



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Refinamiento de la actividad neuronal de corteza visual en respuesta al aprendizaje en una tarea de sobre-especificidad en ratones SHANK3

TESIS

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

PRESENTA:

Psicol. EMILIANO JÍMENEZ MÁRQUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

DR. LUIS ALBERTO CARRILLO REID

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., **NOVIEMBRE**

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Refinamiento de la actividad neuronal de corteza visual en respuesta al aprendizaje en una tarea de sobre-especificidad en ratones SHANK3

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Psicol. EMILIANO JÍMENEZ MÁRQUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

DR. LUIS ALBERTO CARRILLO REID

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

OFICIO CPCB/1062/2021

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 el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión (virtual) ordinaria del día 30 de agosto de 2021, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **JIMÉNEZ MÁRQUEZ EMILIANO** con número de cuenta **311144824** con la tesis titulada **“Refinamiento de la actividad neuronal de corteza visual en respuesta al aprendizaje en una tarea de sobre-especificidad en ratones Shank3”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
Vocal: DR. JOSÉ BARGAS DIAZ
Vocal: DR. ALONSO MARTÍNEZ CANABAL
Vocal: DR. JEAN-PASCAL MORIN
Secretario: DR. LUIS ALBERTO CARRILLO REID

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 08 de noviembre 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)-IN207420 por el apoyo económico.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, Tutora Principal, al Dr. Luis Carrillo Reid y a la Dra. Elvira Galarraga Palacio, miembros del Comité Tutor. Gracias por acompañarme a lo largo de estos tiempos.

Personalmente quiero dedicar este montón de páginas, rayas y colores a mi padre y a mi hermana pues sin su apoyo y cariño nada de esto habría sido posible, es más, muchas veces no habría ni llegado a tiempo para realizar los experimentos. También quiero dedicarla a mi madre, aunque no podrá leerla.

A su vez quiero reconocer la titánica labor de la Dra. Yazmín Ramiro y de los M en C. Gerardo Perera y Carlos Ortiz pues entiendo que convivir conmigo no fue lo más fácil. Además, quiero reconocer a mis compañeros de laboratorio, personas altamente inteligentes y perseverantes, personas como Cecilia Gómez y Karla Casas. A todos ellos también les agradezco su amistad, elemento muy necesario para haber sobrevivido tanto tiempo en un proyecto tan demandante.

Obviamente no puedo olvidar al grupo liderado por el Dr. Fatuel Tecuapetla, especialmente al M en C. Iván Linares, el Dr. Edgar Diaz, los casi doctores Héctor Alatraste, Kathia Ramírez y Anil Verma, tampoco puedo omitir al Dr. Josué Ramírez pues sin ellos mis probabilidades de éxito para la conclusión de esta etapa hubieran sido cercanas a 0. Muchas gracias por su ayuda y amistad.

Esta tesis también se logró con la ayuda de amigos que pertenecen a la familia extendida del IFC, amigos como el L en C. C. Martín García, la Dra. Mariana Dunhe y el Dr. Guillermo Hernández. Si los omito de mi vida estoy seguro de que muchas cosas del lab hubieran explotado.

Obviamente no puedo olvidar a todos mis amigos científicos, ya que no solo somos colegas sino familia: La Dra. Eva Soto; los casi doctores Beatriz Gutiérrez, Martín Migliaro y Sofia Cruz; los casi M en C. Miroslava Peralta y Lizandro Polanco; los futuros doctores Aida Elizondo, Sebastián Lucero, Mariel Almaguer y Sonia Ortega. Muchas veces me salvaron de decir y hacer cosas sin sentido, eso lo apreciaré siempre.

Y bueno, no por ir al ultimo son menos importantes, sin ustedes no habría sobrevivido hasta mis 26 años y seguramente mis ideas serían muy diferentes. Muchas gracias, Paulina López, José Jaimes, Casandra Cabrera Adriana Duque, Roberto Balleza, Oksana Olvera, Edurne Yáñez, Claudina Spiritu, Aldo Perera, Karina Saldívar, Mari García, Ángel López y Luis Montiel.

PLVS VLTRA

Con pleno uso de consciencia, decido dedicar esta tesis a mi hermana. Espero te sirva de inspiración, así como tú me inspiras a mi para iniciar nuevas aventuras.

Emiliano Jiménez Márquez

Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Glosario	iii
1. Introducción	1
1.1 Trastorno del espectro autista (TEA)	1
1.2 Alteraciones del procesamiento sensorial como síntoma importante del TEA	2
1.3 Alteraciones en el procesamiento de información visual en el TEA	2
1.4 Síndrome de Phelan McDermid	4
1.5 SHANK3	5
1.6 Ventajas del modelo murino heterocigoto de SHANK3	7
1.7 Procesamiento de información visual en roedores	7
1.8 Psicofísica y Neurometría	10
1.9 Microscopía de excitación de dos fotones <i>in vivo</i>	12
1.10 Sensores de calcio genéticamente codificados	13
1.11 Sobre-especificidad del aprendizaje	14
1.12 Selectividad neuronal en la Corteza Visual Primaria y aprendizaje	15
1.13 Ensamblajes neuronales en la Corteza Visual Primaria	17
2. Planteamiento del problema	19
3. Hipótesis	18
4. Objetivo general	19
4.1 Objetivos particulares.....	19
5. Metodología	20
5.1 Animales.....	20
5.2 Ventanas craneales, infecciones virales y modalidad cabeza fija	20
5.3 imagenología de calcio en animales despiertos.	20

5.4 Detección de patrones visuales y sobre especificidad del aprendizaje	21
5.5 Procesamiento de Imágenes y obtención de señales	23
5.6 Identificación de ensamblajes neuronales	24
5.7 Identificación de neuronas a lo largo de las sesiones	26
5.8 Clasificación de neuronas selectivas a los componentes de la tarea	26
5.9 Clasificación de neuronas semi selectivas a los componentes de la tarea	28
5.10 Análisis de fiabilidad	30
5.11 Índice de Rampa	31
6 Resultados	33
6.1 Los ratones Shank3 desarrollan una sobre-especificidad del aprendizaje	33
6.2 Modificaciones a la actividad neuronal de V1 como consecuencia del aprendizaje	41
6.3 Formación de ensamblajes neuronales durante el aprendizaje en ratones Shank3	44
6.4 Alteraciones en el balance entre las vías bottom-up y top-down durante el aprendizaje en los ratones Shank3	48
6.5 Movilidad inter categórica de las neuronas selectivas a través del aprendizaje	50
6.6 Alteración de las interacciones entre neuronas selectivas y no selectivas en los cambios de contingencia para ratones Shank3	52
6.7 La interacción entre neuronas selectivas y semi selectivas es importante para la generación de conductas adaptativas	56
7 Discusión	58
8 Conclusiones	67
9 Referencias	69

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. El Síndrome de Phelan-McDermid se encuentra dentro del TEA, la sintomatología asociada a este síndrome es causada por una delección en la región q del cromosoma 22, en esa región se encuentra el gen Shank3. Este gen 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, esto refleja inflexibilidad conductual y una falla en los mecanismos cognitivos que permiten generalizar una regla. Existe un modelo murino del Síndrome de Phelan-McDermid que presenta alteraciones conductuales equivalentes a las observadas en pacientes con TEA.

Nosotros encontramos que los ratones haploinsuficientes de SHANK3 también presentan sobre-especificidad del aprendizaje, principalmente derivada de un exceso en la calidad de las representaciones que les permiten entender un cambio de contingencia. A la par encontramos un correlato fisiológico de la sobre-especificidad del aprendizaje en la corteza visual primaria pues los grupos de neuronas de los ratones haploinsuficientes de SHANK3 pierden toda similitud entre ellos durante el cambio de contingencia además de no generar un cambio dinámico en la selectividad de sus respuestas mientras se aprende, todo esto al compararlos con ratones silvestres. Además, encontramos que la capacidad de seguir ciertos estímulos en los ratones SHANK3 tampoco parece cambiar mientras se aprende y esto es congruente con las habilidades de detección mostradas durante la primera regla y con los problemas para entender la segunda regla de aprendizaje. Finalmente, encontramos que en los ratones silvestres los ensambles neuronales y los grupos de neuronas que codifican dos estímulos al mismo tiempo interactúan para detectar con una mayor precisión todas las presentaciones de una regla, esto no sucede en los ratones haploinsuficientes de Shank3 durante la presentación de la segunda regla de aprendizaje.

Por lo tanto, podemos concluir que las alteraciones observadas durante un cambio en las reglas de aprendizaje en los organismos haploinsuficientes de SHANK3 está relacionada con una falla en los mecanismos de codificación de la información en la corteza visual primaria y que esa falla en los mecanismos de codificación tiene como origen mecanismos de neurotransmisión glutamatérgica alterada.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is considered a neurodevelopmental disorder. It is characterized by deficits in verbal and non-verbal communication, deficits in social interaction, and repetitive or stereotyped behaviors. The Phelan-McDermid Syndrome is found within the ASD, the symptoms associated with this syndrome are caused by a deletion in the q region of chromosome 22, in that region is the Shank3 gene. This gene encodes for the protein of the same name (SHANK3), which is in the postsynaptic density of glutamatergic neurons. The SHANK3 protein has protein binding domains for interaction with glutamatergic receptors, which are closely related to synaptic plasticity and learning processes.

People diagnosed with ASD present alterations in neuronal activity related to visual processing areas, as well as the presence of perceptual learning over-specificity, this reflects behavioral inflexibility and a failure in the cognitive mechanisms that allow generalization of a rule. There is a murine model of Phelan-McDermid Syndrome that presents equivalent behavioral alterations to those observed in patients with ASD.

We found that SHANK3 haploinsufficient mice also show learning over-specificity, mainly derived from an excess in the quality of the representations that allow them to understand a contingency change. At the same time, we found a physiological correlate of the learning over-specificity in the primary visual cortex, since the groups of neurons of the haploinsufficient SHANK3 mice lose all similarity between them during the contingency change in addition to not generating a dynamic change in selectivity of their responses while learning, all this when compared to wild mice. Furthermore, we found that the ability to follow certain stimuli in Shank3 mice also did not seem to change while learning and this is consistent with the great detection abilities shown during the first rule and with the problems understanding the second learning rule. Finally, we found that in wild-type mice the neuronal ensembles and groups of neurons that encode two stimuli at the same time interact to detect with greater precision all the presentations of a rule, this does not happen in the haploinsufficient SHANK3 mice during presentation. of the second learning rule.

Therefore, we can conclude that the alterations observed during a change in the learning rules in SHANK3 haploinsufficient organisms is related to a failure in the information encoding mechanisms in the primary visual cortex and that failure in the encoding mechanisms originates from altered glutamatergic neurotransmission mechanisms.

GLOSARIO

- 1) **Densidad Post Sináptica:** región electrodensa de cientos de proteínas (MaGuk, ProSAP, Shank, cinasas, fosfatasa 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):** receptores 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 células y la transmisión sináptica a través de vías de señalización (Niswender & Conn, 2010).
- 7) **Corrientes excitatorias postsinápticas miniatura (mEPC):** corrientes que correlatan 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 neuroimagen; 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 (estímulo) y el ruido (ausencia de estímulo) en unidades de desviación estándar (Stanislaw & Todorov, 1999).

1. Introducción

1.1 Trastorno del espectro autista (TEA)

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, además de hiper o hiporreactividad a estímulos sensoriales (American Psychiatric Association, 2013). 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, alteraciones en la percepción sensorial, entre otros (Bourgeron, 2015; Phelan & McDermid, 2012; 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).

Actualmente se desconocen las causas del TEA, sin embargo, gracias a las herramientas genéticas de diagnóstico, se calcula que la heredabilidad de factores genéticos que predisponen al autismo es de 52% (Gaugler et al., 2014). Los desarreglos 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). Protocolos de secuenciación de última generación y análisis de redes entre genes han identificado la interacción de seis genes como candidatos causantes del TEA: *Fmn2*, *KCNQ2*, *Notch3*, *Tmrc6a*, *Slc54a* y *Shank3* (Hayretdag et al., 2020). 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, por lo que se ha acuñado el término sinaptopatías a las condiciones que resultan de su mal funcionamiento (Hayretdag et al., 2020; Huguet et al., 2013; Zoghbi & Bear, 2012). Un ejemplo de sinaptopatía es el síndrome de espectro autista Phelan-McDermid, causado por la delección del gen *Shank3* en un alelo del cromosoma 22q13 (Phelan & McDermid, 2012). Este gen codifica para la proteína del mismo nombre (SHANK3), la cual es una proteína de anclaje de la densidad postsináptica de neuronas glutamatérgicas (Jiang & Ehlers, 2013; S. Lim et al., 1999; Perfitt, Stauffer, Spiess, & Colbran, 2020).

1.2 Alteraciones del procesamiento sensorial como síntoma importante del TEA

Se estima que cerca del 96% de los infantes con TEA presentan hiper o hiposensibilidad en las modalidades vestibular, somatosensorial, auditiva, gustativa y visual (Cheung & Lau, 2020; Leekam, Nieto, Libby, Wing, & Gould, 2007; Tomchek & Dunn, 2007). Además, dependiendo de la severidad y del cuadro clínico, se pueden presentar síntomas como la búsqueda incrementada de estimulación sensorial o la percepción mejorada, alteraciones que suelen repercutir en la integración multisensorial y por ende en procesos cognitivos que dependen de la percepción, además de generar estrés y ansiedad en los sujetos (Posar & Visconti, 2018). Se sugiere que los otros tres síntomas centrales del TEA (deficiencias en el lenguaje, la interacción social y la presencia de conductas repetitivas y estereotipadas) pueden ser una consecuencia directa de estas alteraciones, algunos grupos de investigación sugieren que los síntomas sensoriales habían sido relegados de la investigación debido a las dificultades de los pacientes para comunicar estos síntomas (Iarocci & McDonald, 2006; Lane, Molloy, & Bishop, 2014; Posar & Visconti, 2018). Los estudios de genética molecular han mostrado una posible conexión entre genes relacionados con el neurodesarrollo y la presencia de estos síntomas (Carbonetto, 2014; Meguid, Eid, Reda, Elalfy, & Hussein, 2020; Moessner et al., 2007; Monteiro & Feng, 2017; Peça et al., 2011; X. Wang et al., 2011).

1.3 Alteraciones en el procesamiento de información visual en el TEA

Datos obtenidos por tecnologías de imagenología cerebral en pacientes han 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 control (Keehn, Shih, Brenner, Townsend, & Müller, 2013; Samson et al., 2012). Estos datos han sido corroborados en su congruencia por un metaanálisis de ALE (por sus siglas en inglés: Activation Likelihood Estimation) (Samson, Mottron, Soulières, & Zeffiro, 2012), este tipo de análisis permite comparar las coordenadas de estructuras determinadas como “activas” en distintos artículos, a través de comparaciones entre las coordenadas reportadas establece si existe convergencia en la evidencia recolectada (Acar, Seurinck, Eickhoff, & Moerkerke, 2018). En la modalidad visual, los infantes con TEA son menos capaces de detectar estímulos en movimiento, en situaciones de

alto contraste con el fondo (Koh, Milne, & Dobkins, 2010), respecto a infantes sanos, lo mismo sucede en tareas de detección de coherencia de movimiento (Spencer et al., 2000). De igual forma, se ha reportado que las personas con TEA presentan atención visual atípica a través de múltiples niveles y categorías de objetos, específicamente se observa un sesgo por el centro de las imágenes sin importar la distribución de los objetos, además la saliencia de los rostros y los objetos es menor que en personas no diagnosticadas con este desorden (Cheung & Lau, 2020; Humphreys, Hasson, Avidan, Minshew, & Behrmann, 2008; 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 visuales basándose en texturas o movimiento, además de mostrar actividad anormal en las vías visuales ventral y dorsal (Baum, Stevenson, & Wallace, 2015; Bertone, Mottron, Jelenic, & Faubert, 2003; Dumoulin, Baker Jr, Hess, & Evans, 2003). Además, se ha reportado que los campos receptivos de las áreas corticales V2, V3 y V4 son más grandes en personas con TEA en comparación con pacientes sin TEA (Schwarzkopf, Anderson, de Haas, White, & Rees, 2014). Estos reportes sugieren que en el TEA existen alteraciones de la actividad neuronal relacionada con el procesamiento de la información visual y que estas alteraciones pueden afectar el aprendizaje y el desarrollo social correcto. 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 y en la conectividad entre ciertas áreas podrían causar una integración deficiente de la información y esto a su vez los síntomas neurocognitivos ya comentados (Cheung & Lau, 2020).

Las conductas atípicas usualmente son causadas por actividad neuronal atípica. Por lo tanto, las conductas mostradas en el TEA sugieren alteraciones en el procesamiento subcortical y cortical para estímulos visuales, pues en la detección de dirección y movimiento están involucrados la retina, el Núcleo Geniculado Lateral dorsal (NGLd) del tálamo y la corteza visual primaria (Fallah & Reynolds, 2001; Grünert & Martin, 2020; Katzner, Born, & Busse, 2019). A su vez, para la percepción y el reconocimiento de objetos, V1 y las cortezas visuales de asociación

son necesarias (Sam F Cooke & Bear, 2015; Henschke et al., 2020; Ramesh, Burgess, Sugden, Gyetvan, & Andermann, 2018).

1.4 Síndrome de Phelan McDermid

El síndrome Phelan-McDermid es una sinaptopatía y se considera un TEA. Los pacientes con este síndrome muestran, además de los síntomas característicos del TEA, un retraso, o no desarrollo, del habla, déficit intelectual (de moderado a severo según el caso), contacto visual reducido, ansiedad, conductas auto estimulatorias, hipotonía neonatal, dimorfismos craneofaciales menores, menor sensibilidad al dolor, epilepsia, entre otros (Han et al., 2016; Phelan & McDermid, 2012; Schmeisser & Verpelli, 2016; Uchino & Waga, 2013).

Se cree que la sintomatología asociada a este síndrome es causada por una deleción en el brazo q del cromosoma 22 de humanos que representa 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 deleción (ver glosario) del gen *Shank3* en un alelo (Fig. 1).

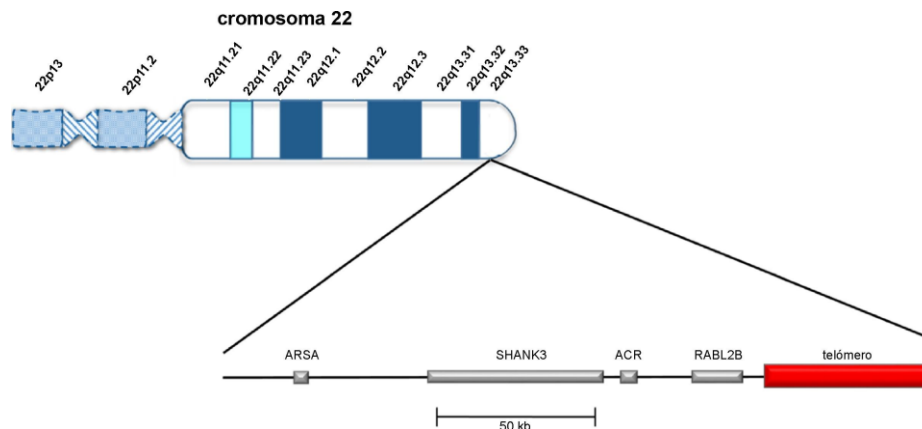


Figura 1. Esquema del cromosoma 22 y deleción de *Shank3*. La deleción puede incluir los genes ARSA, ACR, RABL2B *Shank3* y el telómero. Modificado de (Costales and Kolevzon, 2015).

1.5 SHANK3

El gen *Shank3* se encuentra en el cromosoma 22, en la región q13.3 en humanos. Abarca cerca de 60 kb de ADN, incluyendo 22 exones. Este gen codifica para la proteína SHANK3 que, tiene seis variantes de *splicing* representadas con letras de a a f. La proteína SHANK3 es miembro de la familia SHANK que comprende SHANK1, SHANK2 y SHANK3 que son codificadas por los genes *Shank1*, *Shank2* y *Shank3* respectivamente. Es una proteína de anclaje de la densidad postsináptica de neuronas glutamatérgicas que cuenta con cinco dominios de unión a proteínas: ANK (región de seis repeticiones de anquirina), SH3 (por sus siglas en inglés: Src Homology 3), PRO (región rica en prolina), SAM (por sus siglas en inglés Sterile Alpha Motif) y un sitio de unión PDZ (Carbonetto, 2014; Costales & Kolevzon, 2015; Monteiro & Feng, 2017). El dominio ANK permite la interacción de SHANK3 con el citoesqueleto a través de α -fodrina; la región SH3 interactúa con la proteína GRIP1 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. Por su parte, la región rica en prolina (PRO) se une la contractina y a la proteína Homer, la cual interactúa con los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs). Finalmente se encuentra el dominio SAM, el cual es requerido para la localización de SHANK3 a la densidad postsináptica (Fig. 2) (Monteiro & Feng, 2017; Naisbitt et al., 1999).

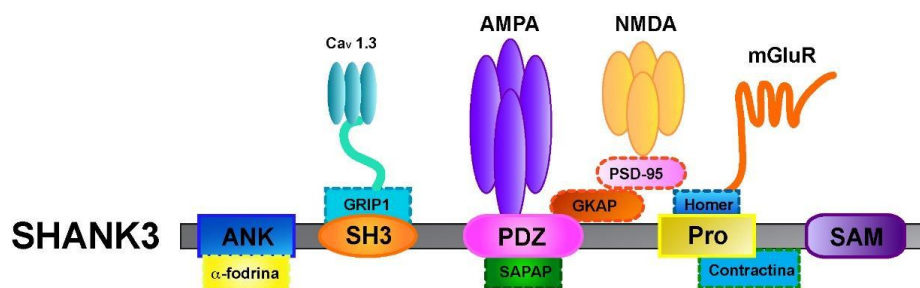


Figura 2. Esquema de la proteína SHANK3. El esquema ilustra los dominios de unión a proteínas de SHANK3, repeticiones de anquirina (ANK), SH3, PDZ, región rica en Prolina (Pro) y SAM, y su expresión en la post-sinapsis. Modificado de (Jiang & Ehlers, 2013)

SHANK3 se expresa en grandes cantidades en el corazón, y de forma moderada en el bazo y en el cerebro. Ahí se encuentra altamente expresada en sinapsis cortico-estriatales, talámicas, hipocampales y cerebelares (Sangmi 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), específicamente los niveles de SHANK3 incrementan en el momento en que las sinapsis maduran (Uchino et al., 2006). 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 un fenotipo conductual que coincide con el TEA (Bozdagi et al., 2010; Carbonetto, 2014; Jiang & Ehlers, 2013). La presencia de SHANK3f en distintas estructuras no ha podido ser determinada debido a que sus promotores se encuentran embebidos en el exón 21 (X. Wang, Xu, Bey, Lee, & Jiang, 2014).

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	baja	presente
Tálamo	presente	baja	baja	baja	presente
Amígdala	presente	baja	baja	baja	presente
Cerebelo	baja	baja	alta	alta	baja

1.6 Ventajas del modelo murino heterocigoto de Shank3

Existe un modelo genético del síndrome Phelan McDermid, donde la haploinsuficiencia de *Shank3* genera un fenotipo conductual de tipo “autista”, donde los ratones heterocigotos ($Shank3^{+/-}$) presentan menor interacción entre pares, menor número de vocalizaciones ultrasónicas y un mayor número de conductas repetitivas en comparación con los ratones silvestres ($Shank3^{+/+}$) (Bozdagi et al., 2010). Además de las alteraciones cognitivas, estos ratones muestran una expresión reducida de los receptores de metabotrópicos de glutamato (específicamente en la subunidad GluR1) y en los receptores AMPA (específicamente en la subunidad NR2B), esto se traduce en deficiencias en el funcionamiento de sinapsis excitatorias, teniendo como consecuencia alteraciones en la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) pero no la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés) en sinapsis hipocampales (Bozdagi et al., 2010; Uchino & Waga, 2013). Datos obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que en espinas dendríticas de ratones $Shank3^{+/-}$ neonatales, existen alteraciones en la LTD mediada por mGluRs y NMDA, además la imposibilidad de inducir LTP.

1.7 Procesamiento de información visual en roedores

A pesar de las diferencias en la complejidad de la corteza visual de roedores con respecto a los humanos, ésta presenta una serie de similitudes, 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). Asimismo, a diferencia de otros mamíferos superiores, la corteza visual primaria de ratones carece de organización columnar (Keck et al., 2013).

Los estímulos visuales llegan a la retina y estos son transformados en señales eléctricas por los fotorreceptores y a través de un procesamiento intrarretinal, 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 al CSc y a la corteza primaria visual ipsilateral (Fig. 3) (Wilks, et al., 2013; Busse, 2018; Cheung & Lau, 2020), 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).

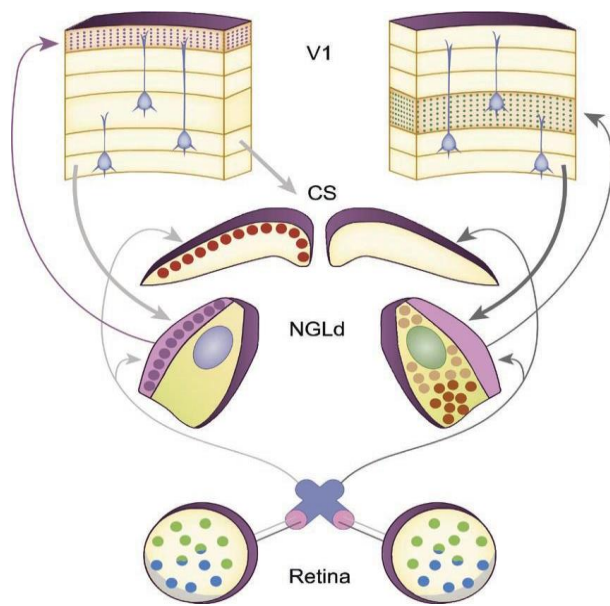


Figura 3. La vía visual de ratón. La información entra por la retina, donde los fotorreceptores convierten las ondas de luz en impulsos nerviosos. Decusa en el Quiasma Óptico y llega al Núcleo Geniculado Lateral dorsal o al Colículo Superior. Del Núcleo Geniculado Lateral dorsal la información es enviada a las Capas 1 y 4 de la Corteza Visual Primaria (V1) (Busse, 2018).

