eje vertical indica cada uno de los ensayos de la sesión y en el eje horizontal se indica la estructura temporal del ensayo. Se presentan 2 segundos antes de la presentación del estímulo y 10 segundos después. En barras de colores se indica el tiempo en que se presentan los diversos componentes de la tarea.

Para el análisis del desempeño de los ratones en la tarea de discriminación visual se evaluaron las tasas de aciertos y de falsas alarmas que cada uno de los ratones obtuvo a lo largo de 25 sesiones de trabajo (cada sesión constó de 200 ensayos repartidos de forma semi-aleatoria entre ensayos *Go* y *No go*), donde la regla que impusimos era que los estímulos no se repitieran más de tres veces seguidas.

Los ratones Shank3 mostraron una separación estadísticamente significativa de las tasas de acierto sobre las tasas de falsas alarmas en un menor número de sesiones, diferencia observada a partir de la sesión 16 (Fig. 8), en comparación de los ratones silvestres, quienes mostraron diferencias significativas a partir de la sesión 21 (Fig. 8).

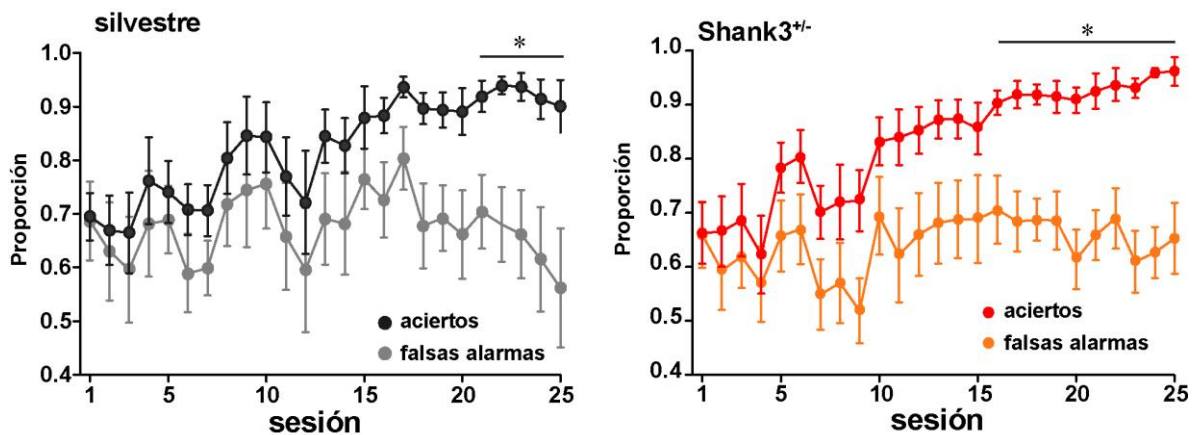


Figura 9. Tasa de aciertos y falsas alarmas en respuesta a la tarea visual de tipo Go-No go. Proporción de aciertos y falsas alarmas para ratones silvestres y ratones Shank3 a lo largo de las 25 sesiones de la tarea de discriminación visual. * $P < 0.05$ prueba de T de Student para dos muestras independientes.

A partir de las tasas de aciertos y falsas alarmas, se realizó un análisis de la capacidad de discriminación de los ratones utilizando la métrica índice de discriminación (d'). Con base en diversos protocolos previamente descritos (Berditchevskaja et al 2016, Goel et al 2018), se considera que una tarea es aprendida cuando los ratones obtienen un valor de d' mayor o igual a 1, lo que indica que los ratones, son capaces de discriminar entre las dos opciones.

Al respecto, encontramos los ratones de ambos genotipos mostraron un aumento en su capacidad de discriminación (entre los estímulos Go y No go) al ser sometidos a los

protocolos de aprendizaje. Específicamente, se encontró que en los ratones Shank3 presentaron una tendencia a un índice mayor de discriminación respecto a los silvestres durante casi todas las sesiones de entrenamiento, siendo significativa en algunas de las sesiones (sesiones 11, 14 y 18) (Fig. 9a).

Cuando comparamos dentro de cada grupo de los valores de d' de las cinco primeras y de las cinco últimas sesiones de entrenamiento, se observó una pendiente positiva y diferencias estadísticamente significativas a nivel de grupo. Consideramos importante mencionar que todos los ratones Shank3 obtuvieron un valor promedio de d' igual o mayor a 1 en las últimas cinco sesiones, mientras que en el grupo de los silvestres uno de los ratones no alcanzó el valor de d' de al menos 1 (Fig.9b).

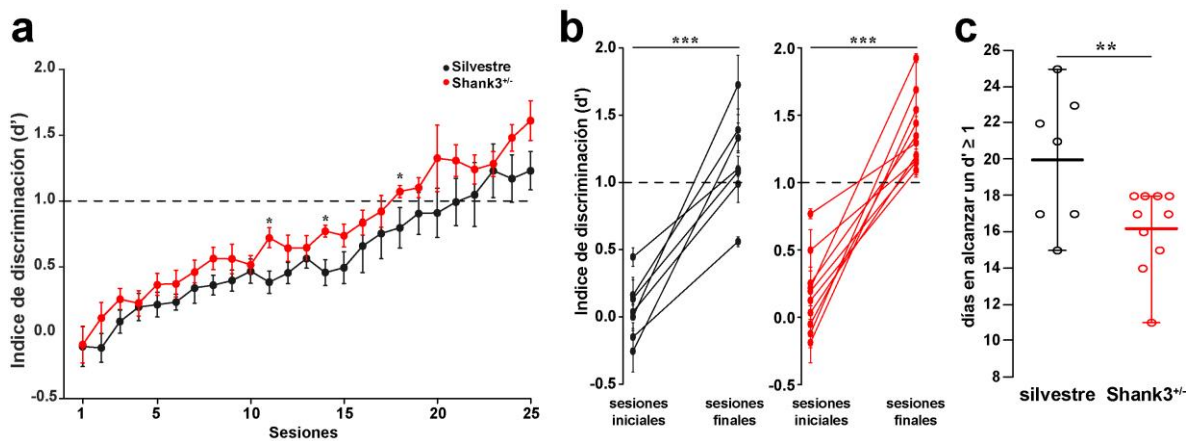


Figura 10. Ratones Shank3 aprenden más rápido la tarea de discriminación visual. a) Curva de aprendizaje de la tarea de discriminación visual de tipo *Go – No go* para ratones silvestres (línea negra) y Shank3 (línea roja). Se graficaron los promedios de cada grupo del índice de discriminación (d') a lo largo de 25 sesiones. * $P < 0.05$ prueba de T de Student para dos muestras independientes. **b)** Comparación del promedio del índice de discriminación entre las primeras cinco y las últimas cinco sesiones de entrenamiento. La línea punteada muestra el $d' = 1$, valor en el cuál se consideró para una correcta discriminación de los estímulos visuales. *** $P < 0.0001$ prueba de T de Student para dos muestras independientes. **c)** Sesiones necesarias para aprender la tarea de discriminación visual para ratones silvestres y Shank3. Cada círculo representa uno cada uno de los ratones que se evaluaron. Se muestra la media grupal (línea horizontal) y el rango de los datos (líneas verticales) ** $P = 0.04$ Prueba de U de Mann-Whitney de una cola.

