



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**Neurobiología de las
alteraciones somatosensoriales
en un modelo murino de
autismo**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Psicología

P R E S E N T A

Noé Samuel Bravo Rivero

DIRECTOR

Dr. Mario Alberto Arias García

REVISOR DE TESIS

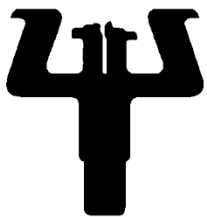
Dr. Octavio Cesar García Gonzáles

SINODALES

D. en C. Fructuoso Ayala Guerrero

Dra. Violeta Gisselle López Huerta

Dr. Oscar Vladimir Orduña Trujillo



**Facultad
de Psicología**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2023



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.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5HT3aR: Receptor a serotonina tipo 3a

BOLD: Blood-Oxygen-Level-Dependent (Imágen de contraste dependiente del nivel de oxígeno en la sangre)

Ca²⁺: Calcio

CE: Cirugía Estereotáxica

CNO: N-óxido de clozapina

CTRL: Grupo control

DPN: Día Posnatal

DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales)

E/I: Excitación/Inhibición

fMRI: Imagen por Resonancia Magnética Funcional

FXS: Síndrome de X Frágil

GABA: Ácido Gama-Aminobutírico

hM3Dq: Forma modificada del receptor muscarinico M3 humano

MDS: Síndrome de duplicación MECP2

P: Posnatal

PA: Estimulación por presión de aire

PSI: Libra por pulgada cuadrada

PV: Parvalbumina

RC: Remoción de cinta.

RNF: Reconocimiento del nido familiar

RTT: Síndrome de Rett

S1: Corteza Somatosensorial Primaria

SPM: Síndrome de Phelan-McDermid

SST: Somatostatina

TEA: Trastorno del Espectro Autista

TEA-i: Trastorno del Espectro Autista Idiopático

TEA-s: Trastorno del Espectro Autista Sindrómico

TSC: Síndrome esclerosis tuberosa

VIP: Peptido Vasoactivo Intestinal

VPA: Ácido Valpróico

VPM: Núcleo Ventral Posteromedial

VUS: Vocalizaciones ultrasónicas

Contenido

Tabla de contenido

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Alteraciones sensoriales en el TEA.....	7
1.2 Alteraciones somatosensoriales.....	9
1.3 Modelos animales del TEA.....	11
1.4 Modelo murino de TEA inducido por ácido valproico	11
1.4.1 Vías de procesamiento somatosensorial.....	12
1.4.2 Alteraciones somatosensoriales en el modelo de TEA inducido por VPA.....	14
1.5 Neurobiología de las alteraciones sensoriales del TEA.....	16
1.5.1 Modulación sistémica del sistema GABAérgico en el TEA.....	17
1.5.2 Interneuronas inhibitorias.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
2.1 Preguntas de Investigación.....	21
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos particulares.....	21
4. HIPÓTESIS.....	21
5. MÉTODO.....	22
5.1 Caracterización del modelo de TEA inducido por VPA.....	22
5.2 Experimentos Conductuales para la validación del modelo.....	23
5.3 Experimentos Conductuales para la evaluación del perfil sensorial	24
5.4 Manipulación de la conducta en vivo	25
6. RESULTADOS.....	29
6.1 Caracterización del modelo de TEA inducido por VPA	29
6.1.1 Déficit en la comunicación.....	29
6.1.2 Alteraciones sensoriales.....	32
6.2 Caracterización del perfil somatosensorial del modelo de TEA inducido por VPA..	34
6.2.1 Prueba de Remoción de cinta en el rostro.....	34
6.2.2 Prueba de estimulación de patas traseras por aire a presión.....	35

6.3 Modulación de la excitación neuronal <i>in vivo</i> de las interneuronas GABAérgicas y evaluación del perfil somatosensorial.....	38
6.3.1 Validación <i>in vitro</i> de la expresión de los receptores de diseño (hM3Dq).....	38
6.3.2 Evaluación del perfil somatosensorial modulado al alta.....	40
7. DISCUSIÓN.....	43
7.1 Perfil somatosensorial táctil en el modelo murino de VPA.....	44
7.2 Modulación de la excitabilidad GABAérgica <i>in vivo</i>	46
8. CONCLUSIONES.....	49
9. REFERENCIAS.....	50



Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, IA206621 ‘Neurobiología de los déficits somatosensoriales del trastorno del espectro autista’ y al programa UNAM-PAPIME PE209622 “Diseño y generación de materiales digitales para la enseñanza teórico-práctica de la neurofisiología celular”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

1. INTRODUCCIÓN

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un conjunto de afectaciones o discapacidades del neurodesarrollo de origen neurobiológico (Lord et al., 2018). En el mundo, se ha estimado que la prevalencia es de 7.6 por cada 1000 personas, o bien, 1 de cada 132 personas (Baxter, et. al., 2015), mientras que en países desarrollados se estima una mayor prevalencia (Lord, et. al., 2020). En México, aunque los estudios son muy escasos, se estima que hay una prevalencia del 1% (Fombonne E., 2016). Además, se ha establecido que la proporción entre hombres y mujeres que padecen TEA es de 3:1 aproximadamente (Loomes et al., 2017), lo cual indica que los hombres son mayormente propensos a desarrollar este trastorno.