En la retina del ratón, podemos encontrar tres tipos de fotorreceptores, bastones, conos S (sensibles a luz UV) y conos M (sensibles a luz verde); los bastones más abundantes, 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 citoarquitectura clara, pero se pueden observar dos regiones bioquímicamente distintas pues la región central es positiva a parvalbúmina y la región del caparazón es positiva a calbindina-D. La región central proyecta preferentemente a la capa IV de la corteza visual primaria y la región del caparazón a las capas I y III 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 retinotópica (quinze áreas han sido identificadas) que se origina de los procesos entrantes desde el NGLd, aunque existe poca evidencia de organización columnar (Busse, 2018; Ohki & Reid, 2007). Las agrupaciones de neuronas codificantes ante estímulos visuales se encuentran distribuidas 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 la orientación, la dirección y el 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. 4) (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., 2018b; Ramesh et al., 2018).

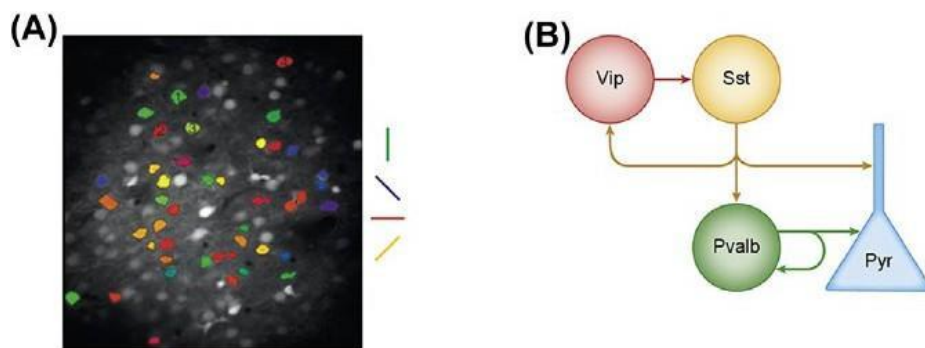


Figura 4. Organización de la corteza visual primaria de ratón. A) En este corte horizontal se muestra la estructura de “sal y pimienta” donde las neuronas selectivas a distintas orientaciones (colores) se muestran disgregadas a lo largo de la zona de imagen. **B)** Esquema con los tipos de neuronas de la Corteza Visual Primaria y sus patrones de conexión.

1.8 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 cómo 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 señales) de patrones aleatorios (nombrados ruido) (Stanislaw & Todorov, 1999). Las elecciones cerradas de un sistema son catalogadas de acuerdo con 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 (Tabla 2). Esta metodología nos permite inferir objetivamente qué 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: “Estímulo Ausente” Respuesta: “Estímulo Presente”

Estímulo Presente	Omisión	Acierto
Estímulo Ausente	Rechazo Correcto	Falsa Alarma

Desde mediados del siglo pasado se comenzó a mezclar la psicofísica con la teoría de detección de señales, esto permitió analizar el proceso de aprendizaje perceptual de un organismo, ya que el uso de ambas disciplinas permite dar retroalimentación al sujeto durante el proceso de aprendizaje. Generalmente los aciertos y los rechazos correctos llevarán 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 proporcionarán 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 en la tarea. En la investigación del sistema visual se busca que el organismo identifique características de un estímulo particular (color, contraste, frecuencia espacial, orientación y dirección) (Armington, 2012; Ramesh et al., 2018; Stanislaw & Todorov, 1999).

1.9 Microscopía de excitación de dos fotones *in vivo*

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 dos fotones permite realizar imagenología de estructuras profundas en animales despiertos con la finalidad de registrar simultáneamente la actividad neuronal y la conducta, además de permitirnos la resolución espacial ausente de los registros electrofisiológicos de campo y la resolución temporal de la que carecen otras técnicas de neuroimagen (Denk & Svoboda, 1997).

La microscopía de dos fotones, como su nombre lo indica, hace referencia a la absorción de dos fotones en un sólo 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, Denk, Kleinfeld, & Tank, 1997; Svoboda & Yasuda, 2006) (Fig. 5). La absorción simultánea es un proceso óptico no lineal que permite alterar el estado de una molécula, generalmente llevándola a un estado de mayor energía; si se utilizan láseres pulsados de longitudes de onda larga se puede generar absorción simultánea de fotones ya que el desfase entre ellos será en el orden de femtosegundos, estos fotones de baja energía pueden combinar su energía y excitar moléculas por largos periodos de tiempo sin riesgo de foto blanqueo o de daño del tejido, además el uso de objetivos de Apertura Numérica alta permite concentrar la densidad de fotones en un solo plano focal, entregando menos energía a los alrededores de la zona de interés, esto evita fluorescencia fuera de foco y la entrega innecesaria de energía a otras zonas (Benninger & Piston, 2013).

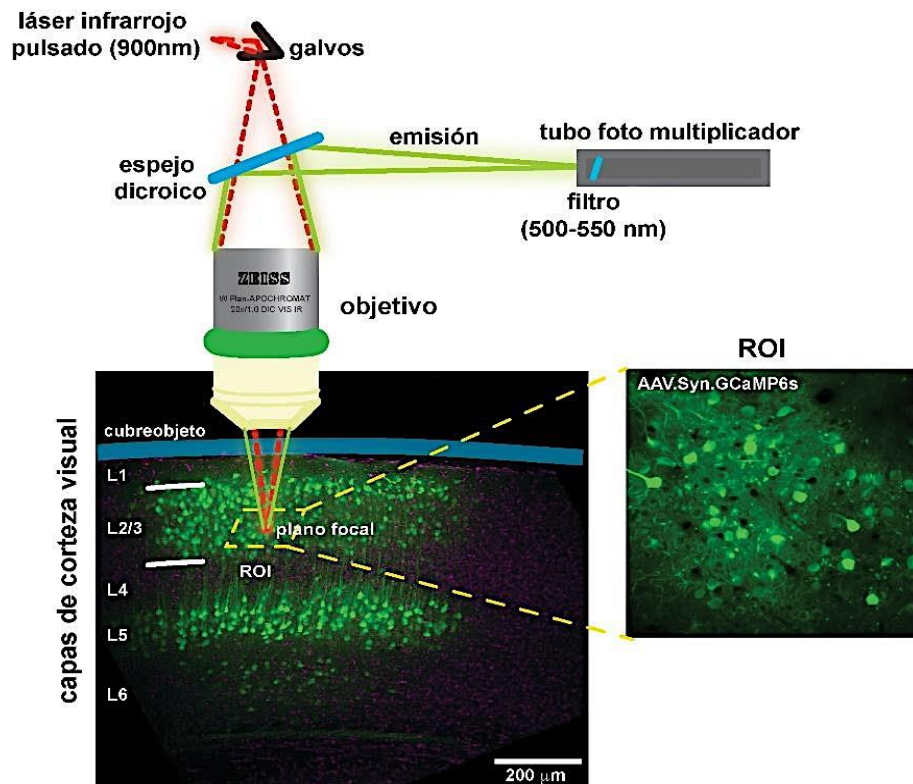


Figura 5. Esquema de los componentes de la microscopía de excitación de dos fotones. Parte inferior, muestra neuronas positivas a GCaMP6s en las diferentes capas de V1. Izquierda: magnificación del sitio de infección con AAV1.GCaMP6s. Todos los componentes ópticos que conforman un microscopio de dos fotones.

1.10 Sensores de calcio genéticamente codificados

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; Dylida et al., 2019; Mohr et al., 2020). 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 de tipo barril β de la GFP, permitiendo la liberación de energía en forma de un fotón (Fig. 6) (T. W. Chen et al., 2013; Dylida 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 conllevan a la expresión de la proteína en la membrana celular, lo cual permite la visualización de un cambio en la intensidad de emisión

fluorescente en 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 celular 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).

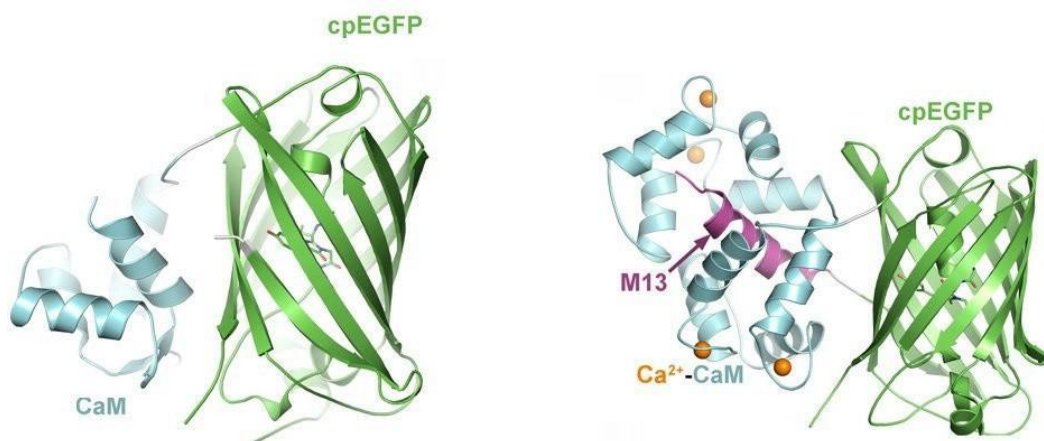


Figura 6. Indicador de calcio genéticamente codificado GCaMP6. Estructura de la proteína indicadora de calcio GCaMP6 en estado basal (panel izquierdo) y en estado activo por aumento en la concentración de calcio intracelular (panel derecho). cpEGFP: proteína verde fluorescente permutada; CaM: proteína calmodulina; M13: péptido M13.

El uso conjunto de microscopía de 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.

1.11 Sobre-especificidad del aprendizaje

Se ha descrito la existencia de alteraciones en el aprendizaje perceptual de pacientes diagnosticados con TEA, en quienes la inflexibilidad cognitiva es muy frecuente, usando un protocolo de aprendizaje perceptual (discriminación de texturas) (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). En este protocolo los participantes debían juzgar la orientación de tres barras verticales (estímulo diana) respecto a un patrón dominante de barras horizontales (ruido), el estímulo presentado durante la tarea se componía del estímulo diana sobre el fondo y era presentado durante 40 ms; posteriormente un estímulo distractor era presentado durante 100 ms para de nuevo dar paso al estímulo compuesto por el estímulo diana y el fondo. Esta tarea se les presentó durante cuatro días y pasado ese tiempo, se cambió la locación del estímulo diana y se realizó

tarea durante cuatro días más con la nueva locación del estímulo diana. 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 indicaran la orientación del estímulo diana en función del 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 fue similar mientras el estímulo diana estuvo en la primera locación. Sin embargo, 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 en las cuatro sesiones subsecuentes. Estos resultados sugieren la existencia de un fenómeno llamado sobre-especificidad del aprendizaje (Harris et al., 2016), que se define como un ineficiente reaprendizaje de la tarea, lo cual refleja inflexibilidad cognitiva y una falla en los mecanismos cognitivos que permiten generalizar una regla (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016).

1.12 Selectividad neuronal en la Corteza Visual Primaria y aprendizaje

En términos clásicos, la selectividad es una característica que emerge del fenómeno en el que un estímulo óptimo produce la respuesta máxima de una neurona (Barlow, 1953; Hubel & Wiesel, 1962), actualmente la idea se ha refinado y nos permite evaluar la calidad de la sintonización de las neuronas ante esos estímulos óptimos, es decir, la capacidad de la neurona para emitir potenciales de acción ante estímulos presumiblemente óptimos (Golden, Vilankar, Wu, & Field, 2016; Kim, Kim, Song, & Lee, 2017; Makino & Komiyama, 2015; Poort et al., 2015; Vilankar & Field, 2017). La selectividad puede verse incrementada cuando los estímulos se vuelven conductualmente relevantes (Blake, Heiser, Caywood, & Merzenich, 2006; Khan et al., 2018a; Poort et al., 2015; Yan et al., 2014) y se sugiere que estos cambios en la selectividad se deben a la reorganización de las conexiones (físicas y funcionales), es decir, a modificaciones de entradas y pesos sinápticos en neuronas individuales pero con consecuencias en la conectividad funcional de grupos de neuronas que codifican a aspectos relevantes para el aprendizaje (Cho & Chun, 2015; Moldakarimov, Bazhenov, & Sejnowski, 2014).

La corteza visual primaria esta mayormente compuesta por poblaciones de neuronas que reciben aferencias originadas en el NGL y neuronas de la via top-down que conectan la Corteza Retroesplénica, las áreas parietales posteriores de asociación y la corteza cingulada anterior (Busse, 2018; Makino & Komiyama, 2015; Zhang et al., 2016). Como consecuencia existe selectividad a ante componentes relevantes para la ejecución de conductas, algunos de estos componentes son la orientación (Ferster & Miller, 2000; Jin, Beck, & Glickfeld, 2019; Marques et al., 2018), la dirección (Marques et al., 2018; Nishiyama, Matsui, Murakami, Hagihara, & Ohki, 2019), las recompensas (Pakan, Currie, Fischer, & Rocheffort, 2018; Shuler & Bear, 2006), locaciones (Fischer, Soto-Albors, Buck, & Harnett, 2020; Pakan et al., 2018), reglas de aprendizaje (Ashwood et al., 2020; Khan et al., 2018b; Poort et al., 2015) y cambios en estas reglas (Najafi et al., 2020; Ramesh et al., 2018; Sugden et al., 2020). Se han descrito diferencias en los perfiles de selectividad de neuronas excitatorias e inhibitorias, donde las neuronas excitatorias muestran mayor selectividad ante estímulos específicos mientras que las inhibitorias se activan ante estímulos más diversos (Camillo et al., 2018; Kerlin, Andermann, Berezovskii, & Reid, 2010; Sohya, Kameyama, Yanagawa, Obata, & Tsumoto, 2007). Es importante mencionar que, a pesar de ser menos selectivas, las neuronas gabaérgicas son capaces de modular sus respuestas en función del aprendizaje (Khan et al., 2018b) y que juegan un papel importante en el control de estados corticales como las oscilaciones gamma que principalmente están asociadas a percepción y procesamiento de información (Hakim, Shamardani, & Adesnik, 2018; Kang, Huppé-Gourgues, & Vaucher, 2014; Kim et al., 2017).

La evidencia actual sugiere que la Corteza Visual Primaria es una estructura que participa de forma activa en procesos cognitivos como percepción, aprendizaje y memoria donde se necesite información visual (S. F. Cooke, Komorowski, Kaplan, Gavornik, & Bear, 2015; Gavornik & Bear, 2014; Ramesh et al., 2018). Incluso han sido descritas disfunciones en el aprendizaje visual de organismos con patologías neurofisiológicas que afectan la corteza visual primaria (Ahrendts et al., 2011; Goel et al., 2018; Sengpiel, 2014; Tatavarty et al., 2020), las hipótesis apuntan a disfunciones en la plasticidad neuronal de los microcircuitos ahí localizados, específicamente a desregulaciones en el balance de la excitación e inhibición (Goel et al., 2018); es posible que esto impida realizar modificaciones en la selectividad de las neuronas que

componen microcircuitos clave para la resolución de la tarea (Khan et al., 2018b; Makino & Komiyama, 2015; Ramesh et al., 2018; Sugden et al., 2020).

1.13 Ensamblajes neuronales en la corteza visual primaria

Se ha demostrado que las neuronas pueden agruparse en unidades funcionales llamadas ensambles, concretamente los ensambles son grupos de neuronas que se coactivan como consecuencia de estímulos sensoriales o conductas motoras (Cao et al., 2015; Carrillo-Reid, Yang, Bando, Peterka, & Yuste, 2016; Churchland et al., 2012; Kampa, Roth, Göbel, & Helmchen, 2011; Sawinski et al., 2009). Estos ensambles también pueden activarse en ausencia de los estímulos o conductas motoras, ya sea de forma artificial (Carrillo-Reid, Han, Yang, Akrouh, & Yuste, 2019; Carrillo-Reid et al., 2016) o mediante procesos fisiológicos como el sueño (Sugden et al., 2020). Las mismas neuronas pueden participar en distintos ensambles y a su vez, distintos ensambles pueden compartir las mismas neuronas; presumiblemente la conectividad es no solo anatómica sino funcional (Pinotsis, Brincat, & Miller, 2017). Otra característica importante es que los ensambles son flexibles, es decir, pueden reorganizarse, perder o ganar neuronas o redefinir su selectividad en periodos de tiempo no muy extensos y sin modificar la anatomía del tejido (DeNardo et al., 2019; Pinotsis et al., 2017).

Desde la perspectiva de los sistemas dinámicos los ensambles son sistemas no lineales cuya actividad se puede describir como la de neuronas acopladas. Mientras más neuronas compongan al ensamble, el sistema puede incluir atractores, ciclos límite y regiones caos (Miller, 2016). Los atractores tienen la capacidad de completar patrones, en el contexto de las neuronas significa que una neurona específica sería capaz de activar todo el ensamble completo, esto serviría para recuperar memorias o para reducir el ruido al momento de identificar y reconocer un estímulo (Cossart, Aronov, & Yuste, 2003; Shepherd & Grillner, 2018). La existencia de estas neuronas ha sido corroborada mediante el uso de optogenética de dos fotones (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid et al., 2016).

Existe evidencia de que los ensambles neuronales de las cortezas visuales sufren cambios en respuesta al aprendizaje (Ramesh et al., 2018; Sandler, 2008; Sugden et al., 2020) y que diferentes neuronas son capaces de codificar diferentes aspectos de una misma tarea (Ramesh

et al., 2018; Sugden et al., 2020) o incluso conceptos más generales como las condiciones de una tarea Go/No go (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid et al., 2016). Se cree que el papel de las neuronas inhibitorias gabaérgicas es el de coordinar el refinamiento de la actividad de los ensambles durante el aprendizaje puesto que tienen influencia sobre la actividad de las neuronas piramidales (Lu et al., 2017; Serrano & Caroni, 2019).

Pocos estudios han explorado de forma longitudinal como cambia la actividad en función del aprendizaje por medio de registros ópticos. En este contexto los registros ópticos nos permiten determinar la localización espacial precisa de las neuronas que componen un ensamble, además de monitorear su actividad. Entre los hallazgos más importantes se encuentra que 1) las neuronas son capaces de cambiar su actividad (selectividad a algún estímulo o acción) (Ramesh et al., 2018; Sugden et al., 2020) y 2) el reclutamiento de neuronas que originalmente no formaban parte del ensamble (Brebner et al., 2020).

2. Planteamiento del problema

Se ha reportado que pacientes diagnosticados con TEA presentan sobre-especificidad del aprendizaje en tareas guiadas por estímulos visuales (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). También se han reportado alteraciones en la actividad neuronal de cortezas sensoriales (Dinstein et al., 2012; Dinstein et al., 2011; Samson et al., 2012), y datos de nuestro laboratorio han demostrado la existencia de alteraciones en la selectividad neuronal de la corteza visual primaria (V1) de ratones SHANK3 respecto a ratones silvestres. A pesar de esto no existe una relación clara entre las alteraciones neurológicas y su impacto en las perturbaciones cognitivas de pacientes con TEA. Por lo tanto, en este proyecto se plantea evaluar la existencia de sobre-especificidad del aprendizaje de estímulos visuales y la posible contribución de las alteraciones en los microcircuitos neuronales de V1.

3. Hipótesis

La haploinsuficiencia de *Shank3* impedirá el refinamiento de la actividad neuronal de corteza visual necesaria para la codificación de elementos relevantes para codificar una regla de aprendizaje, esta inhabilidad causará deficiencias en el aprendizaje perceptual reverso.

4. Objetivo general

Evaluar si la haploinsuficiencia de *Shank3* causa alteraciones en la actividad neuronal, y si estas alteraciones repercuten en la sobre-especificidad del aprendizaje.

4.1 Objetivos particulares

1. Evaluar la flexibilidad cognitiva de los ratones *Shank3* (*Shank3*^{+/-}) y silvestres (*Shank3*^{+/+}) por medio de una tarea de aprendizaje visual que modele la sobre-especificidad del aprendizaje.
2. Realizar imagenología de calcio (GCaMP7f) con microscopía de excitación de dos fotones en ratones despiertos en las capas 2/3 de la corteza visual para obtener registros de actividad neuronal con resolución espacial.

3. Analizar la dinámica de las mismas neuronas a lo largo de las sesiones y evaluar si existen diferencias en la formación de ensamblajes neuronales en ratones Shank3 y silvestres.

5. Metodología

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 utilizan ratones macho de la cepa B6(Cg)-Shank3^{tm1.1Bux}/J (Jackson Laboratory, Lote no. 017889) (Bozdagi et al., 2010) de 8 a 16 semanas de edad, heterocigotos (Shank3^{+/-}) y silvestres (Shank3^{+/+}). Todos los experimentos se realizan a doble ciego.

5.2 Ventanas craneales, infecciones virales y modalidad cabeza fija. Las cirugías de ventanas craneales se realizan basados en un protocolo descrito con anterioridad (Holtmaat et al., 2009). Los animales son anestesiados en una cámara de infusión de anestesia con isoflurano (2-3%) al iniciar la cirugía. Una vez anestesiados (frecuencia respiratoria = 1/seg) se posicionan en un aparato estereotáxico conectado a un sistema de anestesia (isoflurano 1-1.5%) y un colchón térmico para regular la temperatura del animal durante la cirugía. Los ojos se cubren con un ungüento ocular de uso veterinario (Duralagrima, Laboratorios Grin) para evitar la resequedad e irritación.

Las coordenadas para la cirugía de la Corteza Visual Primaria (V1) son 2.5 mm lateral y 0.5 mm anteroposterior con respecto a Lambda (Holtmaat et al., 2009; Paxinos & Franklin, 2019). Se realiza una craneotomía de 2.5 mm, una vez descubierto el tejido cerebral se mantiene hidratado con buffer de corteza (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 2 mM, pH 7.4). Posterior a la craneotomía, se procede a la inyección del vector viral AAV1-Syn- GCaMP7f-WPRE-SV40 (Addgene), a una profundidad de 250 µm. Se inyecta un total de 450 nl (1.5 x 10⁹ vg/ml), dividido en seis inyecciones de ~80 nl, tres a 200 µm y tres a 250 µm, se utiliza un Nanoject 2.0 (Drummond Scientific) con pipetas de borosilicato de 0.5 µm biseladas a 45 grados aproximadamente. Para la ventana se coloca un cubreobjetos circular de 3mm de diámetro con un espesor #1 (Warner Instruments, 64-0720), el cubreobjetos es adherido por las

orillas al cráneo con cianoacrilato (Loctite Super Glue Gel, Loctite). Posteriormente se coloca una barra de acero (Diseñada por Takaki Komiyama, Janelia Research Campus) para el modo de cabeza fija.

5.3 Imagenología de calcio en animales despiertos. Para la adquisición de imágenes se utiliza 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 GCaMP7f se excita a una longitud de onda de 900 nm. Las imágenes se adquieren a una tasa de 5 Hz (200 ms por cuadro) y se utiliza un circuito diseñado a medida con una placa Arduino UNO (Arduino), además de una interfaz de Python para controlar el inicio y final de la adquisición.

5.4 Detección de patrones visuales y sobre especificidad del aprendizaje. Se entrena a los ratones bajo un paradigma de condicionamiento clásico, donde el estímulo incondicionado es una gota de leche de soya y la respuesta incondicionada corresponde a lamer un operando, con el paso de las sesiones se enseña al sujeto a lamer como consecuencia de la presentación de un estímulo de enrejado que funge como el estímulo condicionado, la respuesta condicionada es lamer ante la aparición de ese estímulo de enrejado (Fig. 7a); la presencia de un estímulo diferente no tiene una consecuencia definida y el sujeto experimenta un periodo de 6 segundos ante una pantalla gris, una especie de "tiempo fuera" (Fig. 7b). La presencia de la gota de leche de soya favorece la aparición de lengüeteos anticipatorios en el dispensador/operando (Fig. 7a). Los estímulos son presentados de forma semi aleatoria donde habrá un 33% de probabilidad de que el estímulo apareado con la gota aparezca, un 33% de probabilidad de que el estímulo apareado con el "tiempo" fuera aparezca y un 33% de probabilidad de que la pantalla gris continúe por 6 segundos más (Fig. 7b). Un ensayo consiste en la aparición de una pantalla blanca durante 1.4 s 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 presenta 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 permanece 5 s más, en caso de la ausencia del reforzador la presencia de la pantalla se alarga por 5 segundos más (Fig. 7b)..

La presencia de lengüeteos anticipatorios en conjunto con la ausencia de lengüeteos en la condición apareada en con el “tiempo fuera” funge como criterio para asumir que los animales entendieron las contingencias siguientes: patrón de enrejado específico -> gota de leche de soya -> lengüeteo / patrón de enrejado opuesto -> tiempo fuera -> no lengüeteo.