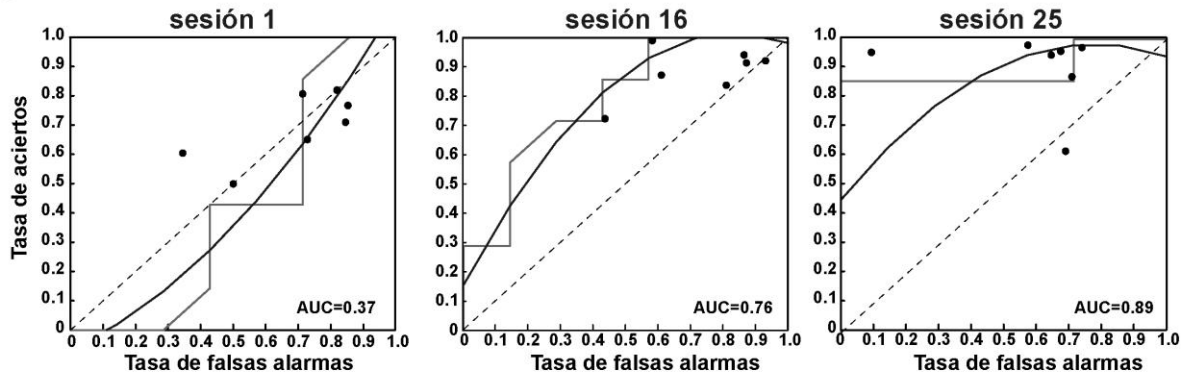
Para saber si existe diferencia en el tiempo en que los ratones aprenden la tarea, se evaluó y comparó el número de sesiones promedio que ambos grupos de ratones requirieron para alcanzar un índice de discriminación de al menos 1. De forma consistente con lo observado en las tasas de aciertos y falsas alarmas, se encontró que el grupo Shank3 alcanzan un valor de d' igual o mayor a 1 después de 16 sesiones de entrenamiento, mientras que los silvestres obtienen valores similares a partir de 21 sesiones (Fig.9c).

Además del índice de discriminación, y con base en protocolos descritos previamente (Berditchevskaia et al 2016), el desempeño de los ratones se midió mediante análisis de curva Característica Operativa del Receptor (curva ROC), donde se evaluó la tasa de aciertos y de falsas alarmas en el espacio de ROC, considerando a los aciertos como “Verdaderos positivos” y a las falsas alarmas como “Falsos positivos”.

Con esta evaluación también encontramos que ambos grupos de ratones lograron aprender a discriminar entre los dos tipos de estímulos. De forma consistente con el parámetro d' , los ratones Shank3 mostraron un área de curva ROC más alta en comparación con los silvestres, siendo sobresaliente el hecho de que para los Shank3 el valor de la curva ROC fue de 1 en la última sesión de entrenamiento (sesión 25), mientras que el de los silvestres fue de 0.89 (Fig. 10). Esto indica que la distribución de frecuencias de las tasas de aciertos y falsas se encuentra totalmente separada en los ratones Shank3, siendo la de los aciertos significativamente mayor y cercana a 1. Esto quiere decir que,

para el final del protocolo conductual, los ratones Shank3 respondían correctamente a casi el 100% de los ensayos Go.

Silvestre



Shank3^{+/-}

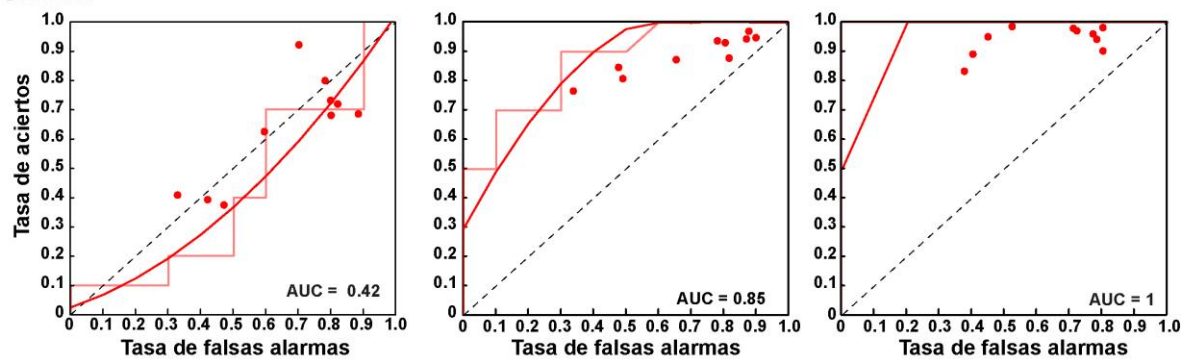


Figura 11. Análisis del desempeño de los ratones en la tarea de discriminación visual por medio del área bajo la curva ROC. Distribución de las tasas de aciertos (verdaderos positivos, eje vertical) y de falsas alarmas (falsos positivos, eje horizontal) en tres sesiones representativas (sesiones 1, 16 y 25) y los valores del área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC). Si los valores de las tasas son similares, el valor de AUC (área bajo la curva) será cercano a 0.5; mientras más separados estén los valores, el valor de AUC será más lejano de 0.5, ya sea hacia 1.0, en caso de un aumento de aciertos o hacia 0, en caso de un aumento de falsas alarmas. Cada punto en la gráfica representa el valor de obtenido por cada ratón, la línea recta es el valor real del AUC y la línea curva es el ajuste no lineal al valor de AUC. La línea punteada indica un AUC = 0.5, dónde no hay diferencia entre las distribuciones de aciertos y falsas alarmas.