La detección temprana del TEA es crucial para mejorar la calidad de vida de las personas (Dawson y Bernier, 2013). Este trastorno comúnmente se detecta por profesionistas de la salud mental después de los 18 meses de edad, aunque algunas personas no son diagnosticadas hasta que son adolescentes o adultos (Zavaleta et al., 2020; Centers for Disease Control and Prevention, 2020), lo cual significa una pérdida en la oportunidad de intervenir oportunamente y con ello incrementar las posibilidades de mejora en la sintomatología del paciente desde edades tempranas (Daniels et al., 2014).

1.1 Alteraciones sensoriales en el TEA

Tradicionalmente, el TEA se ha caracterizado por tres síntomas centrales: déficits en la comunicación, alteraciones en la interacción social y comportamientos repetitivos (Lord, et al., 2020). En los últimos años ha tomado relevancia el estudio y observación clínica de las alteraciones sensoriales en las personas con TEA. Diversos estudios han demostrado que aproximadamente el 90% de las personas diagnosticadas con TEA tienen experiencias sensoriales atípicas (Leekam, 2006; Tomchek y Dunn, 2007, Figura 1; Geschwind, 2009; Robertson y Cohen, 2017). Por ejemplo, en modalidades visuales que indican diferencias en el tiempo de fijación de objetos y personas, así como un sesgo hacia el centro de la imagen (Mottron, 2006; Wang, 2015), olfativas que involucran la profundidad de la olfacción y la dificultad de discriminación entre olores agradables y desagradables (Rosenkrantz, 2015), gustativas al no poder discriminar entre distintos sabores (Bennetto, 2007), auditivas en cuanto a la discriminación de tonos y a la ventana

de integración multisensorial (Kwakye, 2011) y somatosensoriales como una mayor actividad BOLD relacionada a la estimulación táctil comparado con los de desarrollo típico o umbrales alterados a la estimulación mecánica (Green, 2015; Fründt, 2017). Estos hallazgos han ganado tal relevancia que las alteraciones sensoriales se han integrado recientemente como parte de los síntomas centrales del TEA, y se reconocen como hiper o hipo reactividad a los estímulos sensoriales en el “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM-V), (DSM-V, 2014; Balasco, 2020).

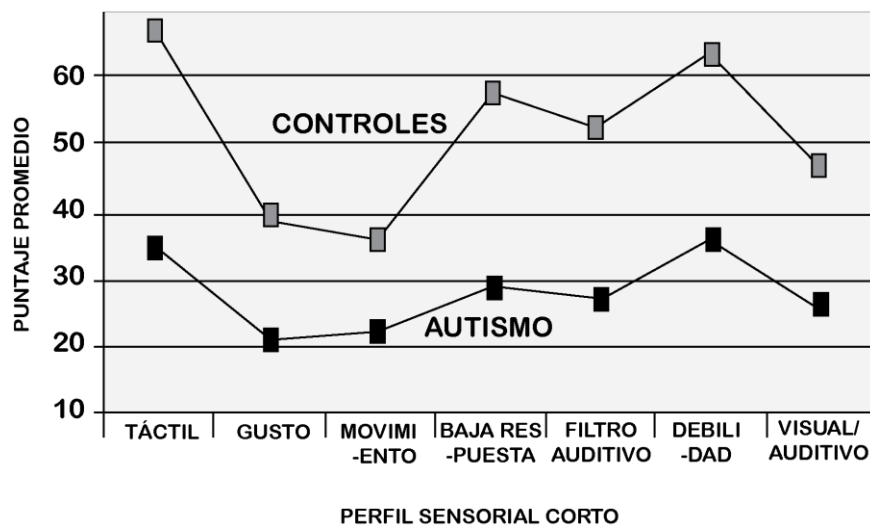


Figura 1. Alteraciones sensoriales en el TEA medido a través del SSP (Short Sensory Profile).

A) Diferencias en las puntuaciones medias por sección y por grupo (Todas las diferencias son significativas). El SSP es una medida del informe del cuidador de 38 ítems con los que demostraron el mayor poder discriminativo del procesamiento sensorial atípico entre todos los ítems de la versión larga, el Perfil Sensorial (SP; Dunn, 1999). Los elementos se califican en una escala de 1 a 5 puntos, se suman y se obtienen los puntajes totales para cada sección. Las 7 secciones del SSP se encuentran en una muestra normativa. **Diferencia Definitiva:** puntajes más grandes que 2 desviaciones. **Diferencia probable:** puntajes más grandes de 1 desviación estándar pero menos que 2 (Tomado y editado de Tomchek y Dunn, 2007).

Evidencia reciente demuestra que los procesos cognitivos y los procesos sensoriales están estrechamente relacionados al depender de la interacción entre núcleos talámicos y núcleos corticales (Halassa y Kastner, 2017; Wolff et al., 2021), tanto en humanos como en modelos animales (Pergola et al., 2018), posibilitando la idea de que los procesos sensoriales primarios sean la base del establecimiento de procesos de alta demanda cognitiva o funciones ejecutivas (Pastor-Cerezuela, 2020). Además, la teoría de

Integración Sensorial sostiene que el procesamiento sensorial es la base que conforma los bloques de construcción dentro de una estructura jerárquica en la que las funciones sociales y cognitivas de alto nivel se encuentran en la cumbre (Baum et al., 2015), así, las alteraciones sensoriales en el TEA podrían ser impulsores de déficits en el desarrollo de funciones cognitivas de mayor nivel como el lenguaje, la interacción social, o el control inhibitorio motriz que regula las conductas repetitivas y estereotipadas implicadas en este trastorno.