El protocolo completo se divide en dos fases. La Contingencia 1 (Fig. 7c), de 40 sesiones de duración está diseñada para que los ratones asocien muy bien esta regla de aprendizaje, así la Contingencia 2 (Fig. 7d), de la mitad de las sesiones que la fase anterior, cambia esta regla de aprendizaje y les exige hacer cambios sutiles en la estrategia que utilizan para resolver la tarea. La Contingencia 1 del experimento se presenta durante 40 sesiones, para que la conducta del animal sea catalogada como un “acierto”, este debió lengüetear durante la presentación del estímulo que precede la recompensa (gota de leche de soya) y hasta antes de la entrega de esta; si el animal lengüeteo durante la presentación del estímulo que no precede a la recompensa, su conducta será clasificada como una “falsa alarma” (Fig. 7c); La Contingencia 2 se presenta durante 20 sesiones, en este caso los estímulos que preceden la entrega de la recompensa se invierten respecto a los que no predicen la entrega de esta, “los aciertos” y “falsas alarmas” se clasifican de la misma manera pero ante estímulos diferentes (Fig. 7d)

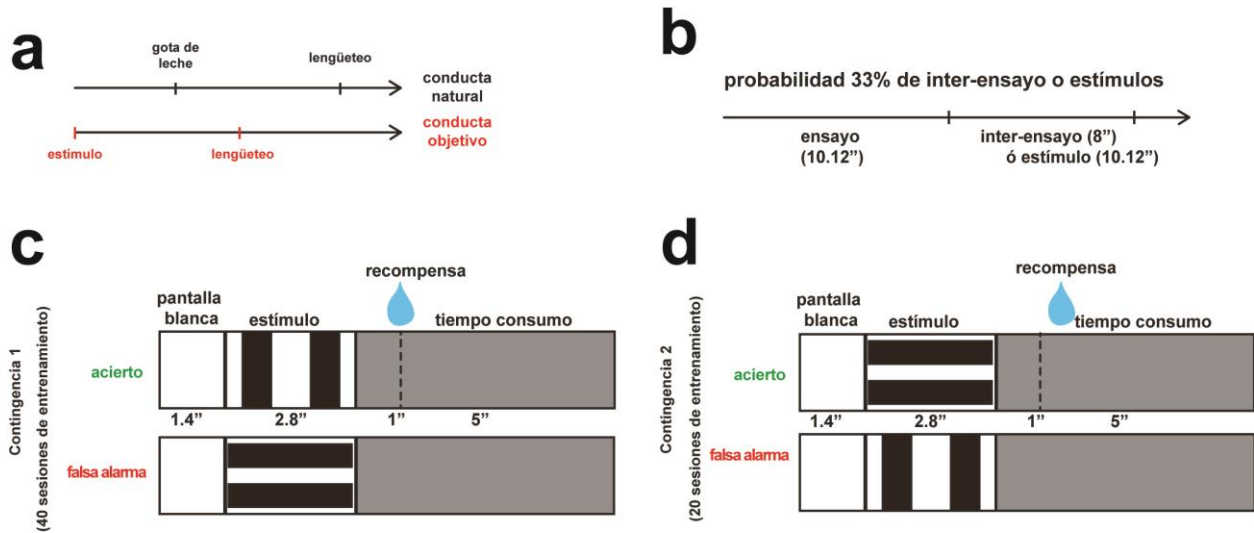


Figura 7. Conducta a evaluar y estructura de la tarea. a) La conducta natural de ratones privados de líquidos es lengüetear ante la presencia de una gota de leche de soya, mediante la manipulación de la motivación y el control de estímulos se logra sustituir la conducta de lamer ante una gota de leche por la conducta de lamer ante la presencia de un estímulo visual. b) Cada sesión experimental consta de aproximadamente 150 ensayos, cada ensayo dura 10.12 segundos y puede ser seguido de otro ensayo o de un intervalo inter-ensayo, este intervalo dura 8 segundos; al existir dos estímulos y un intervalo inter-ensayo, la probabilidad de ocurrencia de cada uno de estos es de 33.33%. c) La Contingencia 1 presenta durante 40 sesiones donde lamer en presencia del estímulo que precede a la recompensa genera un acierto y lamer en presencia del otro estímulo genera una falsa alarma. d) La Contingencia 2 presenta durante 20 sesiones la condición reversa puesto que el estímulo que antes no precedía a la recompensa ahora la precede, lo mismo sucede para la falsa alarma.

Para analizar con más detalle el refinamiento de la actividad neuronal como consecuencia del aprendizaje, se realizan seis sesiones de imagen en las sesiones 1, 20 y 40 de la primera etapa del protocolo y las sesiones 41 y 60 de la segunda etapa del protocolo. Esto se hace para determinar si los ensamblajes neuronales cambian en función del aprendizaje de la tarea.

5.5 Procesamiento de Imágenes y obtención de señales. Primero se corrige el movimiento dentro de los videos por medio de NoRMCorre (Pnevmatikakis & Giovannucci, 2017) y posteriormente CNMF-E (Zhou et al., 2018), lo cual permite extraer los transitorios de calcio de neuronas individuales. CNMF-E extrae las señales espaciales y temporales y el experimentador usa las señales espaciales y CellReg (Sheintuch et al., 2017) para verificar la identidad de las mismas neuronas al largo de cinco sesiones de imagen. Los análisis estadísticos se realizan en Matlab R2019a (Mathworks).

5.6 Identificación de ensambles neuronales. Para la extracción de los ensambles neuronales se utilizan los datos espaciales y temporales de CNMF-E (Zhou et al., 2018) junto con Stoixeion (Carrillo-Reid, Miller, Hamm, Jackson, & Yuste, 2015). Esto nos permite obtener la composición de cada ensamble (neuronas que participan en el) y la representación espacial de cada uno de ellos. Con estos datos se calcula si el ensamble era modulado por alguna de las condiciones de la tarea al considerar el número de cuadros que estuvo activo y el número de cuadros que estuvo activo mientras se presentaba algún estímulo tal que

$$MdS = \frac{\text{número de cuadros activo en presencia del estímulo}}{\text{número de cuadros activo en la sesión}}$$

Donde $MdS > 0.30$. Para establecer si existe selectividad se comparan los valores de MdS para ambos estímulos de tal suerte que:

- $EnS1 = MdS1 > MdS2$ y $MdS1 > 0.3$
- $EnS2 = MdS2 > MdS1$ y $MdS2 > 0.3$

También se calcula la fiabilidad del ensamble al establecer un periodo de 20 cuadros desde el inicio de la presentación del estímulo y se utiliza el cociente

$$fI = \frac{\text{número de respuestas ante estímulo}}{\text{número de apariciones del estímulo}}$$
 para la contingencia 1 y para la contingencia 2.

Con la información obtenida de este análisis también se identifican vectores poblacionales selectivos a cada una de las contingencias, esto consistió en localizar vectores poblacionales que contengan al menos tres neuronas coactivadas en un mismo cuadro (Fig. 8a). Se realiza un análisis de componentes principales para los vectores de ambas contingencias y después se calculó el índice de similitud para el conjunto de datos de cada contingencia (Fig. 8b) (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid et al., 2015; Carrillo-Reid et al., 2016).

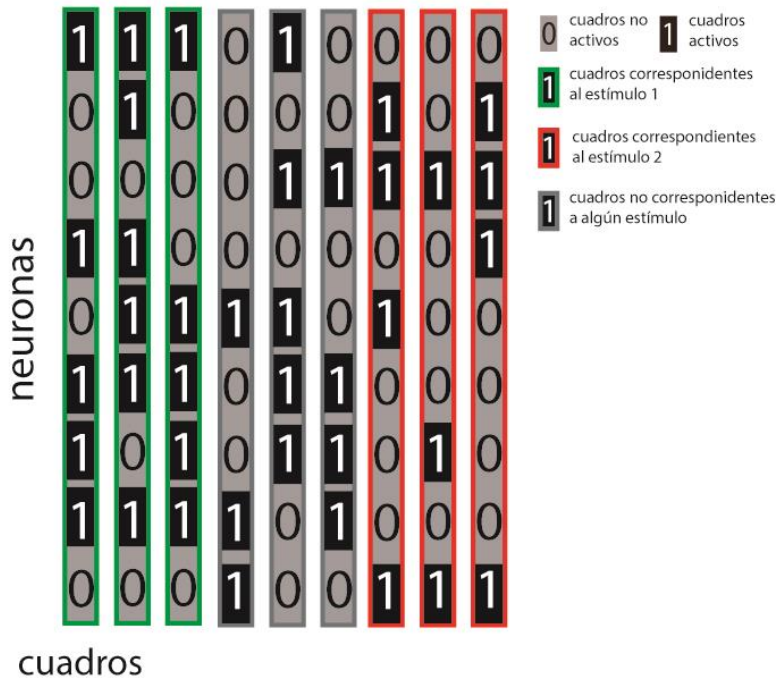
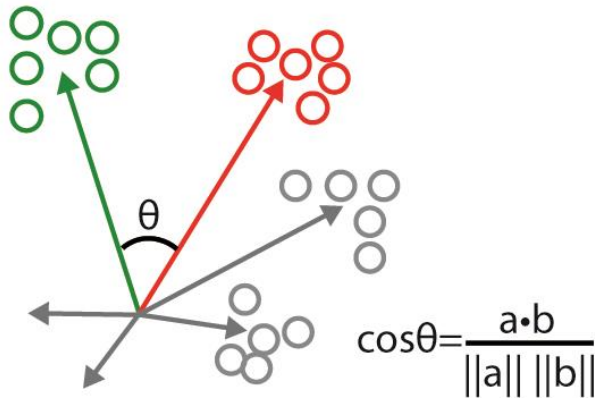
a

Figura 8. Identificación de vectores poblacionales selectivos. a) Se muestra al arreglo de $n \times m$ (neuronas \times cuadros) donde se identifican grupos de neuronas coactivas en momentos que corresponden a la aparición del estímulo 1 o el estímulo 2.

b) Esquema donde cada punto representa un vector poblacional, tal que los círculos verdes corresponden a los vectores poblacionales selectivos a alguno de los estímulos, las aglomeraciones de círculos representan ensambles. La operación que permite determinar el grado de separación entre dos aglomeraciones de vectores poblacionales es medir el ángulo entre estos. Modificado de Carrillo-Reid et al., 2019.

b

5.7 Identificación de neuronas a lo largo de las sesiones. Se utilizan los datos espaciales obtenidos de CNMF-E (Zhou et al., 2018) y CellReg (Sheintuch et al., 2017) para alinearlos y validar la presencia de un subconjunto de neuronas registradas que se establece estadísticamente que son las mismas en todas las sesiones. Para la obtención de un mayor número de neuronas, se comparan las sesiones por pares, después se acoplan los índices y localizaciones espaciales para verificar, una neurona a la vez, cada grupo que presuntamente eran las mismas a lo largo de las sesiones.

5.8 Clasificación de neuronas selectivas a los componentes de la tarea. Con las señales obtenidas por el análisis anterior se procede 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) (Fig. 9). Una neurona responsiva fue definida como aquella con un $\Delta \frac{F}{F}$ 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 sólo 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 términos en la ecuación fueron substituidos para este experimento de tal suerte que la ecuación utilizada es:

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

Donde \underline{R}_{E1} = media del $\Delta \frac{F}{F}$ perteneciente al Evento 1, \underline{R}_{E2} = media del $\Delta \frac{F}{F}$ 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 indica preferencia al Evento 1 y la obtención de un real negativo indica preferencia al Evento 2. Al ser 4 los eventos, que posiblemente modularan la actividad de las neuronas, optamos 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.

Es preciso 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 asignó a la neurona al grupo ante el cual obtuvo mayor respuesta.

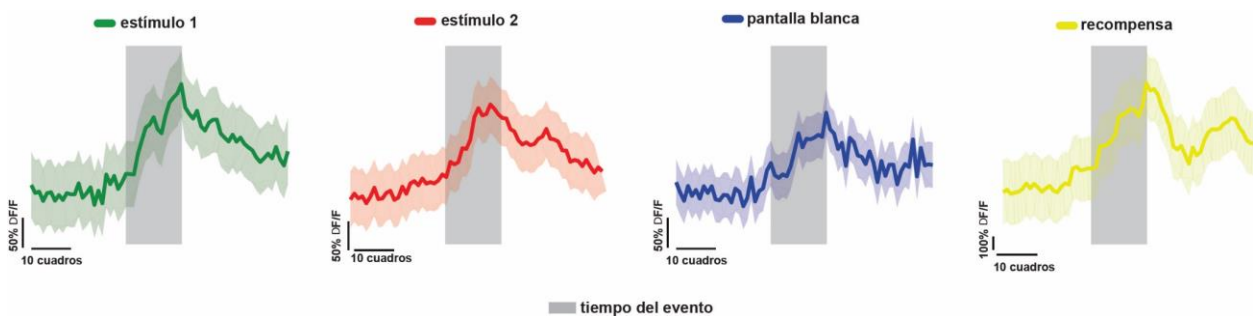


Figura 9. Identificación de vectores poblacionales selectivos. Se observan los promedios, en colores verde, rojo, azul y amarillo, de $\Delta F/F$ para cada uno de los componentes de la tarea: estímulo 1, estímulo 2, pantalla blanca y recompensa, respectivamente; el sombreado del mismo color representa la desviación estándar del promedio de transitorios.

5.9 Clasificación de neuronas semi selectivas a los componentes de la tarea. Primero se establece un periodo de 20 cuadros posteriores al inicio del estímulo 1 o el estímulo 2, después se toma al grupo de neuronas clasificadas como No Selectivas y se construyó un cociente de la forma $fI = \frac{\text{número de respuestas ante estímulo}}{\text{número de apariciones del estímulo}}$, este cociente se evalúa para ambos estímulos, de tal suerte que habría tantos pares ordenados como neuronas siendo la fiabilidad al estímulo 1 el primer elemento y la fiabilidad al estímulo 2 el segundo elemento del par ordenado. La semi selectividad quedo definida como:

- $sss1 = fIS1 > fIS2$
- $sss2 = fIS2 > fIS1$
- $null = fIS1 = fIS2$

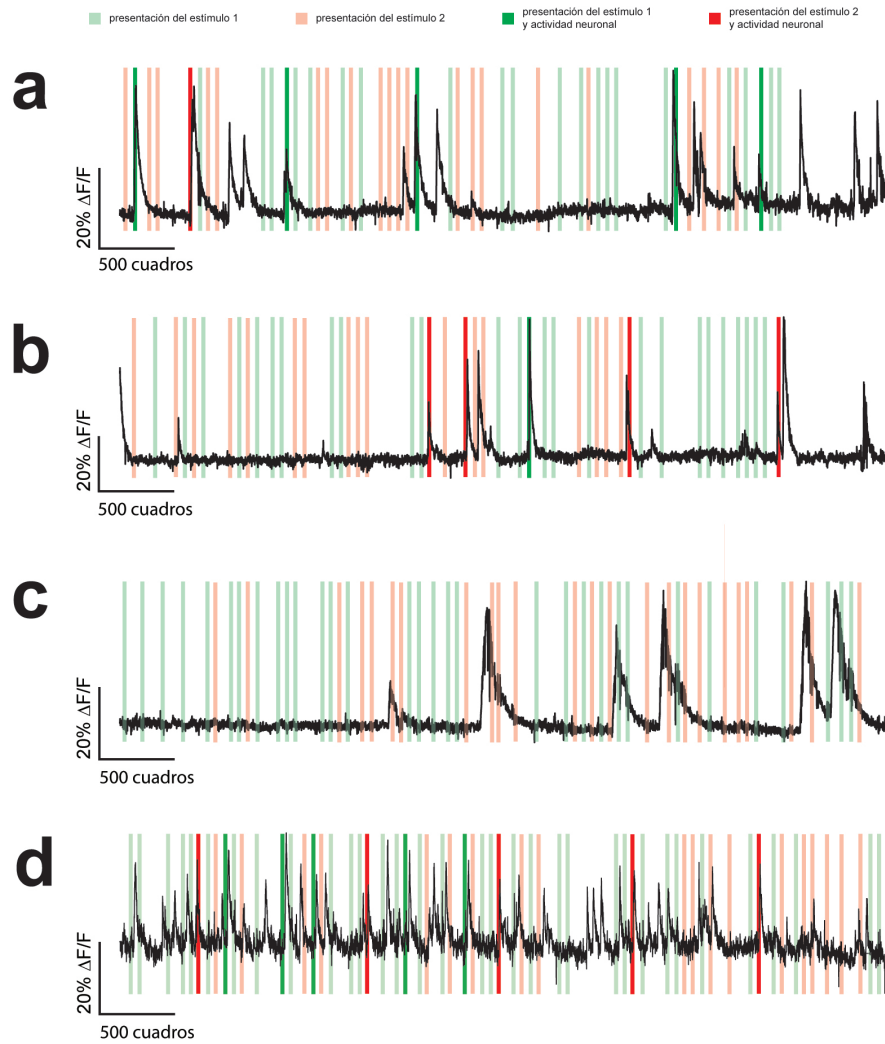


Figura 10. Identificación de neuronas semi selectivas. Para cada una de las figuras se muestran los transitorios de calcio en color negro, las barras verdes simbolizan los tiempos en los que ocurrió un ensayo correspondiente al estímulo 1 y las barras rojas los tiempos en los que ocurrió un ensayo correspondiente al estímulo 2; las barras mas oscuras muestran un evento donde la neurona tuvo actividad. a) Neurona semi selectiva al estímulo 1. b) Neurona semi selectiva al estímulo 2. c) Neurona no selectiva ni semi selectiva. d) Neurona semi selectiva a ambos estímulos.

5.10 Análisis de fiabilidad. Con las marcas temporales de los ensayos precedidos por el estímulo 1 o el estímulo 2 verificamos si el sistema a evaluar (neurona, grupo de neuronas o ensamble) estuvo activo en cada uno de los ensayos descritos anteriormente, se tomó una aproximación de teoría de detección de señales donde contamos aciertos y omisiones, de tal suerte que si el estímulo 1 se presenta 10 veces y la estructura a evaluar tiene 10 aciertos y cero comisiones tendrá fiabilidad de 1, si la estructura tuvo 1 acierto y 9 omisiones tendrá fiabilidad de 0.1 (Fig. 11).

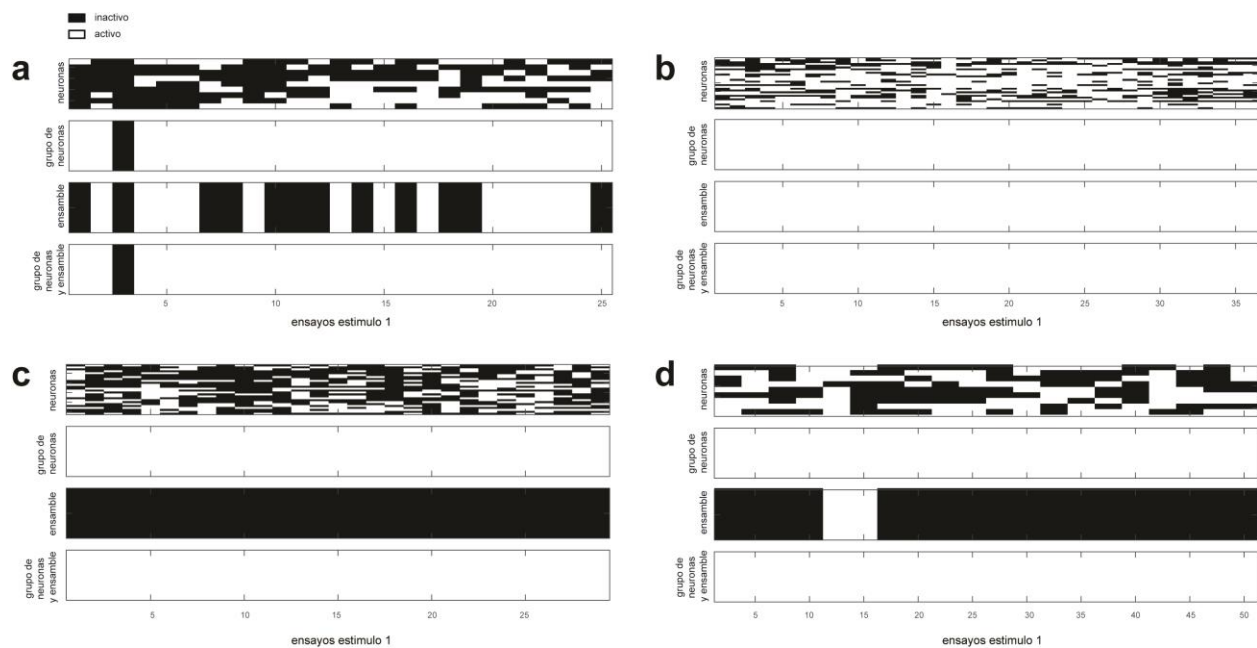


Figura 11. Posibles casos de fiabilidad. **a)** Ejemplo de una sesión donde la fiabilidad de las neuronas semi selectivas es más alta que la fiabilidad del ensamble. **b)** Ejemplo de una sesión donde la fiabilidad de las neuronas semi selectivas y de ensamble es 100%. **c)** Ejemplo donde la fiabilidad de las neuronas semi selectivas es del 100% y la del ensamble es 0%. **d)** Ejemplo donde la fiabilidad de las neuronas semi selectivas es de 100% y la del ensamble es baja.

5.11 índice de Rampa. Para las neuronas selectivas se calculan los promedios de dos periodos de diez cuadros cada uno, siendo la media de los primeros 10 cuadros después de la aparición del estímulo (R_{Early}) y la media de los últimos 10 cuadros antes de que terminara el estímulo (R_{Late}), posteriormente se calcula un cociente entre estos y se obtuvo el logaritmo base 2 de ese cociente (Makino & Komiyama, 2015), de tal forma que $IR = \log_2 \left(\frac{R_{Late}}{R_{Early}} \right)$

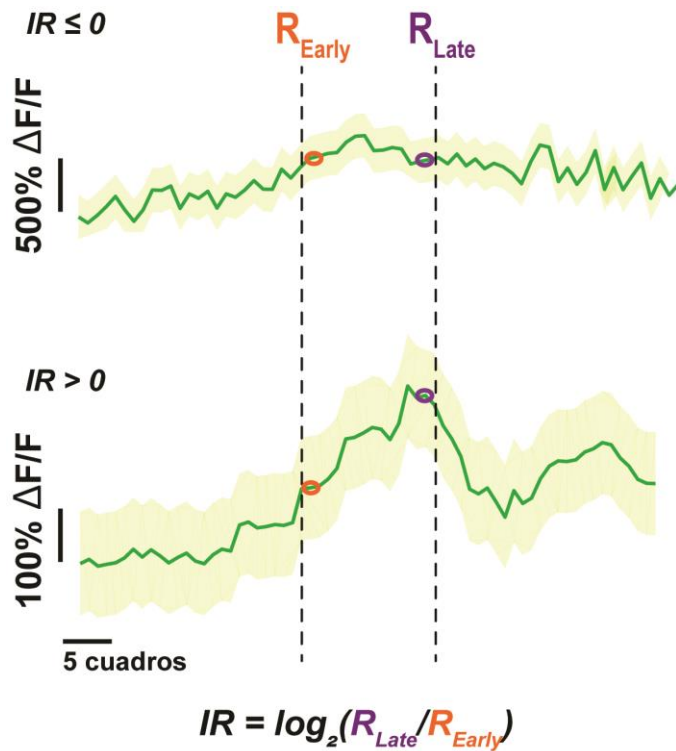


Figura 12. índice de rampa. Se muestran los promedios de una serie de transitorios de calcio en color verde y la desviación estándar en sombreado. Las líneas punteadas señalan el periodo donde inicia y termina la presentación del estímulo. El círculo naranja señala el periodo denominado como R_{Early} y el círculo morado el periodo R_{Late} . El trazo de arriba representa un caso donde el IR es menor o igual que 0 y el trazo de abajo representa un caso donde el IR es mayor que 0.

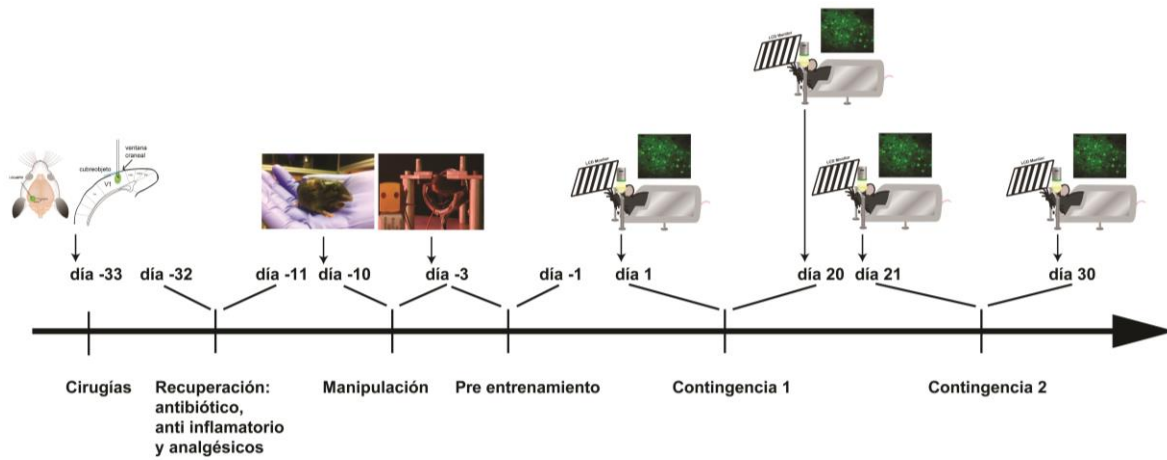


Figura 13. Cronograma del experimento. Se muestran los procesos necesarios para un experimento completo, desde las cirugías de ventana craneal, la recuperación post quirúrgica, la manipulación para habituar al ratón al experimentador y la plataforma de “head-fixed”, el pre entrenamiento para crear la asociación lengüeteo-recompensa y las dos contingencias que conforman al experimento.