Por otro lado, en los ratones silvestres existe un empalme de ambas frecuencias, (de aciertos y de falsas alarmas) después de las mismas 25 sesiones. En este grupo la tasa de aciertos fue alrededor de 0.9, y una tasa máxima de falsas alarmas de 0.73 (sin

diferencias significativas a nivel de medias y medianas en comparación del grupo de Shank3), lo que indica que respondieron a aproximadamente el 90% de los ensayos Go.

En conjunto, estos datos muestran que, a pesar de que el desempeño de ambos grupos en el aprendizaje de la tarea es bueno, pues ambos lograron discriminar entre los dos tipos de estímulos, los ratones Shank3 muestran índices de discriminación más elevados (tanto a nivel de d' , curva ROC, y diferencia entre aciertos y falsas alarmas) y un aprendizaje más rápido, pues necesitan menos sesiones para aprender a discriminar.

6.2 Cambio en las proporciones de neuronas con actividad modulada por los estímulos en respuesta a la tarea Go - No Go

Para evaluar la actividad neuronal de la capa 2/3 de V1 asociada al aprendizaje de la tarea de discriminación visual, se realizó imagenología de calcio *in vivo* utilizando microscopía de excitación de dos fotones. Se registró la actividad neuronal de 3 ratones silvestres y 3 ratones Shank3 en dos tiempos diferentes: en la primera sesión de entrenamiento (considerada como la sesión inicial) y en la sesión 25, cuando los ratones habían obtenido un valor de d' igual o mayor a uno, considerado como el punto de corte para el aprendizaje de la tarea.

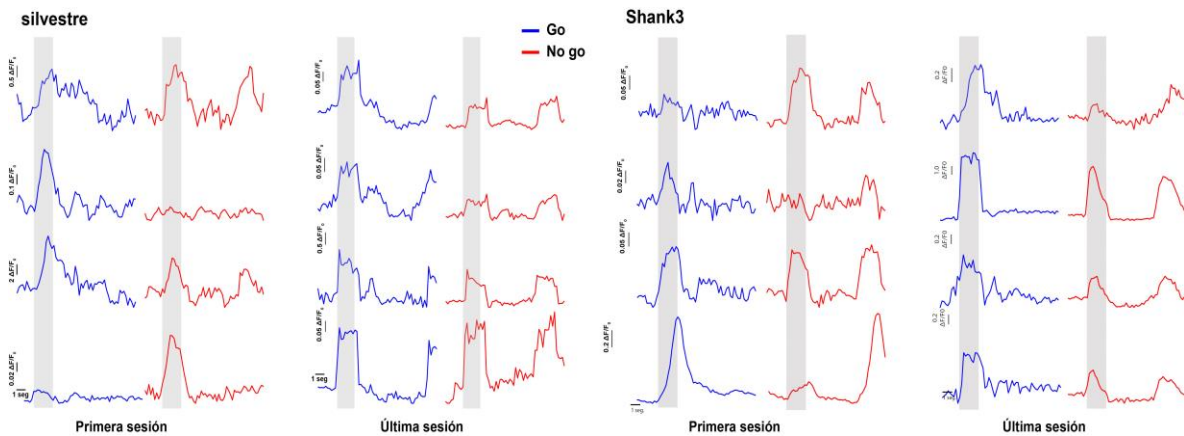


Figura 12. Actividad neuronal de V1 durante la realización de la tarea de discriminación visual. Transitorios de calcio representativos de neuronas de la capa 2/3 de corteza visual primaria de ratones obtenidos mediante microscopía de excitación de dos fotones *in vivo*. Cada par de trazos corresponde a una misma neurona y su respuesta ante el estímulo Go (azul) y No Go (rojo). Los trazos mostrados para la primera y última sesión corresponden a neuronas diferentes, pero al mismo ratón. El sombreado en color gris representa el tiempo en el que el estímulo visual se presentó. El trazo corresponde al promedio de la fluorescencia obtenido durante toda la sesión de imagenología en unidades normalizadas ($\Delta F/F_0$).

Tomando en cuenta que en ratones Shank3 existe una mayor proporción de neuronas moduladas por la estimulación visual y una mayor proporción de neuronas selectivas a la orientación, el primer parámetro que evaluamos fue la proporción de neuronas con actividad modulada por alguno de los componentes de la tarea visual. El criterio para la determinación de neuronas con actividad modulada consiste en comparar la actividad neuronal (medida en unidades normalizadas de fluorescencia $\Delta F/F_0$, “cambio en la fluorescencia respecto a la fluorescencia basal”) durante un periodo basal, que fue de 2 seg. previos al inicio de la presentación de los estímulos visuales con la actividad durante la presentación de los estímulos. Si la actividad durante el período de la presentación del estímulo visual es tres veces más grande que la desviación estándar de la actividad durante el período basal, y esto es consistente en al menos el 20% de los ensayos evaluados, se considera que la neurona evaluada tiene actividad modulada por dicho estímulo (Fig.11a).

A partir de este análisis, se establecieron las siguientes categorías: neuronas con actividad modulada por el estímulo Go “Go”, neuronas con actividad modulada por el estímulo No Go “No Go”, neuronas con actividad modulada por ambos estímulos con preferencia al Go “Pref. Go”, neuronas con actividad modulada por ambos estímulos con preferencia al No Go “Pref. No Go”, y neuronas no moduladas.

Al respecto, se encontró que en el grupo de ratones silvestres sólo la proporción de neuronas que responden al estímulo No go y con preferencia al No go disminuyeron su proporción con el aprendizaje (No go, de 7.96% a 3.80%, Pref. No go, de 24.82% a 10.73%). Al analizar el grupo de ratones Shank3, encontramos cambios en las proporciones de todas las categorías. Interesantemente, en los ratones Shank3 se puede observar que las neuronas que responden al estímulo Go o con preferencia en Go incrementan su proporción (Go de 10.1% a 16.7%, Pref. Go, de 13.8% a 25.3%), mientras que las neuronas que responden al estímulo No go o con preferencia en No go disminuyeron su proporción en respuesta al aprendizaje (No go de 9.20% a 1.16%, Pref. Go, de 25.77% a 12.45%) (Fig. 11b).