1.2 Alteraciones somatosensoriales

El sistema somatosensorial en el humano está dado por una serie de distintos componentes del sistema nervioso distribuidos por todo el cuerpo, desde la piel donde se localizan los mecanorreceptores o los termorreceptores, los nervios periféricos que viajan a través de la espina dorsal hasta la médula espinal para llegar al Núcleo Ventral Posteromedial (VPM), del tálamo y en última instancia, llevar información sobre el tacto, dolor y temperatura a la corteza somatosensorial primaria (S1) (Sherman, 2019, Hendry y Hsiao, 2013), construyendo así, la experiencia somatosensorial esencial para las funciones más básicas, como la evitación del peligro y el movimiento coordinado (Kania, 2021).

En particular, el procesamiento somatosensorial está fuertemente vinculado a otros procesos cognitivos como la toma de decisiones (Luna, et al., 2005), la memoria a corto plazo de estímulos táctiles (Pleger et al, 2006) y el tacto en la interacción social (Blakemore et al., 2015). Estos ejemplos, permiten reconocer la importancia y la diversidad de las implicaciones que tiene la somatosensación en los procesos cognitivos (Pleger y Villringer, 2013), que se relacionan íntimamente con la sintomatología del TEA.

Comúnmente, el TEA se ha clasificado en no sindrómico y sindrómico. Para estas condiciones, la etiología en la mayoría de los casos es conocida y puede involucrar alteraciones cromosómicas. Por ejemplo, las variaciones del número de copias de genes y mutaciones en un solo gen, como en el síndrome de X frágil (FXS), el síndrome de Rett (RTT), síndrome de duplicación MECP2 (MDS), síndrome de Angelman, esclerosis tuberosa (TSC), síndrome de macrocefalia (PTEN10) y el síndrome de Phelan-McDermid (SPM). Los casos sindrómicos (TEA-s), sólo explican la etiología del 5% de los casos

(Sztainberg & Zoghbi, 2016). El 95% de los casos, se considera de origen idiopático (TEA-i), o de etiología desconocida, muchas veces adjudicados a factores ambientales causantes del TEA.

Al respecto, Tavassoli y cols., (2021), evaluaron el perfil sensorial de niños con TEA sindrómico (SPM), niños con TEA-i y niños de desarrollo típico. Encontraron que, a través del instrumento de evaluación sensorial para trastornos del neurodesarrollo, el grupo de TEA sindrómico presentó un perfil de hiporreactividad a los estímulos sensoriales, mientras que el grupo de TEA-i mostró un perfil de hiperreactividad sensorial.

Por otro lado, Neklyudova y cols. (2022), realizaron una revisión sistemática de hallazgos neurofisiológicos relacionados con estimulación sensorial (Potenciales Relacionados a Eventos y Electroencefalografía), segregando los reportes en personas con TEA-s y TEA-i. De los TEA-s que se revisaron, los síndromes de X Frágil y el de Angelman, muestran un perfil hipersensible, mientras que los síndromes de Phelan-McDermid, Rett, Esclerosis Tuberosa y Neurofibromatosis 1 mostraron un perfil hiposensible. Sin embargo, los hallazgos neurofisiológicos en los TEA-i fueron inconsistentes para agruparlos en hipersensibles o hiposensibles. En este sentido, debido al porcentaje de casos que representan los TEA-i, es relevante estudiar más a fondo el perfil sensorial en esta población.

Diversos esfuerzos se han realizado para comprender las alteraciones somatosensoriales en el TEA a diferentes niveles de estudio. Por ejemplo, a nivel de reporte, los de padres y cuidadores primarios por medio del Perfil Sensorial Corto (Tomchek y Dunn, 2007), han demostrado que el 90% de los niños con TEA presentan alteraciones en la modalidad táctil (ver Figura 1); la psicofisiología, por su parte, ha encontrado diferencias en los umbrales de detección vibro-táctiles en pacientes con TEA (Blakemore et al. 2006). También existe fuerte evidencia de conectividad cerebral estructural y funcional atípica mostrando hipo conectividad a gran escala entre muchas regiones en estado de reposo, aunque también se reporta hiper conectividad entre regiones subcorticales (talámicas, ganglios basales), y regiones corticales sensoriales y motoras primarias (Di Martino et al., 2014), así mismo, Green y cols.(2015), por medio de resonancia magnética funcional (fMRI) encontraron una correlación positiva entre los

autorreportes de sensibilidad sensorial y la actividad cortical inducida por estímulos táctiles en la corteza somatosensorial.

1.3 Modelos animales del TEA

El estudio del TEA ha enfrentado grandes retos por la imposibilidad de estudiar las células nerviosas funcionales en cerebros humanos, sin embargo, los diversos modelos animales experimentales genéticos o ambientales han demostrado exhibir conductas típicamente relacionadas con los síntomas centrales del TEA. De tal suerte que los modelos animales han sido una aproximación muy robusta para el estudio de la neurobiología del TEA (Kaiser, T et al., 2017; Feng, et al., 2020).

La identificación de las mutaciones genéticas en humanos relacionadas con el TEA, han permitido el desarrollo de modelos animales que emulan los principales síntomas conductuales y cognitivos tales como la mutación en el gen Shank1 y Shank3B relacionados con Phelan-McDermid, la mutación Cntnap 2 relacionada con el síndrome Pitt-Hopkins y el gen Fmr1, relacionadas con el Síndrome de X Frágil. Pero también se han reconocido factores ambientales que aumentan la probabilidad de padecer un TEA (Sandin, 2014) y gracias a ello se han podido producir modelos animales ambientales, como el modelo murino inducido por metales pesados (Hill et al., 2015), el modelo de TEA inducido por clorpirifos (Lan et al., 2017) y el modelo inducido por ácido valproico (VPA) (Lauber, 2016), los cuales suelen asociarse como posibles causas de los TEA-i (Moore et al., 2000; Williams et al., 2001; Rasalam et al., 2005).