6. Resultados

6.1 Los ratones Shank3 desarrollan una sobre-especificidad del aprendizaje

Utilizando el sistema de registro conductual desarrollado en el laboratorio podemos obtener lengüeteos individuales para cada una de las condiciones, en gris se muestra el periodo en el que se presentan los estímulos y en amarillo el periodo inmediato posterior a la entrega de la recompensa; para cada sesión los dos segmentos superiores representan un gráfico tipo “raster” para cada estímulo, cada punto representa un lengüeteo, el tercer componente representa un histograma de los datos correspondientes a cada estímulo. A continuación mostramos casos representativos de los lengüeteos para ambos genotipos; respecto a los ratones silvestres podemos observar que conforme la primera contingencia avanza hay una mayor presencia de lengüeteos que preceden a la recompensa y que incluso están presentes durante el estímulo, durante el cambio de contingencia podemos observar respuestas persistentes ante el estímulo anteriormente recompensado, mientras que en la última sesión podemos observar un incremento en la presencia de lengüeteos al estímulo que ahora precede a la recompensa (Fig. 14 izquierda). En los ratones Shank3 observamos un comportamiento similar al de los ratones silvestres durante la primera contingencia, sin embargo, podemos observar que para la última sesión los lengüeteos anticipatorios están presentes para ambos estímulos en proporciones similares (Fig. 14 derecha).

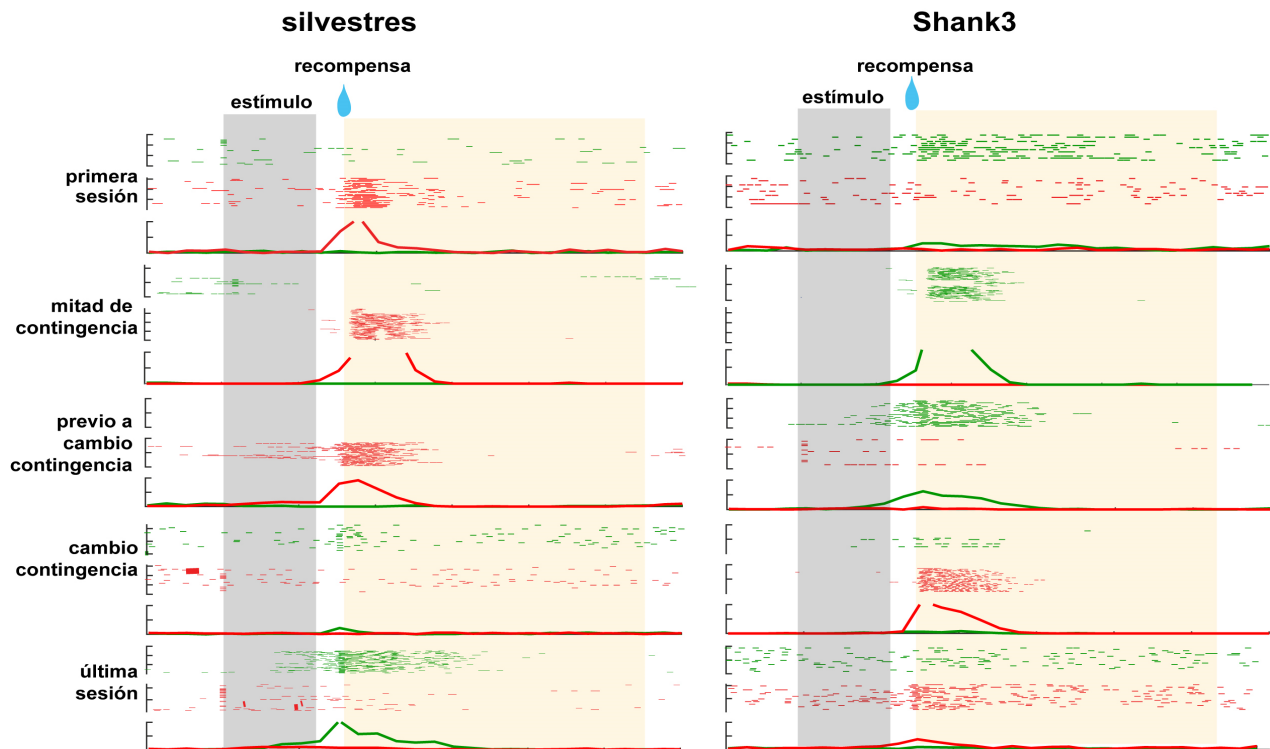


Figura 14. Desarrollo de lengüeteos anticipatorios como métrica para determinar el aprendizaje. Se muestran los lengüeteos para ambos estímulos (estímulo 1 en verde y estímulo 2 en rojo) en las 5 etapas de aprendizaje y para ambos genotipos. Para cada sesión, los dos primeros tercios del grafico indican los ensayos correspondientes al estímulo 1 o al estímulo 2 y el ultimo tercio representa un histograma de la presencia de esta conducta.

Para evaluar la sobre-especificidad en el aprendizaje en nuestro modelo de TEA, se diseñó una tarea de discriminación visual basada en un paradigma de condicionamiento clásico. Para los análisis de la sobre-especificidad del aprendizaje evaluamos el valor del índice de discriminación (d') para ratones silvestres ($Shank3^{+/+}$) y $Shank3$ ($Shank3^{+/-}$). En este análisis representamos los datos en etapas, cada una compuesta de 10 sesiones para cada contingencia. Observamos diferencias significativas para ambos genotipos cuando se compararon las primeras diez sesiones contra las últimas diez sesión de la contingencia 1, de tal forma que los dos genotipos muestran un incremento en sus puntajes de d' (promedio primera sesión $Shank3 = 0.428$, promedio pre reversal $Shank3 = 1.39$, $t_{Shank3}(9) = -5.1060$, $p = 6.3996 \times 10^{-4}$ y promedio primera sesión $silvestres = 0.3164$, promedio pre reversal $silvestres = 0.9668$, $t_{silvestres}(9) = -6.0402$, $p = 1.92 \times 10^{-4}$), en el cambio de contingencia los valores de d' disminuyen pero sólo son estadísticamente diferentes para los ratones $Shank3$ (promedio pre reversal $Shank3 = 1.39$, promedio reversal $Shank3 = 0.1351$, $t(9) = 7.6969$, $p = 3.0096 \times 10^{-5}$), mientras que entre genotipos sólo se observan diferencias para las últimas 10 sesiones de la segunda contingencia (promedio última sesión $Shank3 = 0.2135$, promedio

última sesión $d'_{\text{silvestres}} = 0.8187$, $t(9) = 2.6789$, $p = 0.0253$) (Fig. 15a). Decidimos hacer el promedio de 10 sesiones para cada una de las cinco etapas de aprendizaje, observamos que los ratones silvestres tienen un comportamiento ascendente en su d' desde las primeras tres etapas, los ratones Shank3 también presentan un comportamiento ascendente en sus valores de d' para las primeras tres etapas de aprendizaje y en cuatro de cinco ratones esto también sucede en las últimas dos etapas sin embargo esos valores de d' no sobrepasan los valores de 0.5 (Fig. 15b). Cuatro de cuatro ratones silvestres muestran un comportamiento ascendente como consecuencia del aumento de sesiones en cada contingencia, para los ratones Shank3 esto solo sucede en la primera contingencia ya que en la segunda contingencia, cuatro de cinco ratones muestran pendientes positivas muy reducidas, al comparar podemos notar pendientes distintas entre genotipos para las sesiones de la primera contingencia ($m_{\text{silvestres}} = 0.2694$ y $m_{\text{Shank3}} = 0.4451$) y para las sesiones de la segunda contingencia ($m_{\text{silvestres}} = 0.2268$ y $m_{\text{Shank3}} = 0.0784$) (Fig. 15c).

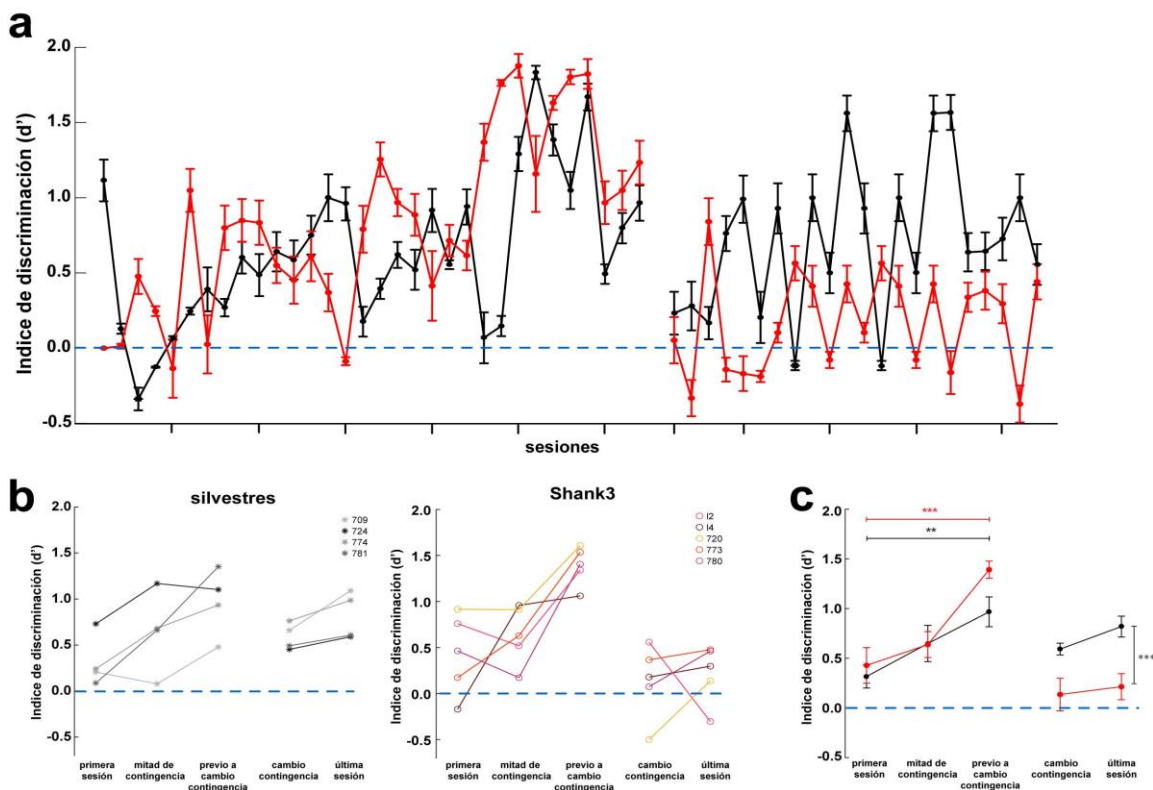


Figura 15. Sobre-especificidad del aprendizaje en ratones Shank3. a) Promedio del índice de discriminación d' a lo largo de las sesiones de aprendizaje, la línea azul señala el criterio de aleatoriedad de las respuestas; t de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. b) Promedio del d' en las etapas de aprendizaje. c) Promedios poblacionales a lo largo de las cinco sesiones de aprendizaje; prueba de permutaciones, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

Se cuantificaron las respuestas de acuerdo con la teoría de detección de señales para evaluar más detalladamente el origen de los puntajes de d' . Encontramos que, para los ratones silvestres durante la primera contingencia, los Aciertos y Falsas Alarmas y por consecuencia los Rechazos Correctos y las Omisiones son estadísticamente diferentes en las últimas diez sesiones para la primera y segunda contingencia (Aciertos previo al cambio de contingencia $_{silvestres} = 0.2116$, Falsas Alarmas previo al cambio de contingencia $_{silvestres} = 0.0780$, $t(9) = 7.6969$, $p = 3 \times 10^{-5}$, Aciertos última sesión $_{silvestres} = 0.0698$, Falsas Alarmas última sesión $_{silvestres} = 0.0304$, $t(9) = 5.4335$, $p = 6.20 \times 10^{-4}$) (Fig. 16a, 17). Respecto a los ratones Shank3 también se encontraron diferencias significativas entre Aciertos y Falsas Alarmas además de entre Omisiones y Rechazos Correctos para las últimas 10 sesiones de la primera contingencia (Aciertos previo al cambio de contingencia $_{shank3} = 0.4093$, Falsas Alarmas previo al cambio de contingencia $_{shank3} = 0.0936$, $t(9) = 0.5027$, $p = 2.8 \times 10^{-5}$), sin embargo, para la segunda contingencia no se encontraron diferencias significativas (Fig. 16b, 17). Al comparar entre genotipos sólo se observaron diferencias en las últimas 10 sesiones de la primera contingencia para las categorías de Aciertos y la categoría de Rechazos Correctos ($t(9) = 2.6789$, $p = 0.0253$) (Fig. 16a,b, 17).

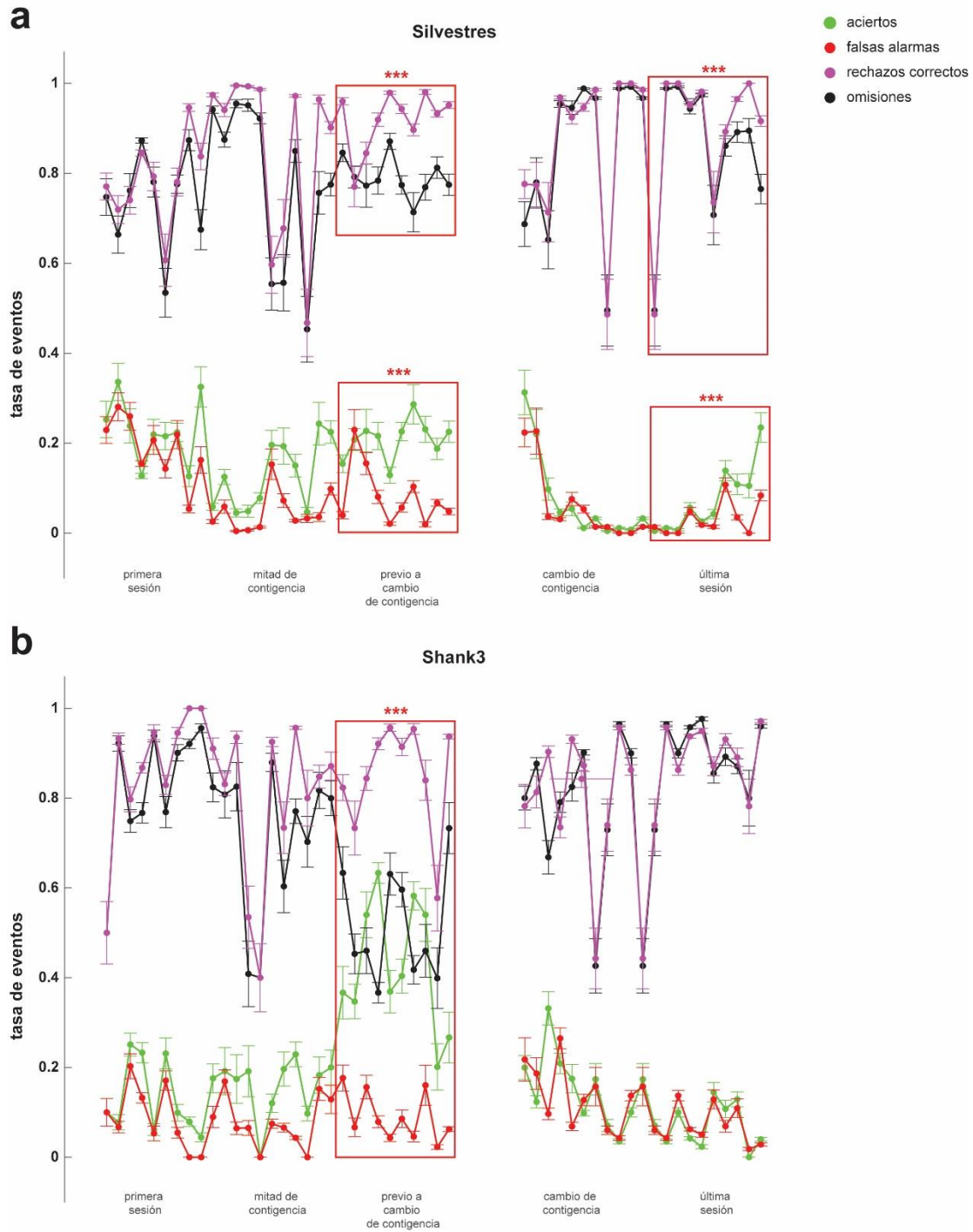


Figura 16. Aciertos, Falsas Alarmas, Rechazos Correctos y Omisiones para ambos genotipos. a) Promedio poblacional de Aciertos, Falsas Alarmas, Rechazos Correctos y Omisiones para ratones silvestres. **b)** Promedio poblacional de Aciertos, Falsas Alarmas, Rechazos Correctos y Omisiones para ratones Shank3. T de Student; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

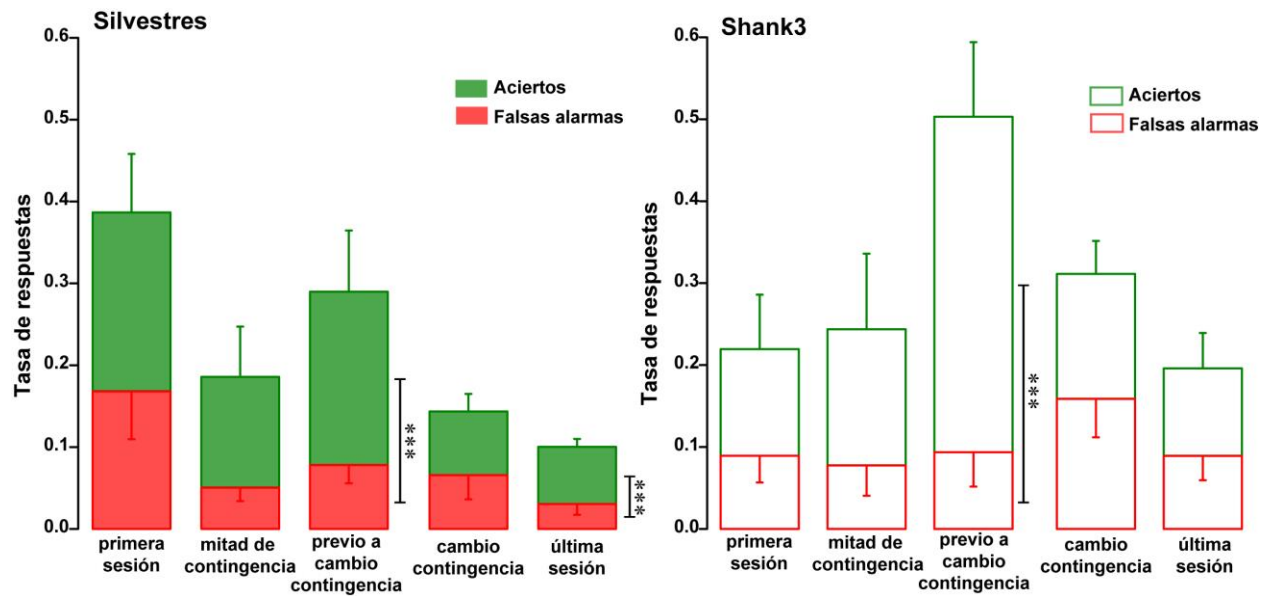


Figura 17. Tasa de Aciertos y Falsas Alarmas para ambos genotipos. Izquierda. Se muestra la tasa de Aciertos y Falsas alarmas para las cinco etapas de aprendizaje en ratones silvestres. **Derecha.** Se muestra la tasa de Aciertos y Falsas alarmas para las cinco etapas de aprendizaje en ratones silvestres. t de Student; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

Con el propósito de evaluar la velocidad de respuesta, se cuantificó los tiempos de reacción ante la aparición de cada uno de los estímulos, en este caso la respuesta fue el primer lengüeteo que se presentó después del inicio del estímulo 1 o del estímulo 2. Para los ratones silvestres no se observaron diferencias entre estímulos para ninguna de las contingencias, sin embargo, se puede notar como en la primera contingencia la latencia de respuesta al estímulo 1 (estímulo que precede a la recompensa en ese momento) es menor que la latencia para el estímulo 2 (Fig. 18a). Para los ratones Shank3 encontramos diferencias significativas en las últimas diez sesiones de la segunda contingencia (promedio tiempos de reacción estímulo 1 = 2148.5 ms y promedio tiempos de reacción estímulo 2 = 2403.1 ms, $t(9) = -2.6412$, $p = 0.0269$) (Fig. 18b). Al comparar entre genotipos notamos que para las últimas diez sesiones de la primera contingencia existen diferencias entre genotipos en los tiempos de reacción correspondientes al estímulo 1 (promedio tiempos de reacción silvestres = 2374 ms y promedio tiempos de reacción Shank3 = 1917.5 ms, $t(9) = 2.4220$, $p = 0.0417$), estas diferencias también se presentaron para las primeras diez sesiones de la segunda contingencia (promedio tiempos de reacción silvestres = 2627.8 ms y promedio tiempos de reacción Shank3 = 2076.4 ms, $t(9) = 4.5210$, $p = 0.0014$) y para las últimas diez sesiones de la segunda contingencia (promedio tiempos de reacción silvestres = 2753.7 ms y promedio tiempos de reacción Shank3 = 2148.5 ms, $t(9) = 4.8816$, $p = 8.6948 \times 10^{-4}$) (Fig. 18c); al comparar entre genotipos los tiempos de reacción correspondientes al estímulo 2 también se encontraron diferencias significativas en las últimas diez sesiones de la primera contingencia (promedio tiempos de reacción silvestres = 2666.4 ms y promedio tiempos de reacción Shank3 = 2453 ms, $t(9) = 5.004$, $p = 0.0010$), las primeras diez sesiones de la segunda contingencia (promedio tiempos de reacción silvestres = 2560.4 ms y promedio tiempos de reacción Shank3 = 2874 ms, $t(9) = 3.9440$, $p = 0.0034$) y las últimas diez sesiones de la segunda contingencia (promedio tiempos de reacción silvestres = 2875.6 ms y promedio tiempos de reacción Shank3 = 2403.1 ms, $t(9) = 6.1893$, $p = 1.6092 \times 10^{-4}$) (Fig. 18d).

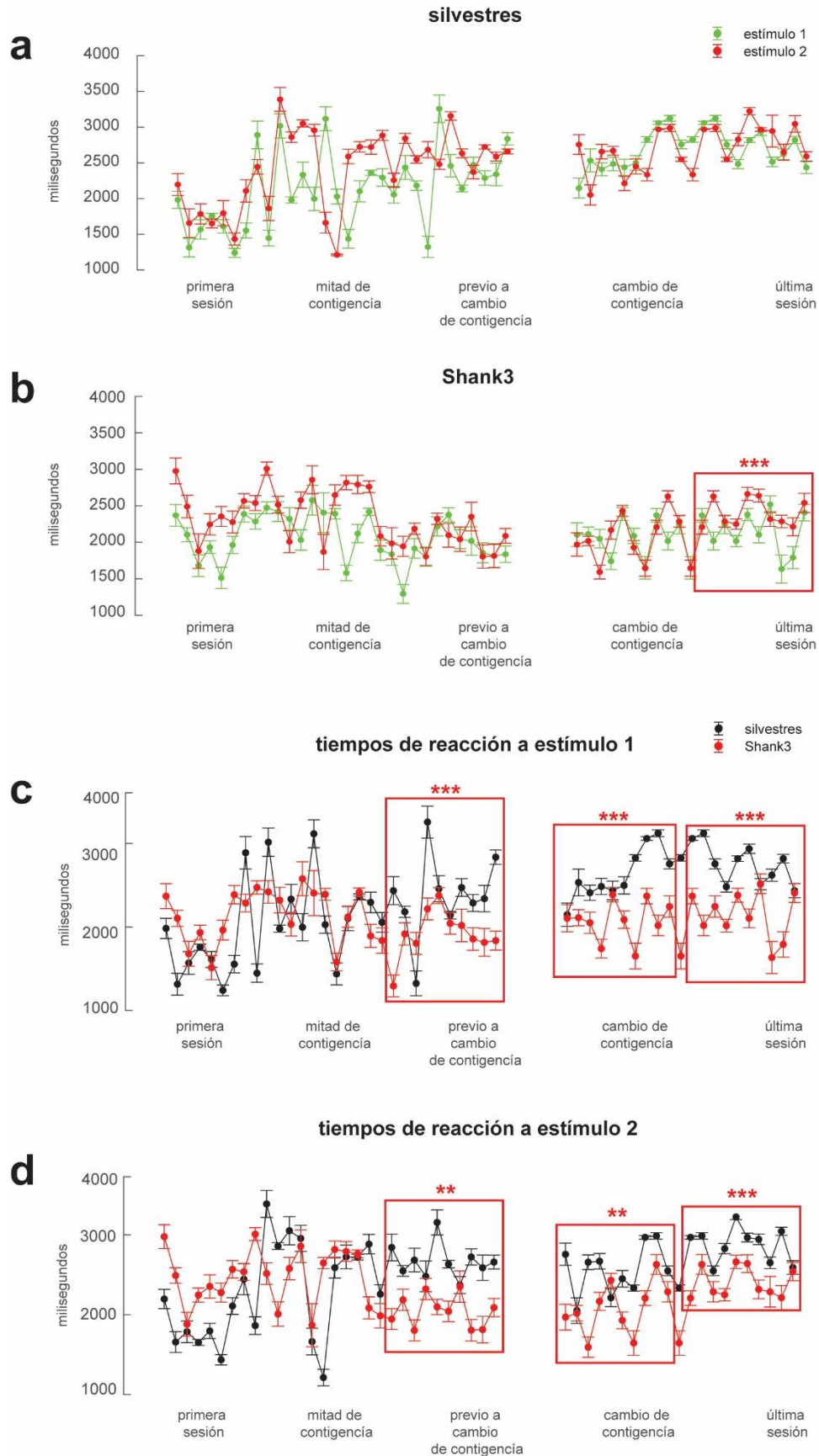


Figura 18. Tiempos de reacción ante los estímulos. a) Promedio poblacional de los tiempos de reacción ante ambos estímulos para ratones silvestres. b) Promedio poblacional de los tiempos de reacción ante ambos estímulos para ratones Shank3; c) Tiempos de reacción al estímulo 1 para ambos genotipos; d) Tiempos de reacción al estímulo 2 para ambos genotipos. t de Student; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

6.2 Modificaciones a la actividad neuronal de V1 como consecuencia del aprendizaje

Actualmente se sabe que la actividad de las neuronas y su coactivación se modifica con el aprendizaje (Khan et al., 2018; Makino & Komiyama, 2015; Poort et al., 2015; Ramesh, Burgess, Sugden, Gyetvan, & Andermann, 2018; Sugden et al., 2020), es por lo que se analizó la dinámica poblacional de las neuronas en el tiempo, es decir, el curso temporal de los ensambles. Para esto primero se identificó a los ensambles neuronales con Stoixeion (Carrillo-Reid et al., 2015), posteriormente se identificaron los cuadros donde el estímulo 1 estuvo presente o donde el estímulo 2 estuvo presente, con esa información se obtuvieron los vectores poblacionales significativos (vectores poblacionales que contuvieran al menos tres neuronas activas) y por medio de Análisis de Componentes Principales se obtuvieron las representaciones tridimensionales (Fig. 19a, b). Para evaluar si las representaciones sufren cambios a lo largo del aprendizaje calculamos la similitud del coseno del ángulo (Carrillo-Reid, Han, Yang, Akrouh, & Yuste, 2019; Carrillo-Reid, Miller, Hamm, Jackson, & Yuste, 2015), que aquí referiremos como índice de similitud (Fig. 15c,d). Analizando las etapas de aprendizaje no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los estímulos en los ratones silvestres (Fig. 19a), en los ratones Shank3 se encontraron diferencias significativas para los índices de similitud del estímulo 2 contra el estímulo 1 en la sesión del cambio de contingencia (mediana estímulo 1 = 0, 75avo percentil estímulo 1 = 0.0707, 25avo percentil estímulo 1 = 0 y mediana estímulo 2 = 0, 75avo percentil estímulo 2 = 0, 25avo percentil estímulo 2 = 0, $t(44123) = 79.7853$, $p = 0$) (Fig. 13b).