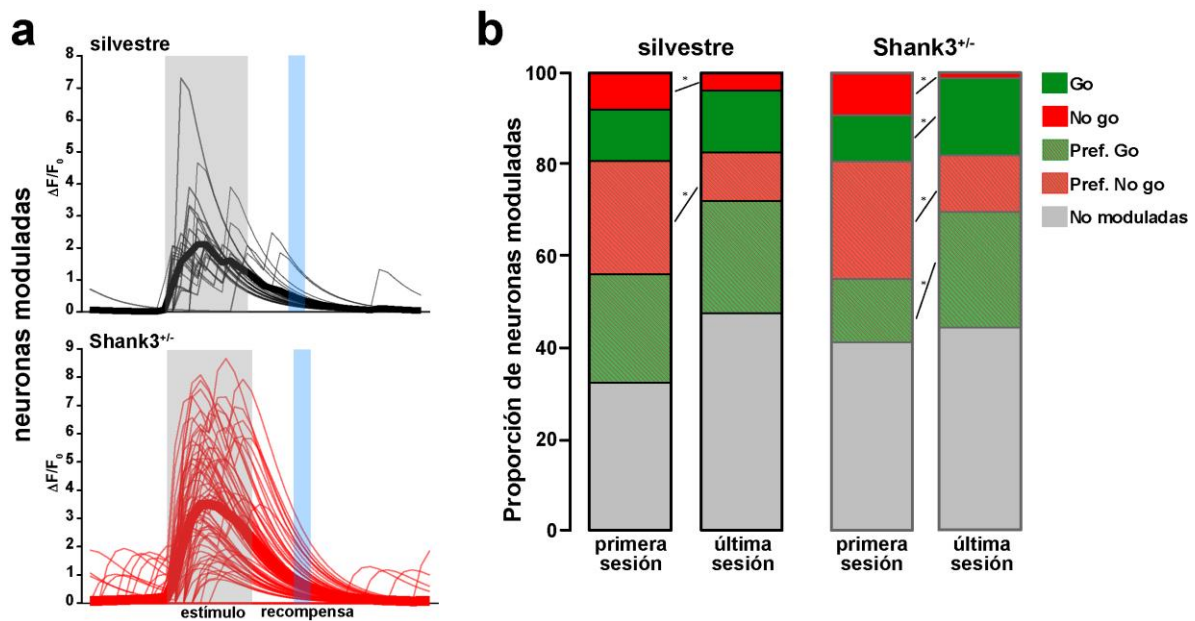


Figura 13. La proporción de neuronas de ratones Shank3 cambia con el aprendizaje tanto para estímulo Go como No go. a) Se muestra un ejemplo de una neurona con actividad modulada al estímulo Go de un ratón silvestre y de un ratón Shank3. En ambos casos, la neurona evaluada aumenta su valor de $\Delta F/F_0$ durante la presentación del estímulo visual (sombreado color gris) al menos 3 veces mayor que la desviación estándar del periodo basal y este aumento es consistente en al menos 20% de los ensayos. **b)** Proporción de neuronas con actividad modulada a los estímulos Go y No go antes y después del aprendizaje de la tarea de discriminación visual. Las neuronas con la clasificación "Pref." Son aquellas que responden a ambos

estímulos, pero los valores de $\Delta F/F_0$ son mayores para alguno de los dos estímulos. En color gris se muestra la proporción de neuronas que no tuvieron actividad modulada por ninguno de los estímulos. * $P < 0.05$ Prueba exacta de Fisher para dos proporciones.

6.3 Cambios en la intensidad de la actividad neuronal asociados al aprendizaje

En estudios previos se ha demostrado que la actividad neuronal de V1 es dinámica en función de un aprendizaje visual, esto es, las neuronas aumentan o disminuyen su actividad después de que los animales se someten a protocolos conductuales de discriminación visual (Makino & Komiyama 2015, Poort et al 2015, Puścian et al 2020). Para determinar la existencia de cambios en la intensidad de la actividad neuronal asociada a la tarea de discriminación visual, se hizo una evaluación de los valores de $\Delta F/F_0$ de neuronas con actividad modulada por los estímulos que componen la tarea utilizando análisis de curva ROC. Para ello, se consideraron los valores de $\Delta F/F_0$ obtenidos durante la presentación de los estímulos como Verdaderos positivos y los obtenidos durante el periodo basal como falsos positivos y se analizó el área bajo la curva (ABC) de la distribución de valores de $\Delta F/F_0$ (Fig. 12).

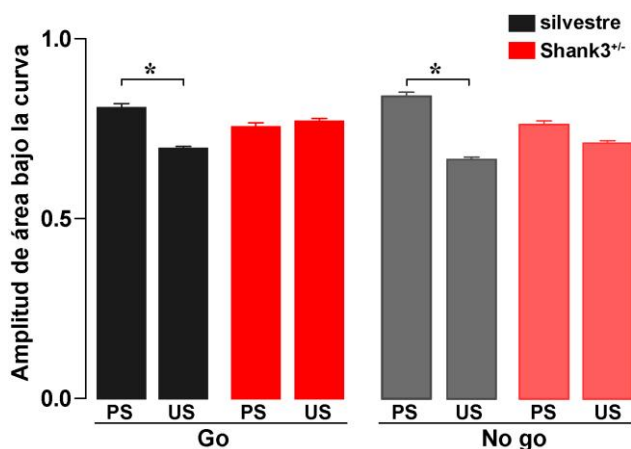


Figura 14. Análisis de la intensidad de la actividad sináptica de las neuronas de V1 con actividad modulada por los estímulos de la tarea de discriminación visual. Se muestran los valores del área bajo la curva (ABC) de la comparación de los valores de $\Delta F/F_0$ entre el período basal y la presentación del estímulo visual (*Go*, lado izquierdo y *No go* lado derecho) realizado en el campo de la curva ROC para la primera sesión (PS), y la última sesión (US). * $P < 0.05$ Prueba de H de Kruskal-Wallis con prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn).

Fueron comparados los valores del área bajo la curva de ambos genotipos para la primera y la última sesión, se observó que en ratones silvestres existe una reducción del del área bajo la curva en la última sesión para ambos estímulos (0.80 y 0.69 para el estímulo Go, 0.80 y 0.66 para el estímulo No go), lo que indica una disminución en la actividad neuronal asociada al aprendizaje. Sin embargo, cuando analizamos el área bajo la curva de los ratones Shank3 observamos que no existen cambios en respuesta al aprendizaje para ambos estímulos (0.75 y 0.76 para el estímulo Go, 0.76 y 0.70 para el estímulo No go) (Fig. 12).