1.4 Modelo murino de TEA inducido por ácido valproico

El VPA es un antiepiléptico y estabilizador del estado del ánimo (Löscher, 2002; Lamber, 1975), usado para tratar convulsiones, migrañas y trastorno bipolar. Sus efectos se observan sobre los niveles de GABA en el sistema nervioso central, como bloqueador de canales iónicos activados por voltaje e inhibiendo la histona desacetilasa (Rahman y Nguyen, 2020). Su relevancia en el TEA tiene su origen en el ámbito clínico. Cuando las mujeres embarazadas padecían ataques epilépticos, se les solía recetar VPA para aminorar las convulsiones, sin embargo, los bebés nacían con una serie de malformaciones, problemas cardíacos, respiratorios, gástricos, defectos en el tubo neural

y alteraciones conductuales y cognitivas consideradas dentro del TEA (Clayton-Smith, 1995; Ornoy, 2009; Shallcross et al., 2011).

Dicha evidencia científica, se ha tomado de ventaja para la implementación del modelo de TEA inducido por VPA en roedores. Esto se logra con la administración de una única dosis de VPA que varía de 300 a 800 mg/kg de VPA (Favre et al., 2013), durante los primeros días de gestación de hembras preñadas.

En estas condiciones, las crías desarrollan fenotipos y conductas que se relacionan con el repertorio de las manifestaciones del TEA, tales como: conductas repetitivas (Kang y Kim, 2015), dificultades en la interacción social (Felix-Ortiz y Febo, M., 2012), alteraciones en la comunicación (Kuo y Liu, 2017) y alteraciones sensoriales (Favre, 2013, Gouda, 2022). Revisiones exhaustivas han demostrado un vínculo positivo entre el VPA y el TEA (Rouillet et al., 2013; Chomiak et al., 2013), los cuales enfatizan la validez y robustez del modelo para estudiar las bases neurobiológicas del TEA (Mabunga et al., 2015; Nicolini y Fahnestock, 2018).

1.4.1 Vías de procesamiento somatosensorial

El procesamiento somatosensorial en el ratón está dado por una serie de relevos que involucran vías particulares para la percepción del rostro y las vibrisas, y el resto del cuerpo; así como el tipo de estimulación que se procesa, táctil, nociceptiva, propioceptiva o térmica. Está bien documentado que mucha de la información táctil en los roedores proviene de las vibrisas debido a su papel crucial en conductas como la navegación, el reconocimiento de objetos y las interacciones sociales (Sofroniew y Svoboda, 2015). La información de cada bigote viaja al ganglio trigeminal y se sigue finamente por cuatro vías principales, lemniscal, lemniscal dorsal, extralemniscal y paralemniscal a grupos de neuronas topográficamente localizados en tronco encefálico, el tálamo, específicamente el núcleo ventral posteromedial (VPM) y el núcleo posterior medial (POm), y en la corteza somatosensorial primaria (S1) donde se encuentra la corteza de barriles (Figura 3) (Pouchelon et al., 2015, Feldmeyer, 2012), los cuales se componen de aferentes talamocorticales agrupados, donde cada uno de ellos representa la información de un

bigote individual lo cual proporciona especificidad y un muestreo amplio de la información del ambiente (Petersen, 2007; Aronoff, et al., 2010; Li y Crair, 2011)

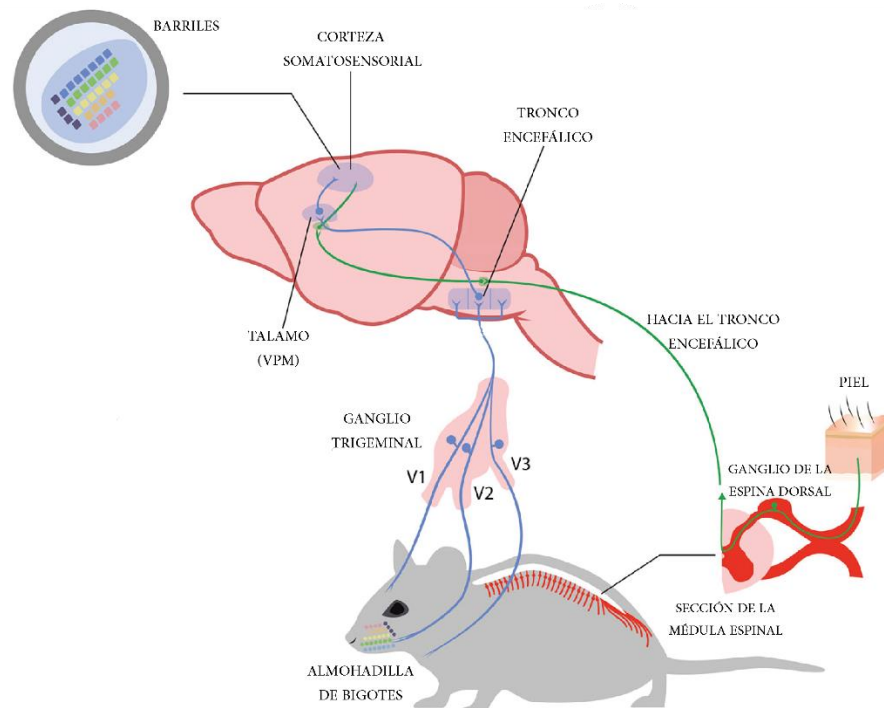


Figura 2. Esquema ilustrativo de las vías de procesamiento de información somatosensorial. El esquema muestra el origen anatómico de la información sensorial, los principales relevos del sistema nervioso periférico y su correspondencia con regiones del sistema nervioso central. En color azul se representa la información proveniente del rostro y las vibrisas, y en verde la información que proviene del resto del cuerpo. Tomado y editado de Balasco et al. 2020.