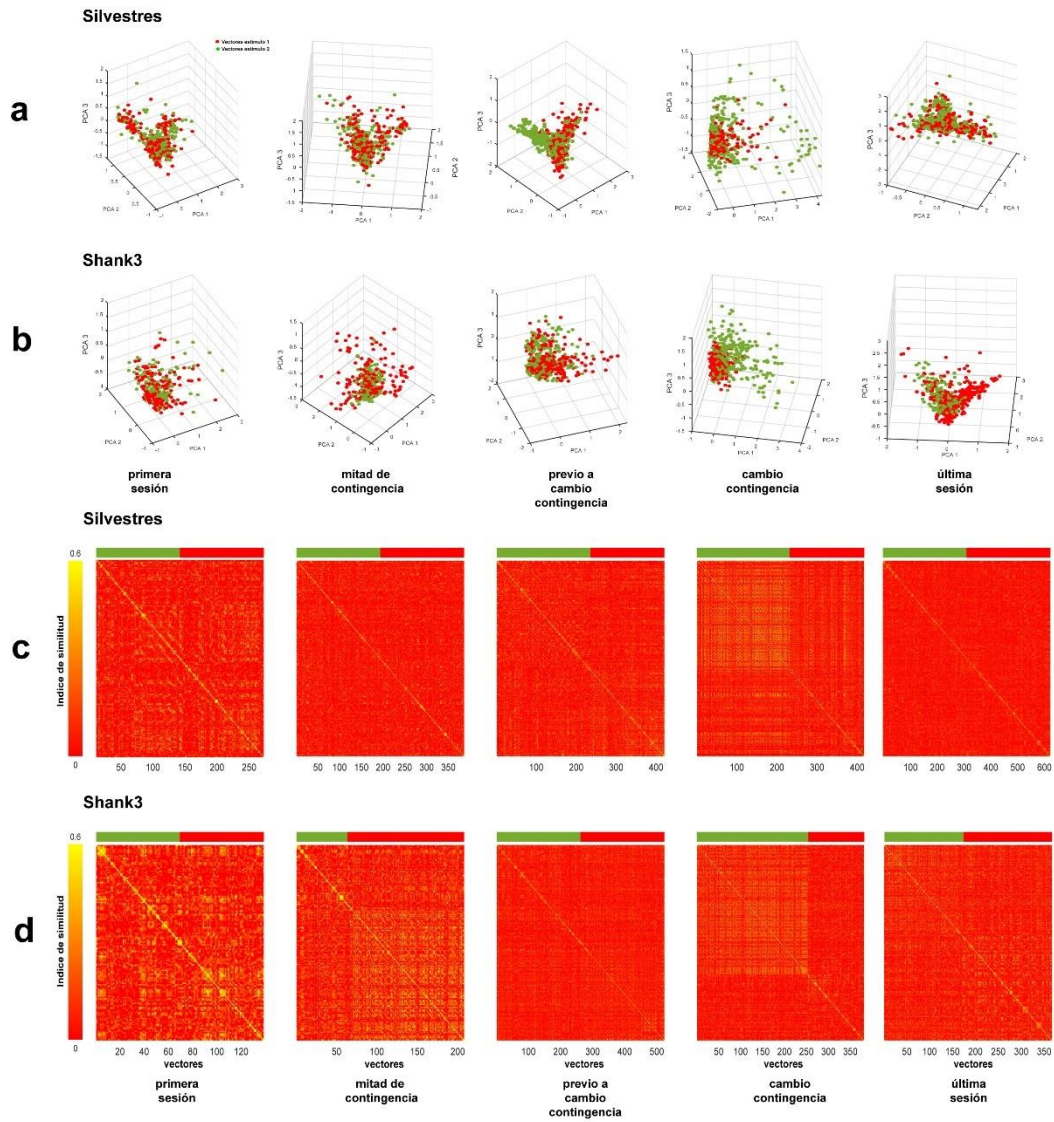


Figura 19. Vectores poblacionales para los estímulos visuales. a, b) Del lado derecho, figuras representativas del análisis de componentes principales de los vectores poblacionales para los estímulos 1 y 2 a lo largo de las cinco sesiones de imagen para un ratón Silvestre y un ratón Shank3. **c, d)** Mapas de similitud representativos para los vectores poblacionales de a y b, las figuras muestran los datos de un ratón Silvestre y un ratón Shank3.

Analizando los datos poblacionales, podemos observar un patrón descendente en los índices de similitud del estímulo 1 para los ratones silvestres en las sesiones de la segunda contingencia, lo mismo sucede para los índices de similitud del estímulo 2 y este comportamiento no se puede observar en los datos de los ratones Shank3 (Fig. 20).

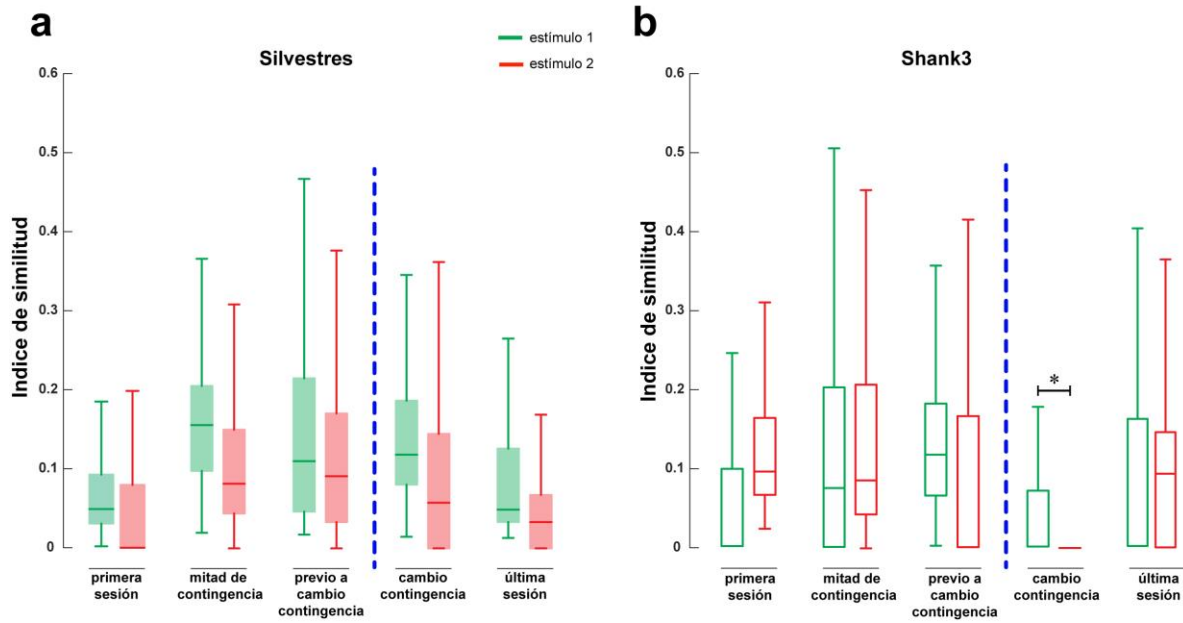


Figura 20. índice de similitud para los estímulos visuales. índice de similitud entre vectores poblacionales para los estímulos 1 y 2 t de Student, * $p < 0.05$. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

6.3 Formación de ensambles neuronales durante el aprendizaje en ratones Shank3

Para estudiar como los ensambles participan en el aprendizaje, decidimos representar la selectividad en términos temporales, pues nos dimos cuenta de que los ensambles podían mostrar actividad apenas se presentaban los estímulos, durante la presentación de éstos o algunos milisegundos después de que hubiera finalizado la presentación del estímulo. Para ello creamos ventanas de 20 cuadros (4 segundos) que comienzan con la presentación de un estímulo y la posible entrega de una recompensa. Con estas marcas temporales se buscaron los cuadros donde hubo actividad de algún ensamble y se cuantificaron estos eventos, catalogados como Aciertos.

También se cuantificó el número de ensambles detectados por ratón y cuál era la proporción de ensambles selectivos en cada ratón, con la información de los ensambles selectivos quisimos evaluar si existía alguna generalidad entre los genotipos, para ello promediamos la selectividad de los ensambles de cada sesión para cada uno de los genotipos. Encontramos que existen diferencias significativas (promedio $_{silvestres} = 4.4$, promedio $_{Shank3} = 6$, prueba de permutaciones = -1.11, $p = 0.00001$) entre genotipos para el número de ensambles encontrados en la mitad de la primera contingencia donde son los ratones Shank3 los que presentan más ensambles (Fig. 21a).

Finalmente, evaluamos la proporción de ensambles selectivos a lo largo del aprendizaje, se encontraron diferencias significativas entre genotipos para la primera sesión (promedio $_{silvestres} = 0.04$, promedio $_{Shank3} = 0.2275$, prueba de permutaciones = -1.30, $p = 0.047990$) y para la mitad de la contingencia 1 (promedio $_{silvestres} = 0.1625$, promedio $_{Shank3} = 0.05$, prueba de permutaciones = 1.14, $p = 0.029520$) (Fig. 21b). Encontramos además que el promedio de ensambles selectivos al estímulo 1 o al estímulo 2 en los ratones silvestres tanto en la primera sesión ($selectividad_{st1} = 0.66$) como en la sesión del cambio de contingencia presentan una alta selectividad a sólo uno de los estímulos ($selectividad_{st2} = 0.62$), también es importante notar que en los ratones Shank3 la selectividad al estímulo 2 es de al menos el doble que la del estímulo 1, de hecho se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar las selectividades entre estímulos para

todas las sesiones en los ratones Shank3 (prueba de permutaciones = -3.92, $p = 0.00001$) (Fig. 21c).

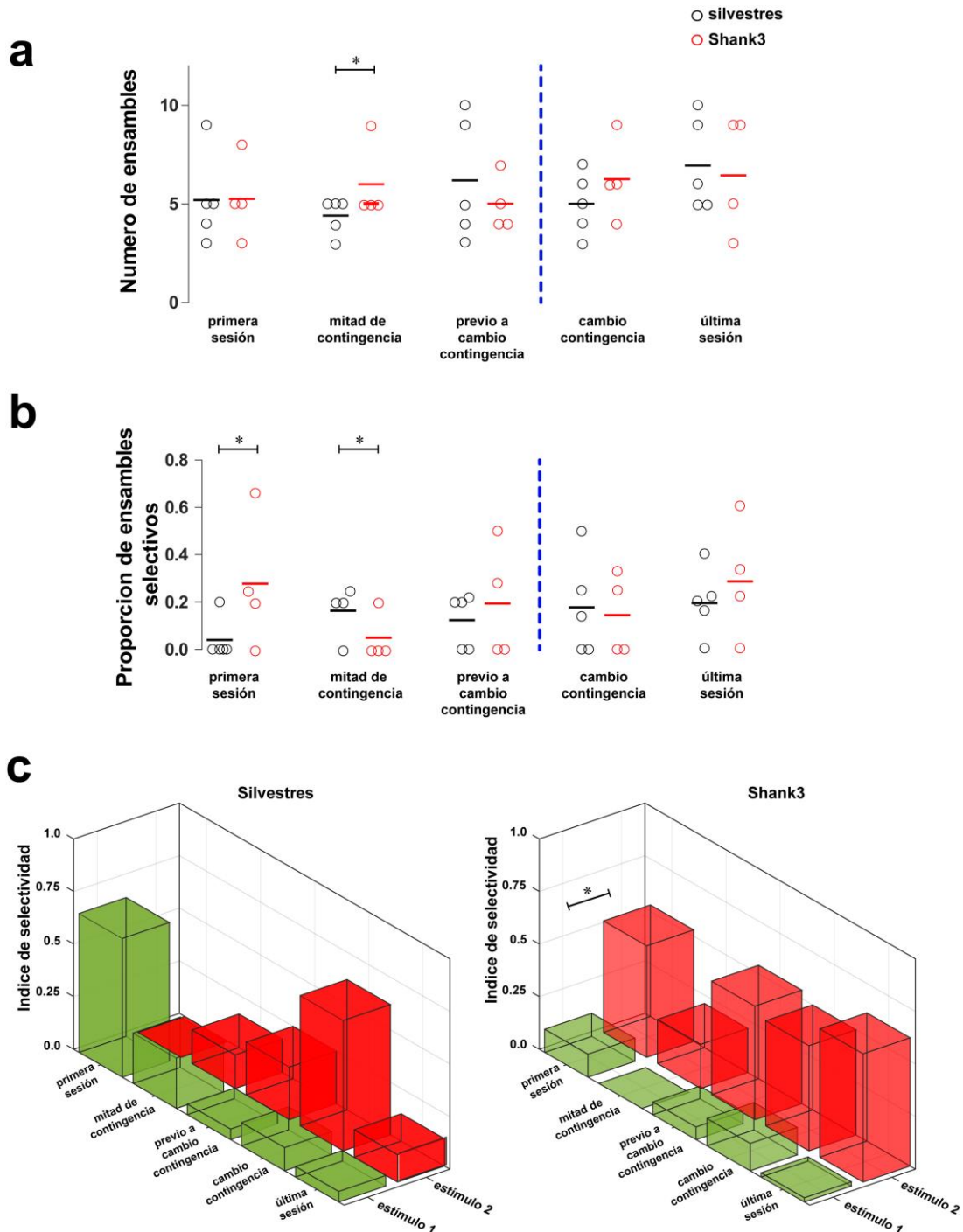


Figura 21. Selectividad en los ensambles neuronales y sus características. a) Número de ensambles selectivos a lo largo de las cinco etapas de aprendizaje para ambos genotipos, prueba de permutaciones, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **b)** Proporción de ensambles selectivos a lo largo de las cinco etapas de aprendizaje, prueba de permutaciones, * $p < 0.05$. **c)** Selectividad promedio de los ensambles en cada sesión para cada genotipo. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

Para entender si estas diferencias en las selectividades y proporciones de ensambles selectivos se debían a modificaciones en la actividad poblacional decidimos calcular si existían diferencias en la activación general de las neuronas registradas. Entonces, en las matrices de actividad binarizada (donde 0 es un cuadro sin espigas inferidas y 1 un cuadro donde existieron al menos 1 espiga inferida), se contaron los cuadros activos para cada ratón en cada una de las sesiones, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 22a). Este mismo análisis se repitió para las matrices donde sólo se agruparon las respuestas de los ensambles y los ensambles selectivos. Al respecto, encontramos diferencias significativas para los ratones silvestres entre la primera sesión y la última sesión de la segunda contingencia, específicamente nos muestra diferencias en el número de cuadros activos (promedio primera sesión = 41.7692, promedio última sesión = 20.4571, ANOVA de 1 vía ($F(2,10) = 5.048$, $p < 0.0001$ y prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$) donde la sesión del final de la contingencia 2 tiene ensambles con menos actividad (Fig. 18b).

Para los ratones Shank3 existen estas diferencias de la última sesión de la segunda contingencia respecto a la primera sesión (promedio primera sesión = 49.6, promedio pre reversal = 21.8, ANOVA de 1 vía ($F(2,10) = 5.048$, $p < 0.0001$ y prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$) y a la sesión del cambio de contingencia (ANOVA de 1 vía ($F(2,10) = 5.048$, $p < 0.0001$ y prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$), en ambos casos se observa que la última sesión de la segunda contingencia tiene un menor número de cuadros activos en sus ensambles (Fig. 22b). Al analizar la cantidad de cuadros activos sólo en los ensambles selectivos, no se observan diferencias significativas (Fig. 22c).

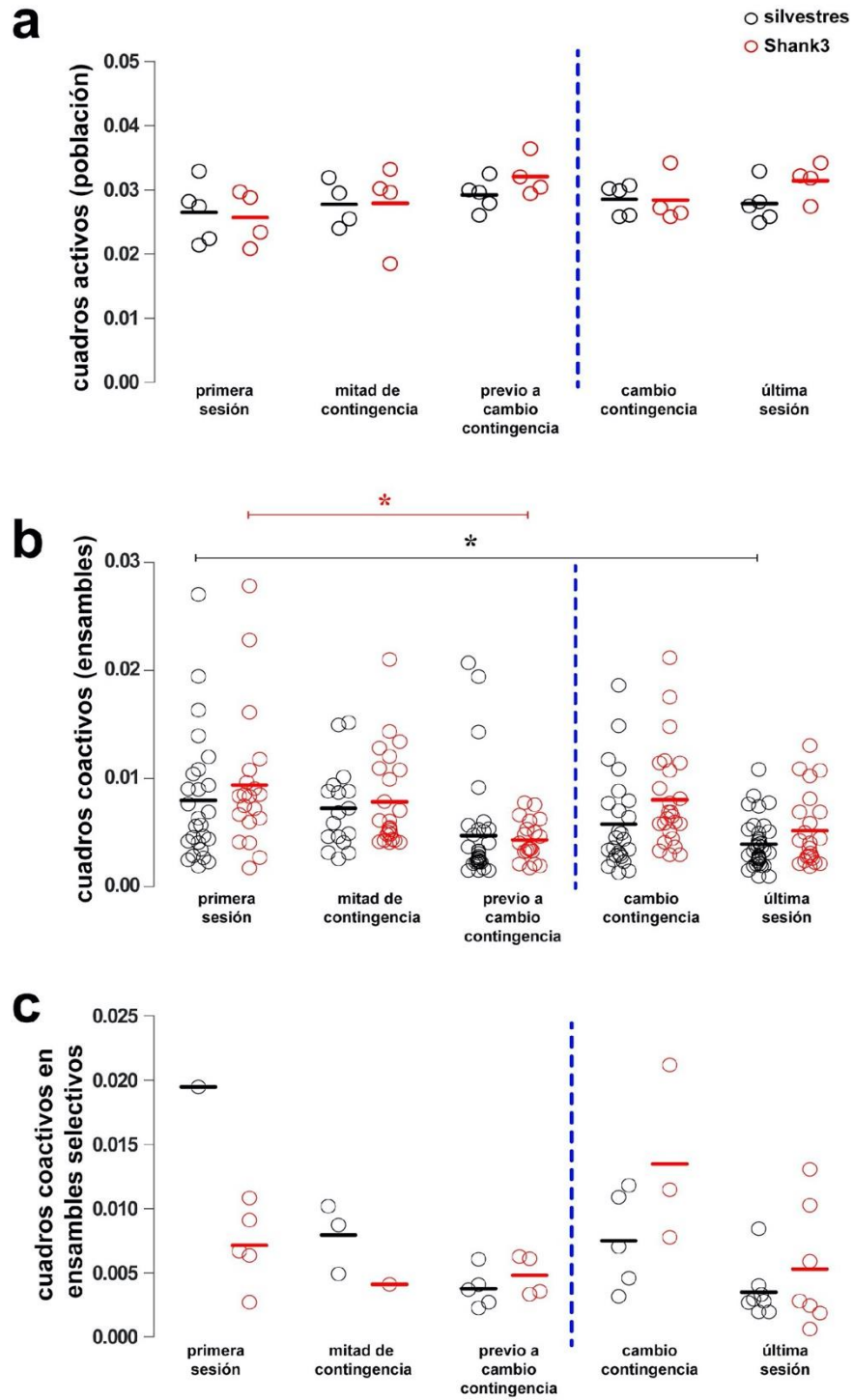


Figura 22. Cuadros activos en las poblaciones neuronales. **a)** Número de cuadros activos para ambos genotipos a lo largo de las cinco sesiones de imagen. **b)** Número de cuadros activos de todos los ensambles para las cinco sesiones de registro, ANOVA de 1 vía y prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **c)** Número de cuadros activos de los ensambles selectivos para cada sesión en ambos genotipos. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

6.4 Alteraciones en el balance entre las vías bottom-up y top-down durante el aprendizaje en los ratones Shank3

Utilizando el Índice de rampa (Makino & Komiyama, 2015) para evaluar los cambios asociados al aprendizaje en las vías top-down y bottom-up en respuesta a las distintas etapas de aprendizaje nos dimos cuenta que para los ratones silvestres solo existían diferencias significativas entre los estímulos 1 y 2 en las etapas de mitad de contingencia (promedio estímulo 1 = 1.105 y promedio estímulo 2 = 1.906, t de Student (174) = -2.1837, p = 0.03) y previo a cambio de contingencia (promedio estímulo 1 = 1.44 y promedio estímulo 2 = 2.449, t de Student (174) = -2.1837, p = 0.03) (Fig. 19). Al evaluar este parámetro en los ratones Shank3 encontramos diferencias significativas entre el estímulo 1 y el estímulo 2 en la primera sesión (promedio estímulo 1 = 1.339 y promedio estímulo 2 = 2.427, t de Student (140) = -2.4688, p = 0.0148), la sesión previa al cambio de contingencia (promedio estímulo 1 = 0.7254 y promedio estímulo 2 = 1.664, t de Student (172) = -2.8715, p = 0.0046), la sesión del cambio de contingencia (promedio estímulo 1 = 0.0880 y promedio estímulo 2 = 1.949, t de Student (132) = -2.7039, p = 2.5221 x 10⁻⁶) y la última sesión (promedio estímulo 1 = 0.5776 y promedio estímulo 2 = 1.898, t de Student (105) = -2.9930, p = 0.0034) (Fig. 23).