6.4 Dinámica temporal de la actividad neuronal asociada al aprendizaje

En estudios previos, se ha demostrado que existe un cambio en la dinámica temporal de la actividad de las neuronas de V1 asociada con el aprendizaje, lo que indica arreglos en la configuración de las entradas sinápticas en V1 asociadas con un cambio en el peso de las entradas provenientes de la vía ascendente (vía sensorial) y de la vía descendente (proveniente de núcleos superiores, como la corteza retrosplenial) (Makino & Komiyama 2015). Para evaluar la dinámica temporal de la actividad de las capas 2/3 de V1, se realizó un análisis de índice de rampa de la actividad neuronal siguiendo protocolos previamente descritos (Makino & Komiyama 2015). De forma breve, el análisis de rampa es una forma de medir en qué momento de la estimulación sensorial ocurre la mayor actividad

neuronal. Para este trabajo se evaluaron dos tiempos: primera mitad y segunda mitad de los estímulos visuales. Si la mayor respuesta neuronal fue al inicio de los estímulos visuales, el valor del índice de rampa será negativo, y, por el contrario, si la actividad neuronal fue mayor momentos después del inicio de la presentación de los estímulos, el valor del índice de rampa será más positivo.

El índice de rampa se evaluó para ambos genotipos y para ambos estímulos visuales (Go y No Go) en la primera sesión del protocolo conductual y en la sesión 25, cuando se consideró que los ratones habían aprendido la tarea. Al respecto, observamos en los ratones silvestres (primera sesión= -0.1917, última sesión= 0.0034) y Shank3 (primera sesión= -0.0340, última sesión= 0.3232) hay un incremento del índice de rampa para el estímulo Go, siendo significativamente mayor en los ratones Shank3 en la última sesión en comparación a los silvestres (0.0034 y 0.3232 respectivamente) (Fig 13a). Mientras que para el estímulo No go observamos que las neuronas de ratones Shank3 desde la primera sesión tienen un índice positivo en comparación a las neuronas de ratones silvestres (0.04707 y -0.2646 respectivamente), y en la última sesión observamos que el índice de rampa incrementa para ambos genotipos (silvestres=0.1791, Shank3=0.2697) (Fig. 13a). Este análisis de la dinámica temporal se puede observar en el panel b y c de la Figura 13. Donde se observa como la mayoría de las neuronas responden al inicio del estímulo visual, sin embargo, en la última sesión de la tarea (sesión 25) la mayoría de las neuronas muestran un retraso en su respuesta para ambos estímulos.

Estos resultados muestran que la dinámica temporal de la actividad neuronal de las capas L2/3 de V1 es diferente en ratones Shank3 respecto a los ratones silvestres.