Por otro lado, la información somatosensorial proveniente de resto del cuerpo (Figura 3) empieza su recorrido por los receptores de la piel, ya sea que reciban información mecánica, térmica o química, se dirigen al ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal. Las neuronas de este ganglio envían sus proyecciones axonales al prosencéfalo, la protuberancia, el mesencéfalo y el bulbo raquídeo (Feil y Herbert, 1995; Li et al., 2006), para posteriormente proyectarse contralateralmente hacia el núcleo ventral posterolateral del tálamo (VPL) o el VPM, los núcleos talámicos del grupo posterior (Po), el núcleo talámico triangular posterior (PoT) y núcleos talámicos parvicelulares posteriores ventrales (VPPC) (Al-Khater, 2008; Gauriau y Bernard, 2004; Lund y Webster, 1967), para finalmente llegar a las regiones corticales somatosensoriales S1 y S2 (Wang et al., 2022).

1.4.2 Alteraciones somatosensoriales en el modelo de TEA inducido por VPA

La evidencia a nivel conductual ha demostrado que en ratas macho evaluadas a los 60 y 90 días después de nacer (DPN 60, DPN 90), se observan latencias más largas de retirada de las patas a una placa caliente, sugiriendo hiposensibilidad (Juybari et al., 2020; Markram et al., 2008). En otro estudio con ratas, se encontró un umbral aumentado ante estímulos nociceptivos térmicos en ratas adolescentes (DPN 30 – 50) y en ratas adultas (DPN 90 – 120), en consonancia con un perfil hiposensible. Sin embargo, ante la estimulación mecánica se encontró un umbral táctil disminuido en ratas adolescentes, lo que indicaría hipersensibilidad (Schneider et al., 2005), por lo que no queda claro que perfil somatosensorial exhiben las crías de ratas expuestas a VPA in útero.

En relación a lo anterior, ratones expuestos a VPA durante la gestación evaluados en DPN 30, exhibieron un perfil hipersensible a la estimulación de las vibrisas (Fontes-Dutra, 2018). Pero en el estudio de Gouda y cols. (2022), los ratones de DPN 38, mostraron una latencia aumentada en la retirada de la pata ante una superficie caliente lo que es consistente con un perfil hiposensible (Figura 3).