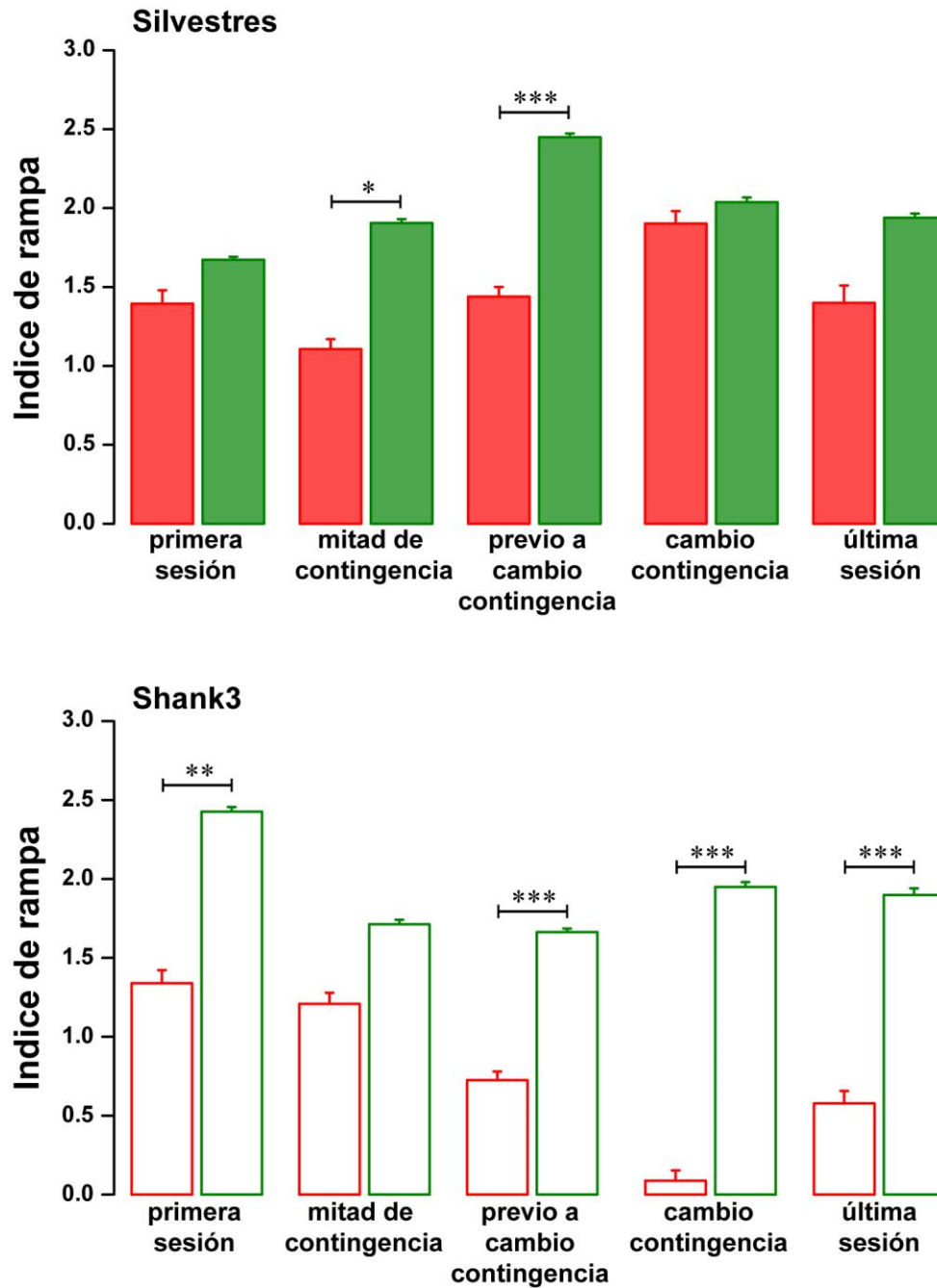


Figura 23. índices de rampa para las neuronas. Arriba, índices de rampa para las neuronas selectivas al estímulo 1 o al estímulo 2 de los ratones silvestres (verde y rojo respectivamente), $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Abajo, índices de rampa para las neuronas selectivas al estímulo 1 o al estímulo 2 de los ratones Shank3 (verde y rojo respectivamente), $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

6.5 Movilidad Inter categórica de las neuronas selectivas a través del aprendizaje

El uso de CellReg nos permitió rastrear de manera eficaz un grupo estable de neuronas a lo largo las 5 sesiones de imagenología (60 días de experimento), siendo un total de 76 neuronas para los ratones silvestres y 96 neuronas para los ratones Shank3. Se utilizó la prueba HSD de Tukey para comparaciones múltiples de proporciones. Para las proporciones de neuronas selectivas en la sesión 20, se encontraron diferencias significativas entre genotipos para las comparaciones entre neuronas selectivas al estímulo 2 de ratones silvestres y neuronas selectivas al estímulo 1 de ratones Shank3 ($k(10) = 16.20$, $p < 0.05$), neuronas selectivas al estímulo 1 de ratones silvestres y neuronas selectivas al estímulo 2 de ratones Shank3 ($k(10) = 17.72$, $p < 0.05$), neuronas selectivas al estímulo 1 de ratones silvestres y neuronas no selectivas de ratones Shank3 ($k(10) = 26.27$, $p < 0.05$) y para neuronas selectivas a la recompensa de ratones silvestres y neuronas no selectivas de ratones Shank3 ($k(10) = 15.37$, $p < 0.05$). Respecto a las proporciones formadas de la sesión 40 se encontraron diferencias entre genotipos para las comparaciones entre neuronas selectivas al estímulo 1 de ratones silvestres y las neuronas no selectivas de los ratones Shank3 ($k(10) = 19.03$, $p < 0.05$), entre neuronas no selectivas de ratones silvestres y las neuronas selectivas al estímulo 1 de los ratones Shank3 ($k(10) = 23.37$, $p < 0.05$) y finalmente entre no selectivas de ratones silvestres y las neuronas selectivas a la recompensa de los ratones Shank3 ($k(10) = 18.58$, $p < 0.05$). Respecto a las proporciones formadas de la sesión 41 se encontraron diferencias entre genotipos para las comparaciones entre neuronas selectivas al estímulo 1 de ratones silvestres y neuronas selectivas al estímulo 2 de ratones Shank3 ($k(10) = 16.14$, $p < 0.05$), entre neuronas selectivas al estímulo 1 de ratones silvestres y neuronas no selectivas de ratones Shank3 ($k(10) = 24.08$, $p < 0.05$), entre neuronas selectivas a la pantalla blanca de cada genotipo ($k(10) = 19.90$, $p < 0.05$), entre neuronas selectivas a la recompensa de ratones silvestres y neuronas no selectivas de los ratones Shank3 ($k(10) = 19.90$, $p < 0.05$), entre neuronas no selectivas de ratones silvestres y neuronas selectivas al estímulo 1 de los ratones Shank3 ($k(10) = 26.67$, $p < 0.05$) y para neuronas no selectivas de ratones silvestres respecto a neuronas selectivas a la recompensa de ratones Shank3 ($k(10) = 18.82$, $p < 0.05$). Para las proporciones formadas durante la sesión 60 se encontraron diferencias entre genotipos para las neuronas selectivas al estímulo 2 de los ratones silvestres y las neuronas selectivas al estímulo 1

de los ratones Shank3 ($k(10) = 13.99$, $p < 0.05$), para las neuronas selectivas al estímulo 2 de los ratones silvestres y las neuronas no selectivas de los ratones Shank3 ($k(10) = 17$, $p < 0.05$), las neuronas selectivas al estímulo 1 de los ratones silvestres y las neuronas no selectivas de los ratones Shank3 ($k(10) = 25.45$, $p < 0.05$), las neuronas selectivas a la recompensa de los ratones silvestres y las neuronas no selectivas de los ratones Shank3 ($k(10) = 28.25$, $p < 0.05$), las neuronas no selectivas de los ratones silvestres y las neuronas selectivas al estímulo 1 de los ratones Shank3 ($k(10) = 16.02$, $p < 0.05$) y finalmente las neuronas no selectivas en ambos genotipos ($k(10) = 14.97$, $p < 0.05$) (Fig. 244).

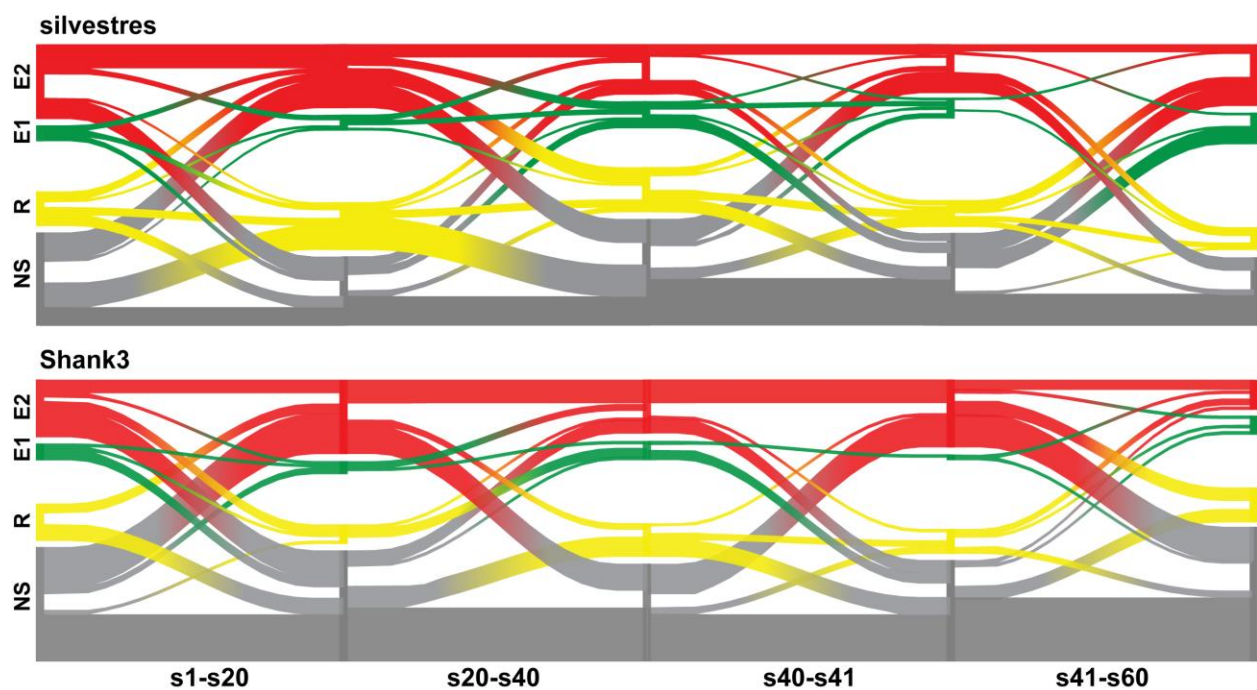


Figura 244. Cambios de categoría de las neuronas selectivas a través del aprendizaje. Arriba, de izquierda a derecha se muestran los grupos de neuronas selectivas, organizadas por código de color y unidas por medio de líneas, para los ratones silvestres. Abajo, de izquierda a derecha se muestran los grupos de neuronas selectivas, organizadas por código de color y unidas por medio de líneas, para los ratones Shank3. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

6.6 Alteración de las interacciones entre neuronas selectivas y no selectivas en los cambios de contingencia para ratones Shank3

Utilizando métodos de la doctrina neuronal se calcularon las selectividades ante los distintos componentes de la tarea (estímulo 1, estímulo 2 y recompensa) para las distintas poblaciones de neuronas (Fig. 25).

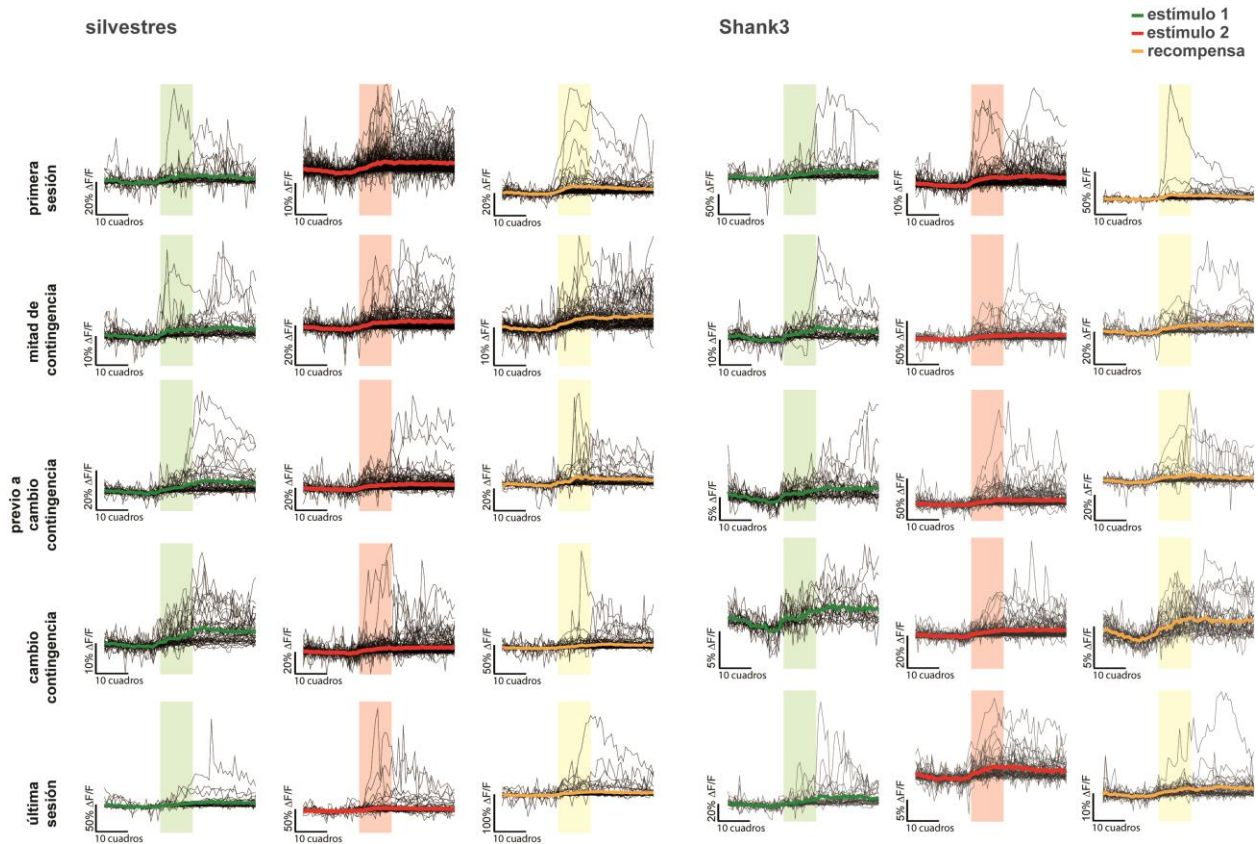


Figura 25. Identificación de neuronas selectivas a los componentes de la tarea. Para cada una de las sesiones y para cada uno de los tres eventos se muestran los grupos de neuronas selectivas a cada uno de esos componentes (en negro), alineados respecto al inicio del evento y con su promedio (en color). Del lado izquierdo se presentan las respuestas en los ratones silvestres y del lado derecho las respuestas en los ratones Shank3.

También se utilizaron los métodos de rastreo de neuronas en distintas sesiones de imagen para identificar una subpoblación de neuronas y como cambiaron sus selectividades a lo largo del aprendizaje. Analizando la totalidad de neuronas registradas para ambos genotipos y a lo largo de las cinco etapas de aprendizaje no observamos diferencias significativas atribuibles a las etapas de aprendizaje o al genotipo (Fig. 26a); la proporción de neuronas selectivas y que forman parte de un ensamble junto con la proporción de neuronas no selectivas que también forme parte de algún ensamble no muestran diferencias significativas atribuibles a las etapas de aprendizaje o al genotipo (Fig. 26b).

Además, cuantificamos la proporción de neuronas selectivas y no selectivas en todas las sesiones, observamos diferencias significativas para los ratones silvestres (promedio $_{\text{selectivas}} = 79$ y promedio $_{\text{no selectivas}} = 34$, $H(4) = 30$, $P < 0.0001$ y prueba post hoc de Dunn, $p < 0.0001$) y para los ratones Shank3 (promedio $_{\text{selectivas}} = 72$ y promedio $_{\text{no selectivas}} = 41$, $H(4) = 30$, $P < 0.0001$ y prueba post hoc de Dunn, $p < 0.0001$) (Fig. 26c). Al respecto, podemos decir que sin importar el genotipo existe una población más grande de neuronas selectivas.

Posteriormente identificamos a los grupos de neuronas que podemos afirmar son las mismas dentro de todas las sesiones de registro, al evaluar si mantenían su estatus de neuronas selectivas o si perdían esa selectividad nos dimos cuenta de que existen diferencias significativas (promedio $_{\text{selectiva a selectiva}} = 0.3125$ y promedio $_{\text{selectiva a no selectiva}} = 0.70$, $U = 0$, $p = 0.0143$) para los ratones silvestres y para los ratones Shank3 (promedio $_{\text{selectiva a selectiva}} = 0.29$ y promedio $_{\text{selectiva a no selectiva}} = 0.73$, $U = 0$, $p = 0.0143$), en ambos casos observamos una mayor proporción de neuronas que pierden su selectividad (Fig. 21d). Entre sesiones, la proporción de neuronas que preservan su selectividad o que cambian su selectividad se mantiene estable independiente de las etapas de aprendizaje o del genotipo pues no se encontraron diferencias significativas atribuibles a alguna manipulación experimental (Fig. 26e).

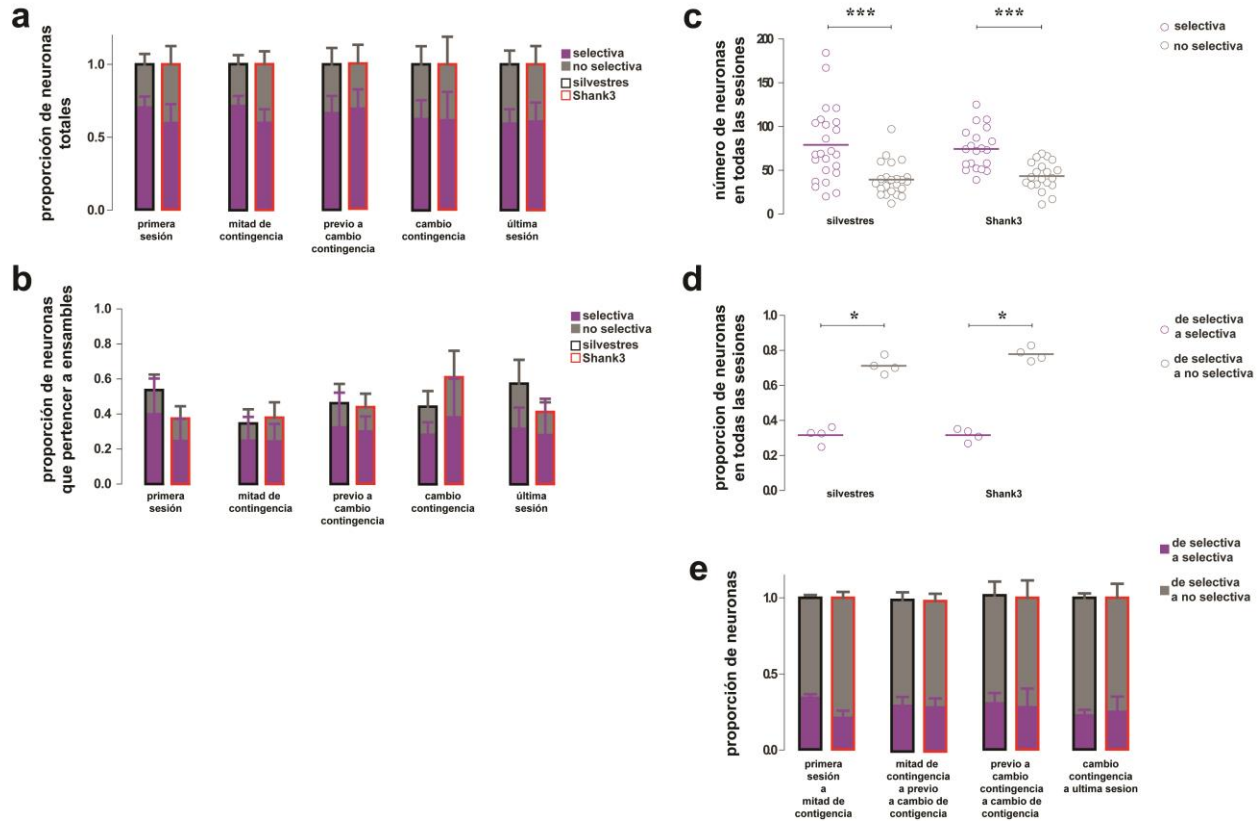


Figura 26. Pérdida de selectividad y aprendizaje. **a)** Proporción de neuronas selectivas totales y no selectivas totales (en morado y gris respectivamente) para ambos genotipos (marco negro para ratones silvestres y marco rojo para ratones Shank3) en las cinco sesiones de registro. **b)** Proporción de neuronas selectivas y no selectivas que pertenecen a algún ensamble (en morado y gris respectivamente). **c)** Número de neuronas selectivas y no selectivas (morado y gris respectivamente) en todas las sesiones de imagen, prueba de Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn, $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n_{\text{selectivas silvestres}} = 24$, $n_{\text{no selectivas silvestres}} = 24$, $n_{\text{selectivas Shank3}} = 20$ y $n_{\text{no selectivas Shank3}} = 20$). **d)** Proporción de neuronas que mantienen su selectividad y neuronas que pierden su selectividad (morado y gris respectivamente) en todas las sesiones de imagen, prueba de Mann-Whitney, $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n_{\text{selectiva a selectiva silvestres}} = 4$, $n_{\text{selectiva a no selectivas silvestres}} = 4$, $n_{\text{selectiva a selectiva Shank3}} = 4$ y $n_{\text{selectiva a no selectivas Shank3}} = 4$). **e)** Proporción de neuronas que de sesión a sesión mantienen su selectividad o pierden su selectividad para ambos genotipos.

Decidimos investigar que sucedía con las neuronas antes clasificadas como no selectivas pues perder la selectividad parecía un fenómeno muy constante, esto nos llevó a definir la categoría de neurona semi selectiva basados en la fiabilidad de las respuestas ante los ensayos iniciados por un estímulo particular.

No se encontraron diferencias significativas atribuibles a alguna manipulación experimental cuando se cuantificaron y sumaron las proporciones de neuronas selectivas y de neuronas semi selectivas de la población total (Fig 27a); al solo cuantificar las proporciones de neuronas semi selectivas en la población total no muestra diferencias significativas atribuibles a alguna manipulación experimental (Fig. 27b). Las proporciones sumadas de neuronas selectivas y de neuronas semi selectivas que pertenecen a algún ensamble tampoco muestran diferencias significativas atribuibles a alguna manipulación experimental (Fig. 27c). La subpoblación de neuronas que son semi selectivas y pertenecen a algún ensamble muestra diferencias entre genotipos en la última sesión de la segunda contingencia, específicamente cuando se comparan las proporciones de neuronas semi selectivas al estímulo 2 (promedio semi selectivas silvestres = 0.43 y promedio semi selectivas Shank3 = 0.32, prueba de permutaciones = 2.71, $p = 0.00001$) pues en los ratones Shank3 existe una menor proporción de estas neuronas (Fig. 27d). Estos datos sugieren que la participación conjunta de las neuronas semi selectivas que pertenecen a algún ensamble podría ser necesaria para entender el cambio de una regla.

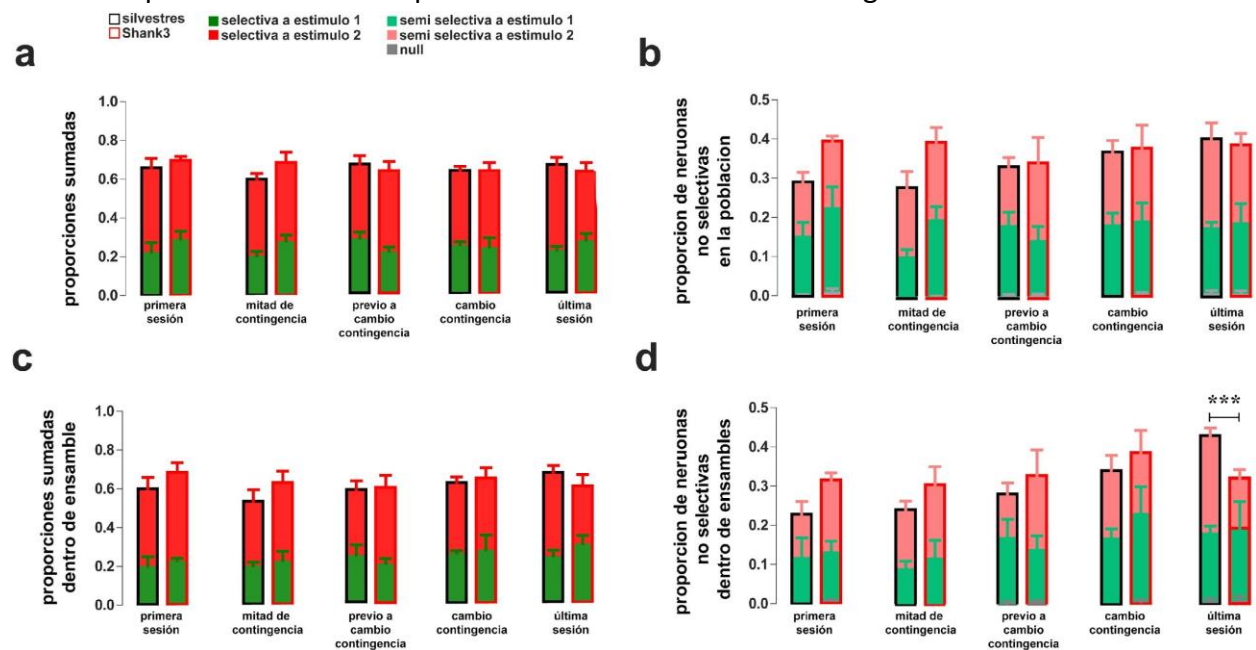


Figura 27. Proporciones de neuronas semi selectivas y su interacción con las neuronas selectivas a lo largo del aprendizaje. a) Proporción de neuronas semi selectivas al estímulo 1, semi selectivas al estímulo 2 o null (en verde, rosa y gris respectivamente) para ambos genotipos (marco negro para ratones silvestres y marco rojo para ratones Shank3) en las cinco sesiones de registro. **b)** Proporción de neuronas selectivas al estímulo 1 y selectivas al estímulo 2 (en verde y rojo respectivamente). **c)** Proporción de neuronas semi selectivas al estímulo 1, semi selectivas al estímulo 2 o null que pertenecen a algún ensamble para ambos genotipos en las cinco sesiones de registro, prueba de permutaciones, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **d)** Proporción de neuronas selectivas al estímulo 1 y selectivas al estímulo 2 (en verde y rojo respectivamente) que pertenecen a algún ensamble. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

6.7 La interacción entre neuronas selectivas y semi selectivas es importante para la generación de conductas adaptativas

Finalmente nos preguntamos si la capacidad de los ensambles de seguir los ensayos se modificaba como consecuencia de las etapas de aprendizaje, eso nos llevó a calcular la fiabilidad de los ensambles selectivos a lo largo del aprendizaje para ambos genotipos, encontramos que la mayoría de los registros caían dentro de los cuatro casos mostrados a continuación. Para todos los gráficos el primer panel contiene un arreglo donde hay tantas filas como número de neuronas y tantas columnas como número de cuadros donde se presentó un estímulo específico, las celdas blancas representan a neuronas activas y las celdas negras a neuronas inactivas (Fig. 28a). El segundo panel tiene tantas columnas como número de cuadros donde se presentó el estímulo, una columna blanca significa que al menos una de las neuronas semi selectivas respondió en ese tiempo, una celda negra significa que ninguna neurona semi selectiva respondió (Fig. 28b). El tercer panel tiene la misma configuración en cuanto a columnas, pero esta vez las columnas blancas representan ensambles activos en ese periodo de tiempo y las negras ensambles inactivos para ese periodo específico (Fig. 23c). El cuarto panel tiene la misma configuración que el anterior solo que las columnas blancas significan que al menos una neurona semi selectiva o el ensamble estuvieron activos, una columna negra significa que ninguna neurona o ensamble estuvieron activos (Fig. 28d).