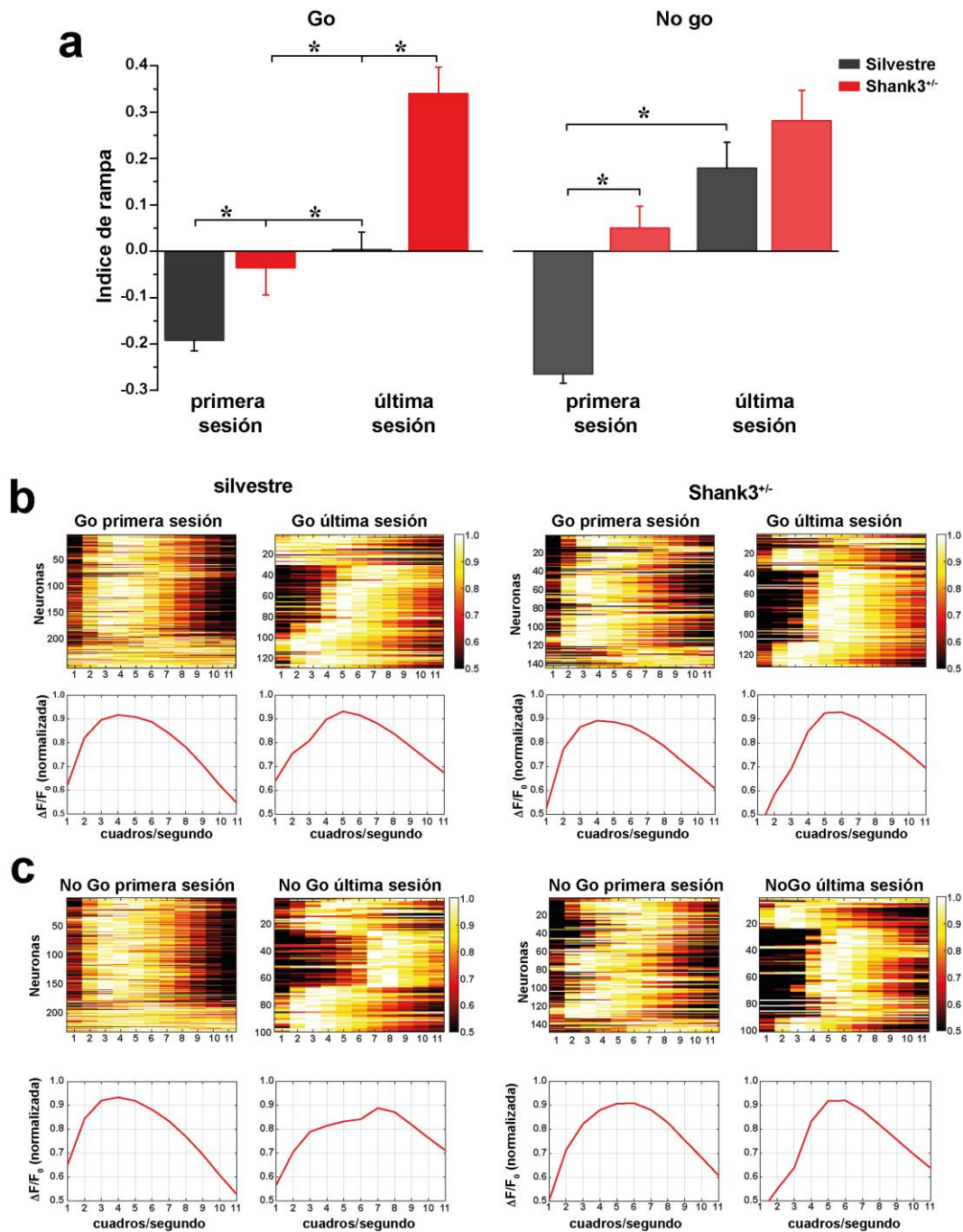


Figura 15. Dinámica temporal de la actividad neuronal de V1 asociada con el aprendizaje de la tarea de discriminación visual. a) Índice de rampa para neuronas con actividad modulada por los estímulos visuales *Go* y *No go* de ratones silvestres y Shank3. Se muestran los valores obtenidos antes del aprendizaje (primera sesión) y posterior al aprendizaje (última sesión). * $P < 0.05$ Prueba H de Kruskal-Wallis con pruebas post-hoc de comparación múltiple de Dunn. **b, c)** Mapas de calor de los valores normalizados de $\Delta F/F_0$ a lo largo del tiempo (medido en cuadros) de la presentación de los estímulos visuales para todas las neuronas moduladas antes (primera sesión) y después del entrenamiento (última sesión). En la parte inferior se muestra el promedio de los valores normalizados $\Delta F/F_0$ de todas las neuronas representadas en la parte superior (mapas de calor), para ratones silvestres y Shank3 respectivamente.

7. Discusión

Uno de los síntomas centrales del trastorno del espectro autista (TEA) es la alteración en la percepción sensorial. En la actualidad existen evidencias que demuestran la presencia de procesos sensoriales atípicos en el TEA, las cuales pueden ser las causas, o al menos ser concomitantes no sólo con las alteraciones en la percepción, sino que con el resto de los síntomas centrales del autismo (deficiencias en la interacción social, en el lenguaje y las conductas repetitivas). Por esta razón es importante conocer los mecanismos fisiológicos asociados a la integración sensorial y las alteraciones que en ella ocurren en el TEA. En este proyecto se analizó la actividad neuronal de la corteza visual primaria (V1) asociada con el aprendizaje de una tarea de discriminación visual de ratones haploinsuficientes de *Shank3*, un modelo genético de autismo, y de forma paralela, se evaluó el desempeño de estos ratones en la realización de la tarea.

Al evaluar el aprendizaje encontramos que los ratones *Shank3* aprenden con mayor rapidez la tarea de discriminación visual, además de que existe una tendencia a presentar un mejor desempeño en la misma. Estos datos se correlacionan con lo reportado en ratones *MECP2*, un modelo del síndrome de Rett, donde observan que estos ratones tienen un mejor desempeño en una tarea de detección visual con estímulos a alta frecuencia espacial y bajo contraste, en comparación a ratones silvestres (Zhang et al 2017). Sin embargo, tal como ocurre en los humanos, en los diferentes modelos animales existe una variabilidad donde el aprendizaje perceptual parece depender del tipo de tarea.

Pues en una tarea de discriminación de visual de pares de imágenes en pantalla táctil, ratones Shank3B, modelo en el cual se eliminan tres isoformas de la proteína SHANK3, y ratones BTBR, modelo idiopático de TEA, tardan más en aprender la tarea que ratones silvestres (Copping et al 2017, Silverman et al 2015).

Por otra parte, en un modelo del síndrome de X frágil (*Fmr1*^{-/-}), un modelo de TEA ligado a la herencia, los ratones *Fmr1*^{-/-} muestran un retraso en el aprendizaje de una tarea de discriminación visual (Goel et al 2018). Cabe mencionar que datos (no publicados) de nuestro laboratorio donde a los ratones Shank3 son entrenados a responder a una tarea visual en un condicionamiento clásico, y una vez que han aprendido muy bien la tarea, se les cambia la contingencia, es decir, que el estímulo que aprendieron que les daba recompensa ahora es el estímulo no asociado a recompensa y el estímulo no recompensado ahora es el recompensado. Cuando esto ocurre los ratones silvestres aprenden la nueva contingencia después de algunas sesiones, mientras que los ratones Shank3 no son capaces de aprender la nueva contingencia. Estos datos sugieren que los ratones Shank3 son inflexibles para aprender una nueva regla una vez que han aprendido muy bien una primera regla. En su conjunto todos estos datos demuestran que el trastorno del espectro autista puede afectar o no el aprendizaje dependiendo de la tarea que se esté evaluando. Sin embargo, se desconocen cuáles son las bases neuronales que subyacen a estas alteraciones en el aprendizaje.

Actualmente gracias al desarrollo de herramientas como la microscopía de excitación de dos fotones *in vivo* y los sensores de calcio genéticamente codificados, se ha

demostrado que corteza visual primaria, no es un área meramente sensorial, ahora se sabe que se modula en respuesta al aprendizaje (Gavornik & Bear 2014, Jurjut et al 2017, Poort et al 2015, Puścian et al 2020). Además, se ha reportado que en pacientes con TEA hay alteraciones sensoriales relacionadas con la visión y en áreas relacionadas al procesamiento visual (Gliga et al 2015, Mottron et al 2007, Robertson et al 2014, Samson et al 2012a, Wang et al 2015).

Por lo anterior, creemos que es relevante estudiar como la actividad neuronal de corteza visual primaria se modula con el aprendizaje y como la haploinsuficiencia de Shank3 puede alterar esta actividad y consecuentemente el aprendizaje. Cuando analizamos la actividad neuronal de corteza visual primaria en nuestro modelo de TEA, encontramos que en los ratones Shank3 los cambios en las proporciones de neuronas de corteza visual primaria con actividad asociada a los estímulos visuales (Go y No go) es más dinámica, es decir, las proporciones de neuronas que responden a los estímulos (estímulos Go, No go, con preferencia por Go y con preferencia por No go) cambian significativamente cuando los ratones han aprendido la tarea (sesión 25), mientras que en los ratones silvestres sólo observamos cambios en las neuronas moduladas por el estímulo No go o con preferencia por No go. Específicamente, observamos que en los ratones silvestres la proporción de neuronas que se modulan por el estímulo No go disminuye, lo cual correlaciona con lo reportado en ensambles neuronales que responden al estímulo No go, donde el número de neuronas que forman el ensamble disminuye cuando el ratón es experto (Carrillo-Reid et al 2019, Makino & Komiyama 2015). Sin embargo, en los

ratones Shank3 la proporción de neuronas que responden al estímulo Go incrementa con el aprendizaje, mientras que las del estímulo No go disminuyen, esto puede deberse a que las neuronas de ratones Shank3 tienen un mayor índice de selectividad a la orientación en comparación a los ratones silvestres, y presentan una tendencia a responder a los estímulos ortogonales (CA. 2017). En otros modelos de TEA se han demostrado alteraciones en la actividad de las neuronas de V1 y una repercusión a nivel conductual, de forma similar a lo que se observa en este trabajo. En un modelo del síndrome de X frágil ($Fmr1^{-/-}$), las neuronas piramidales de V1 muestran una menor selectividad a la orientación que corresponde con un menor desempeño en una tarea de discriminación visual (Goel et al 2018).