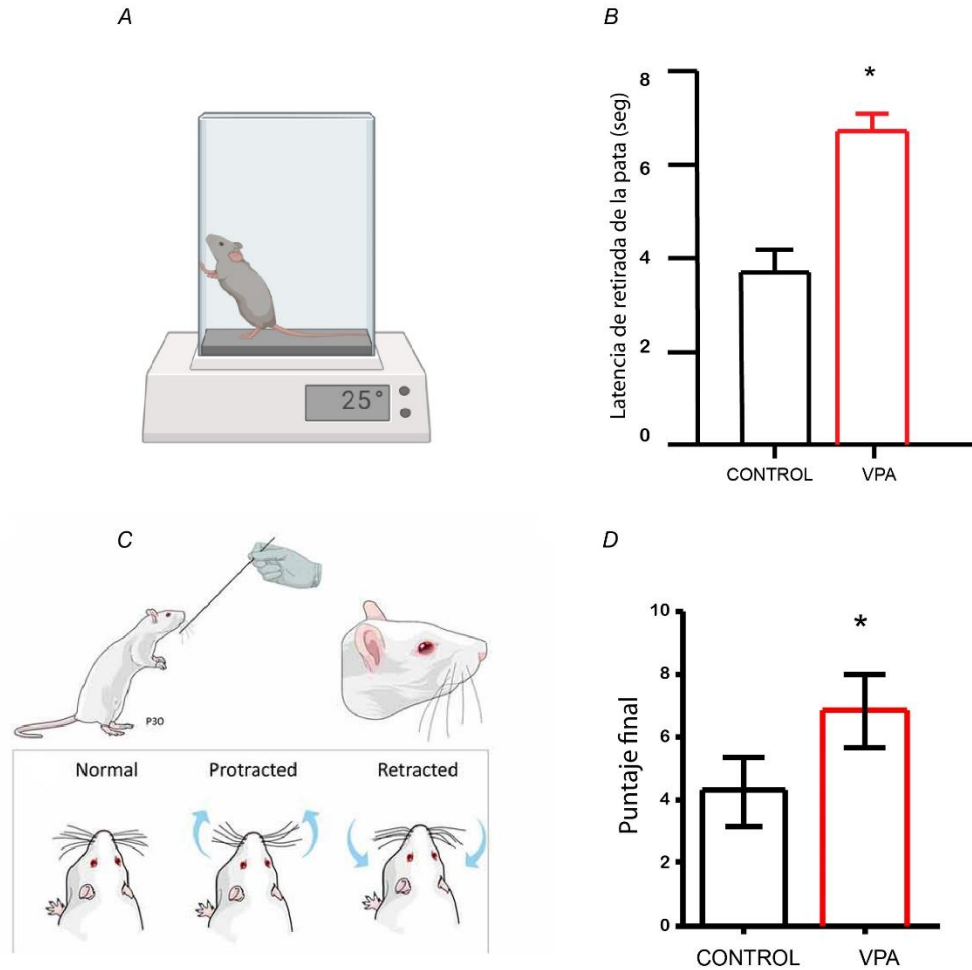


Figura 3. Evidencia inconcluyente sobre el perfil somatosensorial del modelo de VPA. A) Representación gráfica del medidor de analgesia de placa caliente de Eddy. **B)** Latencia de retirada de la pata a la placa caliente, se observa una mayor latencia en el grupo VPA, lo que sugiere hiposensibilidad. **C)** Representación de la prueba de molestia de bigotes, en la cual se puntúa de acuerdo a una escala de conductas, el puntaje total es una medida de sensibilidad. **D)** Puntaje final de la prueba molestia de bigotes, los ratones con VPA con un mayor puntaje muestran hipersensibilidad. Tomado y editado de Gouda et al., 2022 y Fontes-Dutra, 2018.

Considerando los pocos estudios sobre las alteraciones somatosensoriales en este modelo, aún no hay claridad si el perfil somatosensorial se ajusta a la hipersensibilidad, a la hiposensibilidad o coexisten ambos y se manifiestan dependiendo de la vía estimulada y la naturaleza del estímulo, ya sea térmica o mecánica, y si es en el rostro, en las vibrisas o en las patas

1.5 Neurobiología de las alteraciones sensoriales del TEA

A nivel neurobiológico, la evidencia actual apoya la hipótesis del desbalance excitación/inhibición (Desbalance E/I) planteada por primera vez hace casi 20 años (Rubenstein y Merzenich, 2003; actualizada por: Sohal y Rubenstein, 2019). Esta hipótesis plantea alteraciones en el sistema GABAérgico lo que conduce a una excitación excesiva o descontrolada del sistema glutamatérgico creando un desbalance en el equilibrio E/I e irrumpiendo la diferenciación funcional en el desarrollo. Desde este panorama, la actividad excesiva del glutamato podría relacionarse con una respuesta neuronal más fuerte a los estímulos y relacionarse con la hipersensibilidad, sin embargo, la respuesta también sería más ruidosa o variable porque es menos aguda. La falta de agudeza o de codificación neuronal dispersa (Figura 4), podría llevar a menor sensibilidad para discriminar o detectar estímulos y por lo tanto reflejar hiposensibilidad (Ward, 2019). Cabe mencionar que en años recientes se han descrito resultados del desbalance de la E/I en varios de los modelos animales de TEA (Bozzi, 2018, Chen, 2020) incluido el modelo inducido por VPA.

Algunos estudios han demostrado que altos niveles del neurotransmisor GABA en la corteza sensoriomotora, se correlacionan con una mejor discriminación de estímulos táctiles y visuales (Puts et al., 2011), lo cual sugiere que el GABA participa en la codificación neuronal al reducir la relación señal/ruido y afinar la respuesta neuronal (Isaacson y Scanziani, 2011), permitiendo una ganancia sensorial de la señal del estímulo (Allen et al., 2014).

La inhibición y excitación se sincronizan de manera dinámica (Anderson et al., 2000; Okun et al., 2008), para dar lugar a una configuración específica de actividad neuronal que codifica estímulos sensoriales, por ejemplo, en la corteza visual de gato, o en la corteza somatosensorial de rata, se ha descrito un aumento en de la actividad neuronal excitatoria, seguido de una sincronización de neuronas inhibitorias (Wehr, 2003, Wilent, 2005;). Por lo tanto, el papel de la inhibición cortical va más allá que ser el freno de la excitación o prevenir la actividad epiléptica. Las deficiencias en este sistema pueden conducir a alteraciones en el procesamiento y percepción de la información sensorial.