Observamos diferencias significativas entre genotipos para la sesión previa al cambio de contingencia (promedio $_{silvestres} = 0.0487$ y promedio $_{Shank3} = 0.3885$, prueba de permutaciones = -2.48 , $p = 0.00001$) y la sesión del cambio en la contingencia (promedio $_{silvestres} = 0.2334$ y promedio $_{Shank3} = 0.8727$, prueba de permutaciones = -3.71 , $p = 0.00001$), en ambos casos los ensambles selectivos Shank3 tenían una fiabilidad mayor que las de los ensambles selectivos silvestres (Fig 23a). Este mismo análisis se utilizó para preguntar la fiabilidad de cada una de las neuronas semi selectivas con el razonamiento de que podrían estar emitiendo respuestas cuando en ensamble falla. a lo largo de las etapas de aprendizaje y para ambos genotipos, no se encontraron diferencias significativas atribuibles a alguna manipulación experimental (Fig. 28b), vale la pena notar que la fiabilidad de las neuronas semi selectivas silvestres es del 100% en las

últimas tres sesiones de registro, a pesar de eso. La suma de fiabilidades de los ensambles selectivos con la de las neuronas semi selectivas no mostro diferencias significativas (Fig. 28c), es importante notar que en la sesión previa al cambio de contingencia la fiabilidad sumada de los ratones Shank3 no alcanza el 100% a pesar de una fiabilidad alta por parte de los ensambles cuando pareciera que la fiabilidad silvestre viene mayormente de las neuronas semi selectivas, lo mismo sucede para la última sesión de la segunda contingencia.

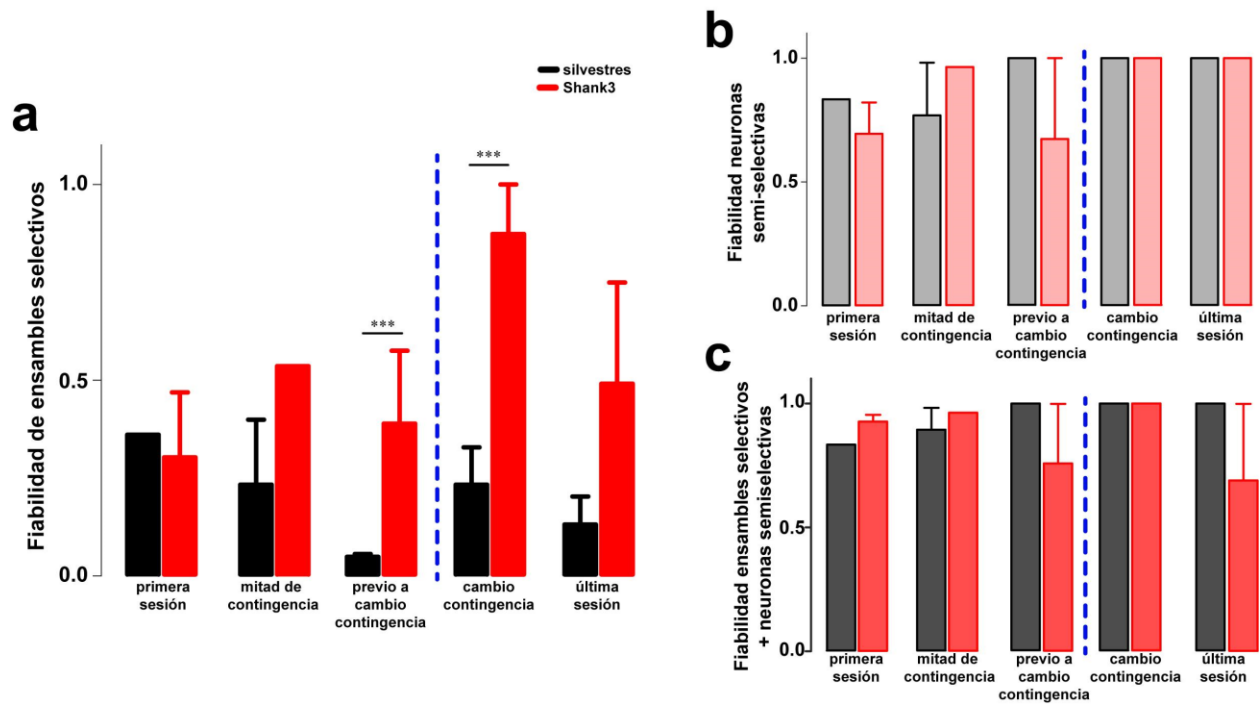


Figura 28. Fiabilidad de los ensambles neuronales y las neuronas semi selectivas. a) Fiabilidad de los ensambles selectivos para ambos genotipos a lo largo de las sesiones de registro, prueba de permutaciones, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. b) Fiabilidad de las neuronas semi selectivas. c) Fiabilidad de las neuronas semi selectivas más fiabilidad de los ensambles selectivos. Silvestres $n = 4$ y Shank3 $n = 5$.

7. Discusión

El diagnóstico del TEA (Trastorno del Espectro Autista) contempla tres síntomas como los pilares fundamentales para la clasificación de un paciente, deficiencias en la comunicación, en la interacción y la presencia de conductas repetitivas o estereotipadas (American Psychiatric Association, 2013). En los últimos años se ha añadido la presencia de alteraciones en la percepción, aun con este último criterio se ha relegado la presencia de alteraciones en el aprendizaje (Mercado III, Chow, Church, & Lopata, 2020). Aun así, existen reportes donde el aprendizaje por condicionamiento clásico u operante es deficiente (Crawley et al., 2020), la memoria episódica deficiente (Lind, Williams, Bowler, & Peel, 2014; Toichi & Kamio, 2003), el aprendizaje sensorio-motor está afectado (Foster et al., 2020; Wu, José, Nurnberger, & Torres, 2018) y el aprendizaje perceptual muestra alteraciones como la sobre-especificidad del aprendizaje (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). Es congruente pensar que, si la percepción y la interpretación posterior se encuentran alteradas, entonces también lo estarán la codificación y el almacenamiento de información relacionada; esto no sólo causaría deficiencias en el entendimiento de las contingencias del medio sino hasta la presencia de conductas mal adaptativas derivadas de todo lo anterior. La investigación biomédica actual ha mostrado un interés creciente en la búsqueda de genes candidatos para las causas del autismo o en soluciones paliativas que no necesariamente atienden la neurobiología del fenómeno, el propósito de este proyecto fue determinar si existen eslabones claros entre las anomalías genéticas (asociadas al TEA) y el aprendizaje, entendiendo estos eslabones como procesos neurológicos básicos (plasticidad sináptica y formación de ensamblajes neuronales, el sustrato fisiológico de la percepción).

En este proyecto utilizando un modelo genético de autismo observamos diferencias en la capacidad de discriminar estímulos visuales ante el aprendizaje reverso en ratones Shank3 respecto a ratones silvestres. Lo primero que podemos observar es que las pendientes de aprendizaje en la primera contingencia son mayores en los ratones Shank3 respecto a los ratones silvestres, lo cual sugiere que los ratones Shank3 aprenden casi el doble de rápido que los ratones silvestres y que podrían generar una representación de mayor calidad y en menos tiempo, fenómeno antes observado en pacientes con TEA (Sears, Finn, & Steinmetz, 1994); además se

observa como los puntajes de d' difieren entre genotipos en la segunda contingencia, lo cual no solo nos habla de diferencias en la adaptación ante nuevas reglas en el entorno sino de posibles deficiencias en la actualización de la memoria, entendiendo memoria como un conjunto de patrones neuronales que preservan información relevante para el pasado y así guían la conducta (Mau, Hasselmo, & Cai, 2020).

Un análisis más detallado mostró que la capacidad de discriminar entre dos estímulos es diferente entre genotipos sólo a partir de la sesión 25. Por experimentos previos sabemos que los ratones tardan alrededor de 20 sesiones en alcanzar un d' aceptable (por arriba de 0.6) y que sucede de la misma forma para ambos genotipos, estos datos sugieren que las diferencias entre genotipos sólo surgen cuando al sistema se le presenta información por periodos más largos de tiempo (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). Además, la incapacidad de los ratones Shank3 de elevar su d' en la segunda contingencia, cuando los ratones silvestres ya lo habían logrado, sugiere diferencias en la capacidad de entender el cambio o bien, diferencias en la capacidad del sistema para modificar la representación existente. En este trabajo decidimos apoyar la segunda hipótesis de tal forma que la sobre-especificidad del aprendizaje presentada en la segunda contingencia sería una consecuencia directa de los problemas de plasticidad y neurotransmisión glutamatérgica de los ratones Shank3.

Al analizar el d' podemos darnos cuenta de que el origen de un puntaje bajo en los ratones Shank3 es consecuencia de cometer el mismo nivel de Falsas Alarmas que de Aciertos, y sus correspondientes recíprocos como son Omisiones y Rechazos Correctos, cuando los ratones silvestres logran elevar su tasa de Aciertos y Rechazos Correctos en los últimos cinco días previos a que termine la segunda contingencia. También encontramos que la diferencia entre Aciertos vs Falsas Alarmas y Rechazos Correctos vs Omisiones es más marcada en los ratones Shank3 que en los Silvestres cuando se encuentran en la primera contingencia, lo cual sugiere que podría existir una huella mnémica de la relación estímulo-recompensa más grande y que biológicamente la representación de esta información se encuentre consolidada de una mejor forma o que no pueda ser remodelada eficientemente (Alberini & LeDoux, 2013; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 2017; Mau et al., 2020). Además, la ausencia de una alta tasa de Falsas Alarmas en la segunda contingencia sugiere disonancia cognitiva en los sujetos. Los tiempos de reacción menores para

los ratones Shank3 en las últimas 10 sesiones de la primera contingencia nos sugieren que ante una memoria más estable se requiere menos información para emitir una respuesta, por lo contrario, su nulo cambio en los tiempos de reacción durante la segunda contingencia sugiere una respuesta persistente derivada de fallas en la actualización de la memoria. Al menos hasta este momento podemos decir que existen diferencias generales (el d') y particulares (pendientes de la curva de aprendizaje, tiempos de reacción y respuestas clasificatorias) en el aprendizaje reverso de los ratones SHANK3, además de que esas diferencias son notorias en cuanto se exige responder ante un cambio de regla en el medio, esto nos lleva a verificar la existencia de sobre-especificidad del aprendizaje en un modelo genético de autismo.

Existe información acerca de que en el TEA la actividad neuronal de se encuentra alterada, especialmente aquella correspondiente al sistema visual (Ellis, Milne, & Levita, 2021; Noel, Zhang, Stocker, & Angelaki, 2021; Shafai, Armstrong, Iarocci, & Oruc, 2015; S. Wang et al., 2015), incluso en fenómenos como la regulación multi modal (Hattori, Südhof, Yamakawa, & Hensch, 2017; Jao Keehn et al., 2017) y aprendizaje perceptual (Harris et al., 2015; Harris et al., 2016). En el Síndrome de Phelan-McDermid se identificaron deficiencias en la transmisión glutamatérgica basal mediada por los receptores AMPA (Bozdagi et al., 2010; Harony-Nicolas, De Rubeis, Kolevzon, & Buxbaum, 2015), lo cual tiene como consecuencia deficiencias en la LTP (pero no la LTD), crecimiento transitorio de las espinas dendríticas, mayor densidad de espinas dendríticas y mayor presencia de espinas inmaduras. Este conjunto de observaciones sugiere que existen patrones alterados de actividad que podrían traducirse a la formación de estructuras anómalas para la codificación de la información y que muchos de los procesos que permanecen "intactos" son consecuencia de compensaciones que el sistema tiene que hacer para mantenerse con vida.

La teoría de los microcircuitos neuronales define a los grupos de neuronas como los principales elementos involucrados en la codificación de información sensorial, programas motores y estados cognitivos (Carrillo-Reid & Yuste, 2020). >También postula que fenómenos de plasticidad sináptica como la depresión sináptica de corto plazo y la facilitación sináptica de corto plazo son responsables de las activaciones sincrónicas de grupos de neuronas y de las activaciones secuenciales de ensambles (Carrillo-Reid & Yuste, 2020; Carrillo-Reid et al., 2015). En un organismo sin alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica las neuronas que

codifiquen características de un mismo estímulo deberían agruparse para formar un ensamble neuronal (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid, Yang, Bando, Peterka, & Yuste, 2016; Li, Liu, & Tsien, 2016; Ramesh et al., 2018; Sugden et al., 2020) y al momento de re aprender deberían existir mecanismos que modificaran las conexiones de las neuronas que ya no interactúan con el resto (Carrillo-Reid et al., 2019; Mau et al., 2020; Sugden et al., 2020). Nosotros encontramos que solo en la sesión del cambio de contingencia, en los ratones SHANK3 se observa una separación clara de vectores poblacionales que codifican para cuadros donde aparecieron los componentes clave de la tarea y este fenómeno se refleja en los índices de similitud de esta misma sesión para los ratones Shank3.

A pesar de eso los ensambles selectivos para el estímulo 2 en los ratones Shank3 son al menos el doble de selectivos que los ensambles codificantes para el estímulo 1, lo que nos indica que el sistema parece fijar sus recursos en la detección de un estímulo que durante la adquisición de la tarea tuvo consecuencias no favorables para los sujetos; esta es una estrategia común en los seres vivos como método de autopreservación pues la identificación de un estímulo que predice una consecuencia desfavorable incrementa la probabilidad de supervivencia del sujeto, incluso más que identificar estímulos con consecuencias favorables (Lazarus, 2021; Norris, 2021; Williams et al., 2009). En los ratones silvestres no se observó este fenómeno, de hecho, se puede notar como la selectividad es alta al inicio de ambas contingencias pero que disminuye conforme avanzan las sesiones, lo cual se podría atribuir a que, con el paso del tiempo, el peso de ese estímulo decrece para dar paso a la formación de otras representaciones (Grewe et al., 2017; Makino & Komiyama, 2015; Sugden et al., 2020).

Identificar las neuronas selectivas a ciertos componentes de la tarea nos permite evaluar cómo el sistema codifica información concerniente a procesos relevantes para la tarea, evaluar su índice de rampa también nos proporciona información acerca de las entradas de información bottom-up (vía receptores-tálamo-capas 2 y 3 de V1) o top-down (vía otras cortezas-capas 1 de V1) y por ende de la participación de estructuras como la Corteza Retroespleneal. En este trabajo nos dimos cuenta de que para los ratones silvestres existe una progresión en cómo el índice de rampa para el estímulo 1 crece y se diferencia del estímulo 2 mientras se aprende la primera contingencia, además de que, al ocurrir este cambio de contingencia, esas diferencias

desaparecen. Para los ratones Shank3 nos dimos cuenta de que desde la primera sesión existen diferencias significativas entre los índices de rampa y que esta diferencia se mantiene para todas las sesiones excepto la de la mitad de contingencia. Es importante recordar que un índice de rampa alto indica que la información viene desde la Corteza Retroesplinal y que un índice de rampa bajo hace referencia a información proveniente solo de la vía visual (Makino & Komiyama, 2015). En los ratones silvestres podemos ver como la señal correspondiente al estímulo 1 comienza a tener un índice de rampa más alto, presumiblemente porque esa información proviene de la Corteza Retroesplinal, mientras la capacidad de discriminar los estímulos incrementa en estos ratones; en los ratones Shank3 observamos como ese índice de rampa para el estímulo 1 tiene valores positivos y se mantiene así para 4 de 5 etapas de aprendizaje, lo que sugiere que la información migra a la Corteza Retroesplinal desde etapas muy tempranas y que nunca sucede un proceso opuesto, especialmente como respuesta al cambio de contingencia. Estos resultados reafirman la ausencia de procesos neuronales dinámicos congruentes con el aprendizaje en los ratones Shank3. Al evaluar la selectividad de neuronas registradas nos dimos cuenta de que las proporciones de neuronas selectivas y no selectivas se encontraban balanceadas y que este era un fenómeno estable entre genotipos y a lo largo de las sesiones. Al evaluar la proporción de neuronas registradas que se integran a los ensambles notamos que tampoco existen variaciones a lo largo de las sesiones, ni al comparar los grupos, esto sugiere que los mecanismos de reclutamiento de neuronas no se encuentran afectados (Khan et al., 2018; Poort et al., 2015). Sin embargo no encontramos que dentro de los ensambles existieran estadísticamente más neuronas selectivas o no selectivas en alguna sesión o en algún genotipo particular y que solo cerca del 50% de neuronas registradas pertenecían a algún ensamble, todo esto a pesar de que en total, para todas las sesiones se encontraron más neuronas selectivas; esto nos da un indicio de que no todas las neuronas que se encuentran dentro de un ensamble son neuronas selectivas y viceversa, de que no todas las neuronas que están fuera de un ensamble son neuronas no selectivas. Al tener la capacidad de rastrear neuronas a lo largo de todas las sesiones nos dimos cuenta de que las categorías de selectividad entre sesiones no se conservaban. Sin embargo, era más evidente que la mayoría de las neuronas perdían su selectividad de una sesión a otra, lo que puede ser un correlato fisiológico de procesos como la

actualización de la memoria (Alberini & LeDoux, 2013; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 2017) o de cambio en los pesos de elementos específicos de la representación (Henschke et al., 2020; Makino & Komiyama, 2015; Ramesh et al., 2018; Sugden et al., 2020).

Los resultados anteriores nos llevaron a preguntarnos si existía algún cambio en la selectividad de la mayoría de las neuronas al estímulo 1 o al estímulo 2 asociado al cambio de contingencia o al genotipo y no encontramos diferencias significativas al comparar estos grupos de neuronas dentro o fuera de ensambles en ninguna sesión, ni al comparar entre genotipos. Esto sugiere que el mecanismo de refinamiento e identificación del cambio en neuronas individuales no se encuentra alterado en los ratones SHANK3. La existencia de un grupo de neuronas llamado como "no selectivas" no significa que no codifiquen a elementos de la tarea, sino que no codifican exclusivamente a alguno de esos elementos, entonces decidimos reclasificarlas como neuronas "semi selectivas" puesto que algunas tienen un sesgo a responder más hacia algún estímulo. Al revisar las proporciones de estas neuronas en la población, no notamos diferencias significativas entre genotipos ni entre sesiones; sin embargo cuando comparamos estas proporciones entre neuronas semi selectivas que pertenecen a ensambles, encontramos diferencias significativas entre genotipos para la última sesión de la segunda contingencia, es esta sesión donde se muestran las mayores diferencias conductuales, específicamente encontramos que la proporción de neuronas semi selectivas al estímulo 2 (el estímulo recompensando durante la segunda contingencia) es menor en los ratones SHANK3 respecto a los ratones silvestres, lo que nos da indicios de que la pérdida de selectividad observada en experimentos anteriores es relevante para un co-seguimiento realizado por este tipo de neuronas. Esa capacidad de una neurona para codificar dos componentes a la vez ya ha sido reportada en protocolos de aprendizaje (Henschke et al., 2020; Ramesh et al., 2018) y de aprendizaje reverso (Banerjee et al., 2020; Sugden et al., 2020).

La última característica del sistema que decidimos medir fue la fiabilidad, entendida como la capacidad de un ensamble, de una neurona o de un grupo de neuronas de responder ante todos los eventos que supuestamente codifica (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid et al., 2016). Al comparar la fiabilidad de los ensambles selectivos entre genotipos y a lo largo del tiempo encontramos diferencias significativas en la sesión previa al cambio de contingencia

donde los ensambles de los ratones SHANK3 tuvieron valores más altos de fiabilidad que los ratones silvestres y en la sesión del cambio de contingencia sucedió lo mismo; estos resultados son interesantes pues el primero se lleva a cabo en un periodo de aprendizaje donde la calidad de las representaciones corticales en los ratones SHNK3 es mayor y sugiere la diferenciación de estrategias de codificación entre genotipos, incluso desde la adquisición de la primera contingencia y al momento de reorganizar la conducta; también es importante notar como la fiabilidad de los ensambles en los ratones silvestres parece disminuir mientras se adquiere la tarea. Al evaluar la fiabilidad de las neuronas semi selectivas no se encontraron diferencias significativas entre genotipos o a lo largo del tiempo, sin embargo, es importante notar que, en los ratones silvestres, cuando la fiabilidad de los ensambles es descendente en la primera contingencia, la fiabilidad de las neuronas semi selectivas parece ser ascendente, este fenómeno no se observa en los ratones SHANK3 y puede ser evidencia de que las representaciones se “desplazan” después de cierto tiempo. Con el supuesto de que las neuronas semi selectivas, dentro y fuera de los ensambles, pueden hacer una “doble revisión” de lo que se percibe y no se registró, decidimos calcular la fiabilidad de los ensambles más las neuronas semi selectivas, encontramos que esto aumenta la fiabilidad del sistema de una forma considerable para los ratones silvestres pues el puntaje mínimo pasó de ser inferior al 25% a ser superior al 75%; no así para los ratones SHANK3 donde técnicamente si hubo un incremento pero no al mismo nivel de los ratones silvestres, lo cual sugiere que tanto las neuronas no selectivas como el ensamble están cometiendo las mismas omisiones; la ausencia de un mecanismo externo de revisión es especialmente notoria en la última sesión de la segunda contingencia, es importante recordar que es la sesión donde se presenta la sobre-especificidad del aprendizaje.

Estudios previos han reportado que para tareas Go/NoGo (basadas en condicionamiento operante) la fiabilidad de los ensambles es alta para las condiciones recompensadas o Go (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid et al., 2016), sin embargo el aprendizaje empleado para resolver esta tarea es condicionamiento clásico, este tipo de condicionamiento ha estado asociado a regiones como el núcleo pontino, el núcleo interpuesto y principalmente el cerebelo (Heffley, 2019; Robleto, Poulos, & Thompson, 2004; Thompson & Kim, 1996) lo cual lo separa anatómicamente del condicionamiento operante donde los ganglios basales y la corteza

orbitofrontal son los que juegan un papel prominente (Bolado-Gomez, Chambers, & Gurney, 2009; Gluck, Mercado, & Myers, 2008; Ma et al., 2020; Mulcahy, Atwood, & Kuznetsov, 2020). Nosotros creemos que son los protocolos de aprendizaje los que nos separan de la literatura publicada respecto a ensambles (Carrillo-Reid et al., 2019; Carrillo-Reid et al., 2016) pues las representaciones generadas por condicionamiento clásico, una forma de aprendizaje implícito (Cleeremans, 2009; Zion & Crum, 2018), podrían variar respecto a las encontradas en protocolos donde la conducta se controla por medio de recompensas. Sin embargo logramos encontrar diferencias entre genotipos en cinco niveles diferentes pues solo los ratones SHANK3 exhibieron diferencias en los índices de similitud entre vectores poblacionales codificantes para algún estímulo, además de siempre tener ensambles más selectivos al estímulo 2 sin importar la contingencia, mostrando un decremento en la actividad de sus ensambles mientras aprendían, proporciones distintas de neuronas semi selectivas al estímulo 2 en la última sesión de la segunda contingencia y ensambles con una mayor fiabilidad en las sesiones previas al cambio de contingencia y en la sesión del cambio de contingencia.

Cognitivamente el problema en los ratones Shank3 es esa persistente falta de fluidez cognitiva ante el cambio de contingencia, además de una exagerada calidad en la representación de la primera contingencia. Biológicamente el problema va más allá pues los déficits en la neurotransmisión glutamatérgica pueden crear Motivos de Conectividad Funcional (FCM, por sus siglas en inglés) (Li et al., 2016) y así alterar las bases biológicas sobre las que se construyen las representaciones, es evidente que en los ratones Shank3 existe un estímulo sobrerrepresentado y debido al diseño experimental (contrabalanceo de condiciones) no podemos afirmar que se trate a un estímulo de enrejado en particular, o al orden de presentación de los estímulos; utilizando a las neuronas como unidad principal de codificación podemos hablar de una menor proporción de neuronas con la capacidad de seguir dos estímulos (aquellas que decidimos nombrar como semi selectivas) en los ratones Shank3, existe evidencia de que cortezas secundarias ocupan estrategias de “co-seguimiento” para representar el cambio (Ramesh et al., 2018; Sugden et al., 2020) y es posible que la ausencia de este fenómeno aporte a la sobre-especificidad del aprendizaje pues evitaría la detección del cambio; la falta de dinamismo en los índices de rampa de los ratones Shank3 apoyan la idea anterior y ofrecen la posibilidad de que

no solo el procesamiento en V1 se encuentre alterado sino también el procesamiento llevado a cabo por la cooperación de cortezas; analizando el fenómeno desde la teoría de los microcircuitos neuronales podemos notar que la selectividad de los ensambles neuronales en ratones silvestres es dinámica mientras se codifica una tarea y que este fenómeno se repite ante un cambio de contingencias, en los ratones Shank3 se encuentra ausente puesto que la selectividad se mantiene para el mismo estímulo durante todo el experimento, sin importar las modificaciones de conducta que exige el medio, aunado a esto se detecta una reducción en la actividad de esos ensambles y un aumento en su fiabilidad, es posible que este sistema refine su actividad para evitar cometer errores en la identificación pero que por alteraciones en mecanismos biológicos de actualización de la memoria no pueda utilizar el mismo molde para el estímulo contrario.