Por otra parte, evaluamos la intensidad de la actividad neuronal durante la primera y última sesión de la tarea visual. Al respecto, observamos que cuando los ratones silvestres han aprendido la tarea hay una disminución en la amplitud de la señal, sin embargo, esto no lo observamos en los ratones Shank3. Esta disminución en la respuesta se ha reportado previamente en diferentes paradigmas conductuales, donde se ha observado que cuando los animales aprenden una tarea, la respuesta de las neuronas al estímulo disminuye, y esta plasticidad requiere de la activación de los receptores NMDA (Puścian et al 2020). Una posible explicación de lo que sucede en los ratones Shank3, es que la plasticidad sináptica mediada por NMDA está afectada en éstos ratones (Perera-Murcia 2019), lo cual pudiera estar afectando los circuitos intracorticales.

Finalmente, evaluamos la dinámica temporal de la actividad neuronal de V1, pues se ha demostrado que el aprendizaje retrasa la respuesta de las neuronas de V1 al inicio del estímulo visual, lo cual no ocurre en una estimulación pasiva, donde el ratón sólo ve estímulos ni en animales anestesiados, demostrando que el aprendizaje modula la temporalidad de la respuesta de neuronas de V1 (medido como índice de rampa), esto debido a la modulación de la vía Top-down (corteza retrosplenial- capa 1- capa 2/3) sobre las neuronas de la capa 2/3 (Makino & Komiyama 2015). En concordancia con lo anterior, encontramos que en ambos grupos de ratones (silvestres y Shank3) hay un incremento del índice de rampa cuando los ratones han aprendido la tarea, siendo más grande el cambio en los ratones Shank3.

Todos estos datos nos indican que la actividad intracortical en ratones Shank3 puede estar alterada debido a la haploinsuficiencia de Shank3, pero esto de alguna manera impacta de manera positiva en el aprendizaje de estos ratones, aumentando la selectividad de neuronas de corteza visual específicamente de las capas 2/3.

8. Conclusiones

1. Los ratones Shank3 tienen un mejor desempeño en una tarea de discriminación visual tipo Go-No go, aprenden más rápido que los ratones silvestres.
2. En los ratones silvestres el aprendizaje disminuye la proporción de neuronas que responden al estímulo No go. Mientras que los ratones Shank3, incrementa la proporción de neuronas que responden al estímulo Go o con preferencia por Go, y

disminuye la proporción de neuronas que responden al estímulo No go o con preferencia por el No go.

3. La amplitud de la respuesta de las neuronas a los estímulos Go y No go disminuye con el aprendizaje en los ratones silvestres, pero esto no ocurre en los ratones Shank3.
4. La dinámica temporal de la actividad neuronal, medida como índice de rampa, incrementa con el aprendizaje en ambos genotipos, pero la magnitud es mayor en los ratones Shank3.

9. Referencias

- Association AP. 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Atallah BV, Bruns W, Carandini M, Scanziani M. 2012. Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* 73: 159-70
- Bagni C, Zukin RS. 2019. A synaptic perspective of fragile X syndrome and autism spectrum disorders. *Neuron* 101: 1070-88
- Bastos AM, Usrey WM, Adams RA, Mangun GR, Fries P, Friston KJ. 2012. Canonical microcircuits for predictive coding. *Neuron* 76: 695-711
- Belmonte MK, Allen G, Beckel-Mitchener A, Boulanger LM, Carper RA, Webb SJJJoN. 2004. Autism and abnormal development of brain connectivity. *Neuron* 44: 9228-31
- Berditchevskaia A, Cazé R, Schultz SR. 2016. Performance in a GO/NOGO perceptual task reflects a balance between impulsive and instrumental components of behaviour. *Scientific reports* 6: 1-15
- Bourgeron T. 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 16: 551-63
- Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, et al. 2010. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism* 1: 15
- Broussard GJ, Liang R, Tian L. 2014. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in molecular neuroscience* 7: 97
- CA. OC. 2017. *Análisis de la actividad neuronal de la corteza visual de ratones tipo autista (SHANK3) in vivo en modo de cabeza fija mediante microscopia de excitación de dos fotones*. Tesis Licenciatura thesis. Universidad Nacional Autónoma de México
- Carbonetto S. 2014. A blueprint for research on Shankopathies: a view from research on autism spectrum disorder. *Dev Neurobiol* 74: 85-112
- Carrillo-Reid L, Han S, Yang W, Akrouh A, Yuste R. 2019. Controlling visually guided behavior by holographic recalling of cortical ensembles. *Cell* 178: 447-57. e5