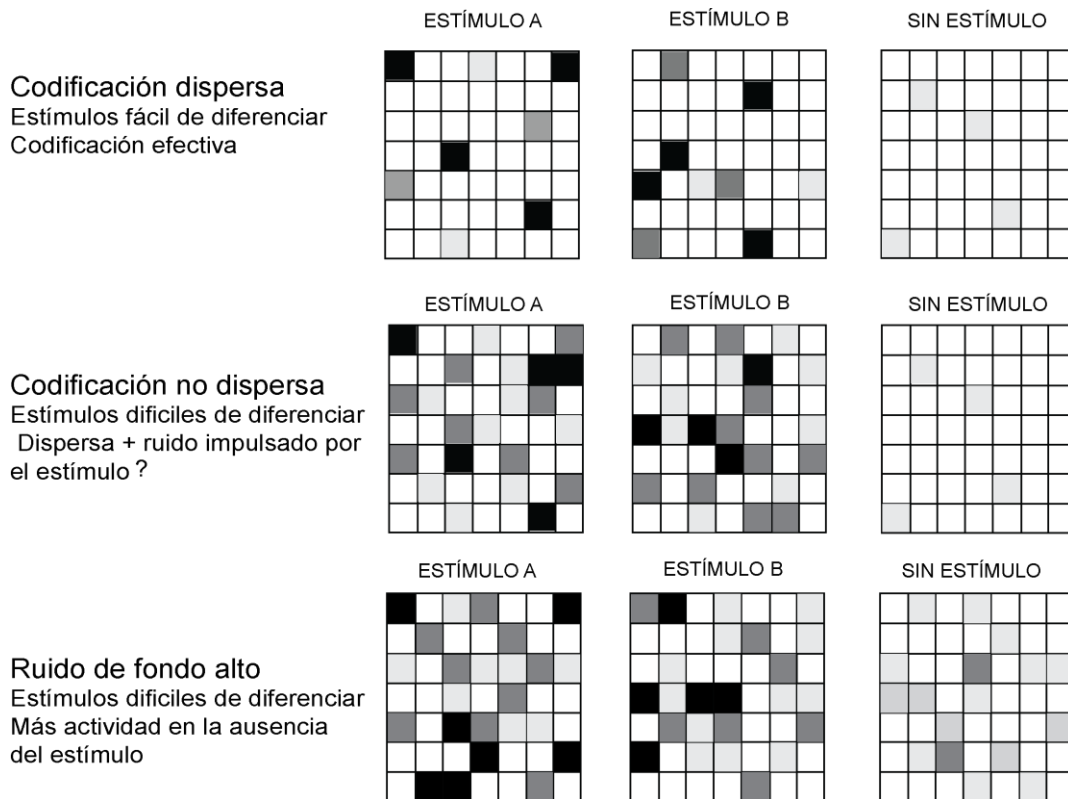


Figura 4. Respuesta neuronal a diferentes estímulos (A y B) y a la ausencia de un estímulo en tres escenarios distintos. Los cuadrados representan neuronas individuales, la graduación de grises a negro representa el grado de activación de las neuronas involucradas en la codificación del estímulo, o en su caso, de la actividad intrínseca del sistema (ruido de fondo). **Fila superior:** La codificación dispersa y un bajo ruido de fondo, facilita la discriminación y detección de estímulos permitiendo una codificación efectiva de la información. **Fila central:** La codificación no dispersa hace que los estímulos sean más difíciles de detectar o discriminar porque el propio estímulo genera ruido, a pesar de que el ruido de fondo es bajo. **Fila inferior:** La codificación con un alto ruido de fondo dificulta detectar o discriminar estímulos porque hay más actividad en ausencia del estímulo, por lo que la actividad impulsada por entrada de información no representa un cambio notable (Tomado y editado de Ward, 2019).

1.5.1 Modulación sistémica del sistema GABAérgico en el TEA

En modelos animales de TEA, se han encontrado resultados similares ante la modulación GABAérgica. Por ejemplo, ratones con mutaciones en el gen FMR1 tratados con arbaclofeno, un agonista selectivo de receptores GABA-B, mostraron una mejora en las conductas repetitivas y una mejora en la hiperactividad (Pacey et al., 2009). Por otra parte, se han evaluado el efecto terapéutico de las dosis bajas, no sedantes, de benzodiazepinas y clonazepam, las cuales aumentan la transmisión GABAérgica. Estos

estudios, describen una mejoría en la evaluación de la interacción social, el aprendizaje y la memoria espacial en ratones BTBR (Han et al., 2014). Sin embargo, no hay estudios que evalúen la modulación GABAérgica en neuronas específicas, en una región cerebral particular y cuál es su impacto en las alteraciones sensoriales.

Algunos estudios en humanos han explorado los efectos de la modulación del sistema GABAérgico para evaluar el impacto que tiene sobre los síntomas del TEA. Por ejemplo, a través del uso del acamprosato, el cual es un homólogo del neurotransmisor GABA (Kalk y Lingford-Hughes, 2014, Brondino et al., 2016), se observó mejoría en la sintomatología de déficits sociales además de reducir la hiperactividad que presentaba el grupo de pacientes con TEA-i (Erickson et al., 2011). Por otra parte, el arbaclofeno fue probado en 150 pacientes con TEA y se encontraron algunas mejoras en los déficits sociales (Veenstra-VanderWeele et al., 2013). Adicionalmente, la bumetanida, “antagonista del cotransportador de cloruro NKCC1” que potencia la inhibición mediada por el neurotransmisor GABA (Brondino et al., 2016), ha demostrado efectos positivos en pacientes con TEA en los puntajes de la Escala de calificación de autismo infantil (CARS), conductas repetitivas y reconocimiento de emociones faciales (Lemonnier y Ben-Ari, 2010; Lemonnier et al; 2012; Hadjikhani et al, 2013).

1.5.2 Interneuronas inhibitorias

En el cerebro, la principal fuente de inhibición del circuito cortical son las interneuronas GABAérgicas, y a pesar de que alrededor del 20 al 30% de neuronas en la corteza son interneuronas inhibitorias, existe una gran diversidad de morfologías, propiedades fisiológicas, sinápticas y moleculares (Markram et al., 2004) (Figura 5). Al identificar a las interneuronas por sus propiedades moleculares, se ha observado que aproximadamente el 40% de ellas, expresa la proteína de unión a Ca⁺, Parvalbumina (PV), mientras que el resto se divide en interneuronas que expresan el péptido Somatostatina (SST) ~30% y el receptor a Serotonina (5HT_{3aR}) ~30% (Rudy et al., 2011).