La existencia de neuronas semi selectivas dentro y fuera de los ensambles supone dos escenarios, el primero donde estas células son parte de ensambles que no detectamos pues nuestros registros son solo bidimensionales; el segundo escenario es más interesante pues propone la existencia de representaciones almacenadas en la interacción de un ensamble con neuronas no agrupadas dentro de estas estructuras, en este escenario estas neuronas actúan en conjunto con las neuronas gabaérgicas para el control de la calidad de las representaciones y su remodelación en caso de ser necesario. Dentro de la gran variedad de neuronas gabaérgicas existen las neuronas positivas a Somatostatina que parecen regular los cambios de selectividad de las subredes de neuronas piramidales y de las neuronas positivas a Parvo albumina (Khan et al., 2018), es posible que nuestras neuronas semi selectivas que no se agrupan en ensambles tengan esta identidad bioquímica, reportes recientes indican alteraciones en la actividad de las neuronas gabaérgicas como consecuencia de la falta de SHANK3 (Chen et al., 2020).

8. Conclusiones

- 1) La sobre-especificidad del aprendizaje de los ratones Shank3 tiene como origen una capacidad exacerbada de entender y adaptarse a una regla específica de aprendizaje y una limitada capacidad de modificar esa capacidad ante un cambio en la regla.
- 2) Cognitivamente se puede hablar de una mejor calidad en la representación de la primera contingencia por parte de los ratones Shank3 respecto a los ratones silvestres y de una falta de plasticidad en la modificación de esa representación al cambiar de contingencia.
- 3) La sobre-especificidad del aprendizaje tiene un correlato neuronal en la mesoescala.
 - a. Las diferencias entre genotipos para el índice de similitud ante el cambio de contingencia reflejan diferentes estrategias de reorganización de los grupos de neuronas.
 - b. La ausencia de cambio en la selectividad de los ensambles pertenecientes a los ratones Shank3 coincide con la sobre representación planteada por los análisis cognitivos.
 - c. La fiabilidad más alta en los ensambles de los ratones Shank3 respecto a los ensambles de los ratones silvestres también coincide con las explicaciones generadas a partir de la ciencia cognitiva.
- 4) Las diferencias en la actividad neuronal relacionada al aprendizaje vienen de dos niveles de análisis distintos.
 - a. Encontramos diferencias entre genotipos en como los ensambles neuronales representan y cambian esas representaciones de la información.
 - b. También encontramos como poblaciones de neuronas que no se agrupan por su actividad cambian en función del aprendizaje y modifican esos cambios al reaprender una tarea.
 - c. Finalmente proponemos la existencia de una interacción entre neuronas y ensambles como el mecanismo que respalda un correcto funcionamiento del aprendizaje.

5) Proponemos que las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica alteran los Motivos de Conectividad Funcional y eso, como consecuencia, afecta no solo la calidad de las representaciones sino la habilidad del sistema de modificar esas representaciones y emitir conducta.

a. Esta propuesta establece una relación causal entre las alteraciones genéticas encontradas en el Síndrome de Phelan-McDermid y la presencia de síntomas neurológicos y cognitivos.

9. Referencias

- Acar, F., Seurinck, R., Eickhoff, S. B., & Moerkerke, B. (2018). Assessing robustness against potential publication bias in activation likelihood estimation (ALE) meta-analyses for fMRI. *PLoS one*, 13(11), e0208177.
- Ahrendts, J., Rüsç, N., Wilke, M., Philipsen, A., Eickhoff, S. B., Glauche, V., . . . Tebartz van Elst, L. (2011). Visual cortex abnormalities in adults with ADHD: a structural MRI study. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 12(4), 260-270.
- Armington, J. (2012). *Visual psychophysics and physiology: a volume dedicated to Lorrin Riggs*: Elsevier.
- Ashwood, Z. C., Roy, N. A., Stone, I. R., Churchland, A. K., Pouget, A., & Pillow, J. W. (2020). Mice alternate between discrete strategies during perceptual decision-making. *bioRxiv*.
- Association, A. P. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5* (5th ed.). Washington, D.C.: American Psychiatric Association.
- Barlow, H. B. (1953). Summation and inhibition in the frog's retina. *The Journal of physiology*, 119(1), 69-88.
- Baum, S. H., Stevenson, R. A., & Wallace, M. T. J. P. i. n. (2015). Behavioral, perceptual, and neural alterations in sensory and multisensory function in autism spectrum disorder. *134*, 140-160.
- Benninger, R. K., & Piston, D. W. (2013). Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Current protocols in cell biology*, 59(1), 4.11. 11-14.11. 24.
- Bertone, A., Mottron, L., Jelenic, P., & Faubert, J. (2003). Motion perception in autism: a "complex" issue. *Journal of cognitive neuroscience*, 15(2), 218-225.
- Blake, D. T., Heiser, M. A., Caywood, M., & Merzenich, M. M. (2006). Experience-dependent adult cortical plasticity requires cognitive association between sensation and reward. *Neuron*, 52(2), 371-381.
- 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
- Brebner, L. S., Ziminski, J. J., Margetts-Smith, G., Sieburg, M. C., Reeve, H. M., Nowotny, T., . . . Kato, S. (2020). The emergence of a stable neuronal ensemble from a wider pool of activated neurons in the dorsal medial prefrontal cortex during appetitive learning in mice. *Journal of Neuroscience*, 40(2), 395-410.
- Busse, L. (2018). The Mouse Visual System and Visual Perception. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 27, pp. 53-68): Elsevier.
- Camillo, D., Ahmadlou, M., Saiepour, M. H., Yasaminshirazi, M., Levelt, C. N., & Heimel, J. A. (2018). Visual processing by calretinin expressing inhibitory neurons in mouse primary visual cortex. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Cao, V. Y., Ye, Y., Mastwal, S., Ren, M., Coon, M., Liu, Q., . . . Wang, K. H. (2015). Motor learning consolidates arc-expressing neuronal ensembles in secondary motor cortex. *Neuron*, 86(6), 1385-1392.
- 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
- Carrillo-Reid, L., Han, S., Yang, W., Akrouh, A., & Yuste, R. (2019). Controlling visually guided behavior by holographic recalling of cortical ensembles. *Cell*, 178(2), 447-457. e445.
- Carrillo-Reid, L., Miller, J.-e. K., Hamm, J. P., Jackson, J., & Yuste, R. (2015). Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *Journal of Neuroscience*, 35(23), 8813-8828.
- Carrillo-Reid, L., Yang, W., Bando, Y., Peterka, D. S., & Yuste, R. (2016). Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science*, 353(6300), 691-694.

- Chen, C., Bickford, M. E., & Hirsch, J. A. J. C. (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
- Cheung, P. P. P., & Lau, B. W. M. (2020). Neurobiology of sensory processing in autism spectrum disorder. *Progress in molecular biology and translational science*, *173*, 161-181.
- Cho, M. W., & Chun, M. Y. (2015). Two symmetry-breaking mechanisms for the development of orientation selectivity in a neural system. *Journal of the Korean Physical Society*, *67*(9), 1661-1666.
- Churchland, M. M., Cunningham, J. P., Kaufman, M. T., Foster, J. D., Nuyujukian, P., Ryu, S. I., & Shenoy, K. V. (2012). Neural population dynamics during reaching. *Nature*, *487*(7405), 51-56.
- Cooke, S. F., & Bear, M. F. (2015). Visual recognition memory: a view from V1. *Current opinion in neurobiology*, *35*, 57-65.
- Cooke, S. F., Komorowski, R. W., Kaplan, E. S., Gavornik, J. P., & Bear, M. F. (2015). Visual recognition memory, manifested as long-term habituation, requires synaptic plasticity in V1. *Nat Neurosci*, *18*(2), 262-271. doi:10.1038/nn.3920
- Cossart, R., Aronov, D., & Yuste, R. (2003). Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature*, *423*(6937), 283-288.
- 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
- Dana, H., Sun, Y., Mohar, B., Hulse, B., Hasseman, J. P., Tsegaye, G., . . . Macklin, J. J. J. b. (2018). High-performance GFP-based calcium indicators for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. 434589.
- DeNardo, L. A., Liu, C. D., Allen, W. E., Adams, E. L., Friedmann, D., Fu, L., . . . Luo, L. (2019). Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nature neuroscience*, *22*(3), 460-469.
- Denk, W., & Svoboda, K. (1997). Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, *18*(3), 351-357. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115730>
- 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
- 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. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1110771>
- Dumoulin, S. O., Baker Jr, C. L., Hess, R. F., & Evans, A. C. J. C. C. (2003). Cortical specialization for processing first-and second-order motion. *13*(12), 1375-1385.
- Dylda, E., Pakan, J. M., & Rochefort, N. L. (2019). Chronic Two-Photon Calcium Imaging in the Visual Cortex of Awake Behaving Mice. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 28, pp. 235-251): Elsevier.
- Fallah, M., & Reynolds, J. H. (2001). Attention! V1 neurons lining up for inspection. *Neuron*, *31*(5), 674-675.
- Fechner, G. (1966). Elements of psychophysics. Vol. I.
- Ferster, D., & Miller, K. D. (2000). Neural mechanisms of orientation selectivity in the visual cortex. *Annual review of neuroscience*, *23*(1), 441-471.
- Fischer, L. F., Soto-Albors, R. M., Buck, F., & Harnett, M. T. (2020). Representation of visual landmarks in retrosplenial cortex. *Elife*, *9*, e51458.

- Fitzpatrick, D. J. C. c. (1996). The functional organization of local circuits in visual cortex: insights from the study of tree shrew striate cortex. *6*(3), 329-341.
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., . . . Reichert, J. J. N. g. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *46*(8), 881.
- Gavornik, J. P., & Bear, M. F. (2014). Higher brain functions served by the lowly rodent primary visual cortex. *Learning & Memory, 21*(10), 527-533.
- 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
- Goel, A., Cantu, D. A., Guilfoyle, J., Chaudhari, G. R., Newadkar, A., Todisco, B., . . . Pedapati, E. (2018). Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. *Nature neuroscience, 21*(10), 1404-1411.
- Golden, J. R., Vilankar, K. P., Wu, M. C., & Field, D. J. (2016). Conjectures regarding the nonlinear geometry of visual neurons. *Vision research, 120*, 74-92.
- Grünert, U., & Martin, P. R. (2020). Cell types and cell circuits in human and non-human primate retina. *Progress in Retinal and Eye Research, 100*844.
- Hakim, R., Shamardani, K., & Adesnik, H. (2018). A neural circuit for gamma-band coherence across the retinotopic map in mouse visual cortex. *Elife, 7*, e28569.
- Han, Q., Kim, Y. H., Wang, X., Liu, D., Zhang, Z.-J., Bey, A. L., . . . Zhang, Y. (2016). SHANK3 deficiency impairs heat hyperalgesia and TRPV1 signaling in primary sensory neurons. *Neuron, 92*(6), 1279-1293.
- Harris, H., Israeli, D., Minshew, N., Bonneh, Y., Heeger, D. J., Behrmann, M., & Sagi, D. J. N. n. (2015). Perceptual learning in autism: over-specificity and possible remedies. *18*(11), 1574.
- Harris, H., Israeli, D., Minshew, N. J., Bonneh, Y. S., Heeger, D. J., Behrmann, M., & Sagi, D. J. F. i. i. n. (2016). Response: Commentary: Perceptual learning in autism: over-specificity and possible remedies. *10*, 36.
- Hayretdag, C., Algedik, P., Ekmekci, C. G., Gunal, O. B., Agyuz, U., Yildirim, H., & Coskunpinar, E. (2020). Determination of genetic changes in etiology of autism spectrum disorder in twins by whole-exome sequencing. *Gene Reports, 19*, 100618.
- Helassa, N., Podor, B., Fine, A., & Török, K. J. S. r. (2016). Design and mechanistic insight into ultrafast calcium indicators for monitoring intracellular calcium dynamics. *6*, 38276.
- Henschke, J. U., Dylida, E., Katsanevaki, D., Dupuy, N., Currie, S. P., Amvrosiadis, T., . . . Rochefort, N. L. (2020). Reward Association Enhances Stimulus-Specific Representations in Primary Visual Cortex. *Current Biology*.
- Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D. K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S. B., . . . Lee, W.-C. A. J. N. p. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *4*(8), 1128.
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of physiology, 160*(1), 106-154.
- Huguet, G., Ey, E., Bourgeron, T. J. A. r. o. g., & genetics, h. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *14*, 191-213.
- Humphreys, K., Hasson, U., Avidan, G., Minshew, N., & Behrmann, M. (2008). Cortical patterns of category-selective activation for faces, places and objects in adults with autism. *Autism Research, 1*(1), 52-63.
- Iarocci, G., & McDonald, J. (2006). Sensory integration and the perceptual experience of persons with autism. *Journal of autism and developmental disorders, 36*(1), 77-90.
- Ito, S., & Feldheim, D. A. J. F. i. n. c. (2018). The mouse superior colliculus: an emerging model for studying circuit formation and function. *12*, 10.

- 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
- Jin, M., Beck, J. M., & Glickfeld, L. L. (2019). Neuronal adaptation reveals a suboptimal decoding of orientation tuned populations in the mouse visual cortex. *Journal of Neuroscience*, *39*(20), 3867-3881.
- Kampa, B. M., Roth, M. M., Göbel, W., & Helmchen, F. (2011). Representation of visual scenes by local neuronal populations in layer 2/3 of mouse visual cortex. *Frontiers in neural circuits*, *5*, 18.
- Kang, J. I., Huppé-Gourgues, F., & Vaucher, E. (2014). Boosting visual cortex function and plasticity with acetylcholine to enhance visual perception. *Frontiers in systems neuroscience*, *8*, 172.
- Katzner, S., Born, G., & Busse, L. (2019). V1 microcircuits underlying mouse visual behavior. *Current opinion in neurobiology*, *58*, 191-198.
- Keck, T., Keller, G. B., Jacobsen, R. I., Eysel, U. T., Bonhoeffer, T., & Hübener, M. (2013). Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo. *Neuron*, *80*(2), 327-334.
- Keehn, B., Shih, P., Brenner, L. A., Townsend, J., & Müller, R. A. (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.
- Kerlin, A. M., Andermann, M. L., Berezovskii, V. K., & Reid, R. C. (2010). Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex. *Neuron*, *67*(5), 858-871.
- Khan, A. G., Poort, J., Chadwick, A., Blot, A., Sahani, M., Mrsic-Flogel, T. D., & Hofer, S. B. (2018a). Distinct learning-induced changes in stimulus selectivity and interactions of GABAergic interneuron classes in visual cortex. *Nature neuroscience*, *21*(6), 851-859.
- Khan, A. G., Poort, J., Chadwick, A., Blot, A., Sahani, M., Mrsic-Flogel, T. D., & Hofer, S. B. J. N. n. (2018b). Distinct learning-induced changes in stimulus selectivity and interactions of GABAergic interneuron classes in visual cortex. 1.
- Kim, K., Kim, J.-H., Song, Y.-H., & Lee, S.-H. (2017). Functional dissection of inhibitory microcircuits in the visual cortex. *Neuroscience research*, *116*, 70-76.
- Koh, H. C., Milne, E., & Dobkins, K. (2010). Contrast sensitivity for motion detection and direction discrimination in adolescents with autism spectrum disorders and their siblings. *Neuropsychologia*, *48*(14), 4046-4056.
- Lane, A. E., Molloy, C. A., & Bishop, S. L. (2014). Classification of Children With Autism Spectrum Disorder by Sensory Subtype: A Case for Sensory-Based Phenotypes. *Autism Research*, *7*(3), 322-333.
- Leblond, C. S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., . . . Mouzat, K. J. P. g. (2014). Meta-analysis of SHANK mutations in autism spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *10*(9), e1004580.
- Leekam, S. R., Nieto, C., Libby, S. J., Wing, L., & Gould, J. (2007). Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. *Journal of autism and developmental disorders*, *37*(5), 894-910.
- Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J.-I., Suh, P.-G., Sheng, M., & Kim, E. (1999). Characterization of the Shank Family of Synaptic Proteins MULTIPLE GENES, ALTERNATIVE SPLICING, AND DIFFERENTIAL EXPRESSION IN BRAIN AND DEVELOPMENT. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(41), 29510-29518.
- Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J. I., Suh, P. G., Sheng, M., & Kim, E. (1999). Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J Biol Chem*, *274*(41), 29510-29518. doi:10.1074/jbc.274.41.29510
- Lu, J., Tucciarone, J., Padilla-Coreano, N., He, M., Gordon, J. A., & Huang, Z. J. (2017). Selective inhibitory control of pyramidal neuron ensembles and cortical subnetworks by chandelier cells. *Nature neuroscience*, *20*(10), 1377.
- Makino, H., & Komiyama, T. J. N. n. (2015). Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex. *18*(8), 1116.

- 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
- Meguid, N. A., Eid, O. M., Reda, M., Elalfy, D. Y., & Hussein, F. (2020). Copy number variations of SHANK3 and related sensory profiles in Egyptian children with autism spectrum disorder. *Research in Autism Spectrum Disorders*, *75*, 101558.
- Miller, P. (2016). Dynamical systems, attractors, and neural circuits. *F1000Research*, *5*.
- Moessner, R., Marshall, C. R., Sutcliffe, J. S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., . . . Szatmari, P. J. T. A. J. o. H. G. (2007). Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *81*(6), 1289-1297.
- Mohr, M. A., Bushey, D., Aggarwal, A., Marvin, J. S., Kim, J. J., Marquez, E. J., . . . Lee, C.-Y. (2020). jYCaMP: An optimized calcium indicator for two-photon imaging at fiber laser wavelengths. *Nature Methods*, 1-4.
- Moldakarimov, S., Bazhenov, M., & Sejnowski, T. J. (2014). Top-down inputs enhance orientation selectivity in neurons of the primary visual cortex during perceptual learning. *PLOS Comput Biol*, *10*(8), e1003770.
- 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
- Naarendorp, F., Esdaille, T. M., Banden, S. M., Andrews-Labenski, J., Gross, O. P., & Pugh, E. N. J. J. o. N. (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. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433268>
- Najafi, F., Elsayed, G. F., Cao, R., Pnevmatikakis, E., Latham, P. E., Cunningham, J. P., & Churchland, A. K. (2020). Excitatory and inhibitory subnetworks are equally selective during decision-making and emerge simultaneously during learning. *Neuron*, *105*(1), 165-179. e168.
- Nishiyama, M., Matsui, T., Murakami, T., Hagihara, K. M., & Ohki, K. (2019). Cell-type-specific thalamocortical inputs constrain direction map formation in visual cortex. *Cell reports*, *26*(5), 1082-1088. e1083.
- Ohki, K., & Reid, R. C. J. C. o. i. n. (2007). Specificity and randomness in the visual cortex. *17*(4), 401-407.
- Pakan, J. M., Currie, S. P., Fischer, L., & Rochefort, N. L. (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*(10), 2521-2528.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*: Academic press.
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., . . . Feng, G. J. N. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *472*(7344), 437.
- Perfitt, T. L., Stauffer, P. E., Spiess, K. L., & Colbran, R. J. (2020). CaMKII α phosphorylation of Shank3 modulates ABI1-Shank3 interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Phelan, K., & McDermid, H. E. (2012). The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol Syndromol*, *2*(3-5), 186-201. doi:000334260
- Pinotsis, D. A., Brincat, S. L., & Miller, E. K. (2017). On memories, neural ensembles and mental flexibility. *Neuroimage*, *157*, 297-313.
- Pnevmatikakis, E. A., & Giovannucci, A. (2017). NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of neuroscience methods*, *291*, 83-94.

- Pnevmatikakis, E. A., Merel, J., Pakman, A., & Paninski, L. (2013). *Bayesian spike inference from calcium imaging data*. Paper presented at the 2013 Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers.
- Pnevmatikakis, E. A., Soudry, D., Gao, Y., Machado, T. A., Merel, J., Pfau, D., . . . Yang, W. J. N. (2016). Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data. *89*(2), 285-299.
- Poll, S., & Fuhrmann, M. (2019). Long-Term In Vivo Imaging of Structural Plasticity in Rodents. In *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
- Posar, A., & Visconti, P. (2018). Sensory abnormalities in children with autism spectrum disorder. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*, *94*(4), 342-350.
- Priebe, N. J., & McGee, A. W. (2014). Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. *Frontiers in neural circuits*, *8*, 123.
- Ramesh, R. N., Burgess, C. R., Sugden, A. U., Gyetvan, M., & Andermann, M. L. J. N. (2018). Intermingled Ensembles in Visual Association Cortex Encode Stimulus Identity or Predicted Outcome. *100*(4), 900-915. e909.
- Read, J. J. N. (2015). The place of human psychophysics in modern neuroscience. *296*, 116-129.
- Sala, C., Vicidomini, C., Bigi, I., Mossa, A., & Verpelli, C. J. J. o. n. (2015). Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders. *135*(5), 849-858.
- Samson, F., Mottron, L., Soulières, I., & Zeffiro, T. A. J. H. b. m. (2012). Enhanced visual functioning in autism: An ALE meta-analysis. *33*(7), 1553-1581.
- Sandler, A. J. (2008). Chronic recording during learning. In *Methods for neural ensemble recordings* (pp. 125-143): CRC Press Boca Raton.
- Sawinski, J., Wallace, D. J., Greenberg, D. S., Grossmann, S., Denk, W., & Kerr, J. N. (2009). Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(46), 19557-19562.
- Schmeisser, M. J., & Verpelli, C. (2016). SHANK mutations in intellectual disability and autism spectrum disorder. In *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability* (pp. 151-160): Elsevier.
- Schwarzkopf, D. S., Anderson, E. J., de Haas, B., White, S. J., & Rees, G. J. J. o. N. (2014). Larger extrastriate population receptive fields in autism spectrum disorders. *34*(7), 2713-2724.
- Sengpiel, F. (2014). Plasticity of the visual cortex and treatment of amblyopia. *Current Biology*, *24*(18), R936-R940.
- Serrano, M., & Caroni, P. (2019). Managing Neuronal Ensembles: Somatostatin Interneuron Subpopulations Shape and Protect Cortical Neuronal Ensembles for Learning. *Neuron*, *102*(1), 6-8.
- Sheintuch, L., Rubin, A., Brande-Eilat, N., Geva, N., Sadeh, N., Pinchasof, O., & Ziv, Y. (2017). Tracking the same neurons across multiple days in Ca²⁺ imaging data. *Cell reports*, *21*(4), 1102-1115.
- Shepherd, G. M., & Grillner, S. (2018). *Handbook of brain microcircuits*: Oxford University Press.
- Shuler, M. G., & Bear, M. F. J. S. (2006). Reward timing in the primary visual cortex. *311*(5767), 1606-1609.
- Sohya, K., Kameyama, K., Yanagawa, Y., Obata, K., & Tsumoto, T. (2007). GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca²⁺ imaging in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *27*(8), 2145-2149.
- Spencer, J., O'Brien, J., Riggs, K., Braddick, O., Atkinson, J., & Wattam-Bell, J. (2000). Motion processing in autism: evidence for a dorsal stream deficiency. *Neuroreport*, *11*(12), 2765-2767.
- Stanislaw, H., & Todorov, N. (1999). Calculation of signal detection theory measures. *J Behavior research methods, instruments*,

- computers*, 31(1), 137-149.
- Stanislaw, H., Todorov, N. J. B. r. m., instruments,, & computers. (1999). Calculation of signal detection theory measures. 31(1), 137-149.
- Sugden, A. U., Zaremba, J. D., Sugden, L. A., McGuire, K. L., Lutas, A., Ramesh, R. N., . . . Andermann, M. L. (2020). Cortical reactivations of recent sensory experiences predict bidirectional network changes during learning. *Nature neuroscience*, 1-11.
- Sun, W., Tan, Z., Mensh, B. D., & Ji, N. (2016). Thalamus provides layer 4 of primary visual cortex with orientation-and direction-tuned inputs. *Nature neuroscience*, 19(2), 308.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., & Tank, D. W. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, 385(6612), 161-165. doi:10.1038/385161a0
- 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
- Tatavarty, V., Pacheco, A. T., Kuhnle, C. G., Lin, H., Koundinya, P., Miska, N. J., . . . Turrigiano, G. G. (2020). Autism-associated Shank3 is essential for homeostatic compensation in rodent V1. *Neuron*, 106(5), 769-777. e764.
- Tomchek, S. D., & Dunn, W. (2007). Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. *American Journal of occupational therapy*, 61(2), 190-200.
- Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., . . . Kohsaka, S. (2006). Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *Journal of neurochemistry*, 97(4), 1203-1214.
- Uchino, S., & Waga, C. (2013). SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain and Development*, 35(2), 106-110.
- Vilankar, K. P., & Field, D. J. (2017). Selectivity, hyperselectivity, and the tuning of V1 neurons. *Journal of vision*, 17(9), 9-9.
- Wang, S., Jiang, M., Duchesne, X. M., Laugeson, E. A., Kennedy, D. P., Adolphs, R., & Zhao, Q. J. N. (2015). Atypical visual saliency in autism spectrum disorder quantified through model-based eye tracking. *88(3)*, 604-616.
- Wang, X., McCoy, P. A., Rodriguiz, R. M., Pan, Y., Je, H. S., Roberts, A. C., . . . Bousquet-Moore, D. (2011). Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Human molecular genetics*, 20(15), 3093-3108.
- Wang, X., Xu, Q., Bey, A. L., Lee, Y., & Jiang, Y.-h. (2014). Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice. *Molecular autism*, 5(1), 1-14.
- World Health Organization. (2018). Autism spectrum disorders. Retrieved from <https://http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
- Yan, Y., Rasch, M. J., Chen, M., Xiang, X., Huang, M., Wu, S., & Li, W. (2014). Perceptual training continuously refines neuronal population codes in primary visual cortex. *Nature neuroscience*, 17(10), 1380-1387.
- Zhang, S., Xu, M., Chang, W.-C., Ma, C., Do, J. P. H., Jeong, D., . . . Dan, Y. (2016). Organization of long-range inputs and outputs of frontal cortex for top-down control. *Nature neuroscience*, 19(12), 1733-1742.
- 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, D., & Di Filippo, A. (2018). Methodological Approaches to the Behavioural Investigation of Visual Perception in Rodents. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 27, pp. 69-101): Elsevier.

Zoghbi, H. Y., & Bear, M. F. J. C. S. H. p. i. b. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. a009886.