- Chen Q, Deister CA, Gao X, Guo B, Lynn-Jones T, et al. 2020. Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD. *Nat Neurosci* 23: 520-32
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, et al. 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499: 295-300
- Copping NA, Berg EL, Foley GM, Schaffler MD, Onaga BL, et al. 2017. Touchscreen learning deficits and normal social approach behavior in the Shank3B model of Phelan–McDermid Syndrome and autism. *Neuroscience* 345: 155-65
- Costales JL, Kolevzon A. 2015. Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics* 12: 620-30
- Dhar SU, del Gaudio D, German JR, Peters SU, Ou Z, et al. 2010. 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J Med Genet A* 152A: 573-81
- Dinstein I, Heeger DJ, Lorenzi L, Minshew NJ, Malach R, Behrmann M. 2012. Unreliable evoked responses in autism. *Neuron* 75: 981-91
- Dinstein I, Pierce K, Eyster L, Solso S, Malach R, et al. 2011. Disrupted neural synchronization in toddlers with autism. *Neuron* 70: 1218-25
- Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, et al. 2012. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism research* 5: 160-79
- Gavornik JP, Bear MF. 2014. Learned spatiotemporal sequence recognition and prediction in primary visual cortex. *Nature neuroscience* 17: 732-37
- Ghasemi, A., & Zahediasl, S. (2012). Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *International journal of endocrinology and metabolism*, 10(2), 486.
- Giovannucci A, Friedrich J, Gunn P, Kalfon J, Koay SA, et al. 2018. Caiman: An open source tool for scalable calcium imaging data analysis. bioRxiv. *Preprint* 10: 339564
- Glickfeld LL, Histed MH, Maunsell JH. 2013. Mouse primary visual cortex is used to detect both orientation and contrast changes. *Journal of Neuroscience* 33: 19416-22
- Gliga T, Bedford R, Charman T, Johnson MH, Team B. 2015. Enhanced Visual Search in Infancy Predicts Emerging Autism Symptoms. *Curr Biol* 25: 1727-30
- Goel A, Cantu DA, Guilfoyle J, Chaudhari GR, Newadkar A, et al. 2018. Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. *Nat Neurosci* 21: 1404-11
- Guo ZV, Hires SA, Li N, O'Connor DH, Komiyama T, et al. 2014. Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PLoS one* 9: e88678
- Han Q, Kim YH, Wang X, Liu D, Zhang Z-J, et al. 2016. SHANK3 deficiency impairs heat hyperalgesia and TRPV1 signaling in primary sensory neurons. *Neuron* 92: 1279-93
- Holtmaat A, Bonhoeffer T, Chow DK, Chuckowree J, De Paola V, et al. 2009. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc* 4: 1128-44
- Jaramillo TC, Speed HE, Xuan Z, Reimers JM, Liu S, Powell CM. 2016. Altered striatal synaptic function and abnormal behaviour in Shank3 exon4-9 deletion mouse model of autism. *Autism Research* 9: 350-75
- Jiang YH, Ehlers MD. 2013. Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* 78: 8-27
- Jurjut O, Georgieva P, Busse L, Katzner S. 2017. Learning enhances sensory processing in mouse V1 before improving behavior. *Journal of Neuroscience* 37: 6460-74

- Kissinger ST, Wu Q, Quinn CJ, Anderson AK, Pak A, Chubykin AA. 2020. Visual experience-dependent oscillations and underlying circuit connectivity changes are impaired in Fmr1 KO mice. *Cell reports* 31: 107486
- Lee PS, Foss-Feig J, Henderson JG, Kenworthy LE, Gilotty L, et al. 2007. Atypical neural substrates of Embedded Figures Task performance in children with Autism Spectrum Disorder. *Neuroimage* 38: 184-93
- Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang J-I, Suh P-G, et al. 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: 29510-18
- Makino H, Komiyama T. 2015. Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex. *Nat Neurosci* 18: 1116-22
- Monteiro P, Feng G. 2017. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 18: 147-57
- Mottron L, Mineau S, Martel G, Bernier CS-C, Berthiaume C, et al. 2007. Lateral glances toward moving stimuli among young children with autism: Early regulation of locally oriented perception? *Development and psychopathology* 19: 23-36
- Ortiz Cruz, Carlos Alberto, sustentante Análisis de la actividad neuronal de la corteza visual de ratones tipo autista (Shank3) in vivo en modo de cabeza fija mediante microscopía de excitación de dos fotones / 2017
- Pakan JM, Currie SP, Fischer L, Rochefort NL. 2018. The impact of visual cues, reward, and motor feedback on the representation of behaviorally relevant spatial locations in primary visual cortex. *Cell reports* 24: 2521-28
- Perera-Murcia G. 2019. *Depresión sináptica de largo plazo mediada por los receptores mGluR y NMDA en ratones haploinsuficientes de Shank3*. Master thesis. Universidad Nacional Autónoma de México
- Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, et al. 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472: 437-42
- Phelan K, McDermid HJM. 2011. The 22q13. 3 deletion syndrome (Phelan-McDermid syndrome). *2*: 186-201
- Poort J, Khan AG, Pachitariu M, Nemri A, Orsolic I, et al. 2015. Learning enhances sensory and multiple non-sensory representations in primary visual cortex. *Neuron* 86: 1478-90
- Priebe NJ, McGee AW. 2014. Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. *Frontiers in Neural Circuits* 8: 123
- Puścian A, Benisty H, Higley MJ. 2020. NMDAR-dependent emergence of behavioral representation in primary visual cortex. *Cell reports* 32: 107970
- Robertson CE, Thomas C, Kravitz DJ, Wallace GL, Baron-Cohen S, et al. 2014. Global motion perception deficits in autism are reflected as early as primary visual cortex. *Brain* 137: 2588-99
- Samson F, Mottron L, Soulières I, Zeffiro TA. 2012a. Enhanced visual functioning in autism: an ALE meta-analysis. *Hum Brain Mapp* 33: 1553-81
- Samson F, Mottron L, Soulières I, Zeffiro TAJHbm. 2012b. Enhanced visual functioning in autism: An ALE meta-analysis. *33*: 1553-81
- Schroeder JC, Reim D, Boeckers TM, Schmeisser MJ. 2017. Genetic Animal Models for Autism Spectrum Disorder. *Curr Top Behav Neurosci* 30: 311-24
- Silverman JL, Gastrell P, Karras M, Solomon M, Crawley J. 2015. Cognitive abilities on transitive inference using a novel touchscreen technology for mice. *Cerebral cortex* 25: 1133-42

- Sun W, Tan Z, Mensh BD, Ji N. 2016. Thalamus provides layer 4 of primary visual cortex with orientation- and direction-tuned inputs. *Nat Neurosci* 19: 308-15
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, et al. 1999. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23: 583-92
- Wang S, Jiang M, Duchesne XM, Laugeson EA, Kennedy DP, et al. 2015. Atypical visual saliency in autism spectrum disorder quantified through model-based eye tracking. 88: 604-16
- Wang X, Xu Q, Bey AL, Lee Y, Jiang Y-h. 2014. Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice. *Molecular autism* 5: 1-14
- Wilks TA, Harvey AR, Rodger J. 2013. Seeing with two eyes: integration of binocular retinal projections in the brain. *Functional Brain Mapping and the Endeavor to Understand the Working Brain*: 227-50
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, et al. 2003. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet* 40: 575-84
- Yang M, Bozdagi O, Scattoni ML, Wöhr M, Rouillet FI, et al. 2012. Reduced excitatory neurotransmission and mild autism-relevant phenotypes in adolescent Shank3 null mutant mice. *Journal of Neuroscience* 32: 6525-41
- Zhang D, Yu B, Liu J, Jiang W, Xie T, et al. 2017. Altered visual cortical processing in a mouse model of MECP2 duplication syndrome. *Sci Rep* 7: 6468