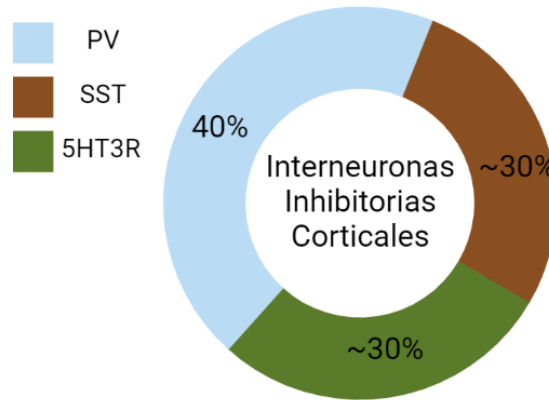


Figura 5. Porcentaje de interneuronas GABAérgicas en la corteza somatosensorial primaria (S1). El análisis se llevó a cabo por medio de una línea de ratones transgénicos que expresan EGFP en las neuronas con el receptor 5HT3R (ratones 5HT3aR-BAC^{EGFP}) y el marcaje de Parvalbúmina (PV) y Somatostatina (SST). La expresión de proteínas PV y SST define dos grupos independientes de interneuronas GABAérgicas y junto a las interneuronas que expresan el receptor 5HT3R representan el 100% de las interneuronas en S1. Además, tiene orígenes embriológicos distintos. Tomado y editado de Rudy et al., 2011.

Las neuronas que expresan el receptor 5HT3aR son una amplia clase de interneuronas que provocan inhibición y desinhibición local y están altamente presentes en la capa I de la corteza (Genescu y Garel, 2021). Además, coexpresan en todas las interneuronas la Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) en la corteza somatosensorial (Lee et al., 2010). Aunque no hay evidencia de alguna implicación directa en el TEA, estudios de la capa 1 en la corteza de barril han demostrado una participación importante y temporalmente precisa, ante la estimulación de los bigotes de ratones (Fan et al., 2020).

Por otro lado, las interneuronas SST se asocian comúnmente a las células de Martinotti la cuales abundan en mayor proporción en la capa V y arborizan la capa I (Rudy et al., 2011). En la corteza somatosensorial, un tercio de ellas expresa la proteína calretinina (Xu et al., 2006).

En el modelo genético de TEA, inducido por la mutación del gen que codifica la fosfatasa PTEN, se ha observado una reducción de las interneuronas SST lo que produce alteraciones en el equilibrio E/I y un aumento en la proporción de interneuronas PV (Vogt et al., 2015).

Sin embargo, la evidencia más frecuente y robusta apunta hacia alteraciones de las interneuronas PV, a continuación, se describirán las propiedades e implicaciones de estas interneuronas en el TEA.

1.5.2.3 Interneuronas PV

Las interneuronas corticales que expresan la proteína PV se caracterizan por tener propiedades de disparo rápido que orquestan las oscilaciones gama (Hu et al., 2014; Sohal et al., 2009); son altamente sensibles a los potenciales presinápticos de neuronas piramidales, poseen la capacidad de inhibición de redes corticales locales y de largo alcance, y por tanto, juegan un papel preponderante en el balance E/I (Jouhanneau et al., 2018). Anatómicamente, poseen en la periferia de la membrana celular una red perineuronal de proteoglicanos con funciones de modulación iónica, barrera física y maduración neuronal (van't Spijker y Kwok, 2017); además de impulsar las trayectorias de los periodos críticos en áreas sensoriales primarias (Takesian y Hensch, 2013). La proteína PV es un modulador de Ca⁺ intracelular con cinética de liberación lenta, que favorece la generación de altas frecuencias de disparo neuronal y en la comunicación sináptica al modular la liberación del GABA de manera precisa y controlada (Filice et al, 2016; Schwaller, 2020).

Respecto a las alteraciones que se han reportado en el TEA en este tipo neuronal, las interneuronas PV+ se han visto afectadas al exhibir una disminución en la expresión de la proteína PV tanto en cerebros humanos en estudios postmorten (Hashemi et al., 2017) como en modelos animales genéticos (Filice et al., 2016; Deemyad et al., 2020; Lauber et al., 2018) y ambientales como el inducido por VPA (Lauber et al, 2016), lo que sugiere un mecanismo compartido y relevante para la fisiopatología del TEA (Yenkoyan et al., 2017). De manera interesante, la falta de la expresión de la proteína PV, conduce a la expresión de conductas estereotípicas y anomalías morfológicas relacionadas con el TEA (Wöhr et al., 2015).

De acuerdo con la descripción de las afectaciones del sistema GABAérgico en el TEA que se ha descrito tanto en humanos como en modelos animales, se devela la importancia de la modulación de la transmisión GABAérgica como potencial blanco terapéutico de los déficits sociales y la hiperactividad. Sin embargo, a la fecha no hay

estudios que se enfoquen en estudiar los efectos de la modulación GABAérgica para intervenir en los déficits somatosensoriales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El modelo murino de TEA inducido por VPA exhibe conductas y rasgos relacionados con el TEA, incluyendo alteraciones en el procesamiento sensorial y en el sistema GABAérgico. Actualmente no existe información concluyente respecto al perfil de sensibilidad táctil y se desconoce si puede ser recuperado mediante la modulación GABAérgica de la corteza somatosensorial.

2.1 Preguntas de Investigación

- ¿Cuál es el perfil somatosensorial del modelo murino de TEA inducido por VPA ante la estimulación táctil?
- ¿La modulación GABAérgica en la S1 recupera los déficits somatosensoriales en el modelo murino de TEA inducido por VPA?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Analizar el perfil somatosensorial del modelo murino de TEA inducido por VPA.
- Determinar el potencial terapéutico de la modulación GABAérgica en S1 para recuperar los déficits somatosensoriales.

3.2 Objetivos particulares

- Comparar la expresión conductual del perfil somatosensorial (hiposensible o hipersensible), ante la estimulación táctil del grupo de ratones control y el grupo de ratones expuestos a VPA prenatalmente.
- Evaluar la detección táctil ante la activación *in vivo* de receptores de diseño (hM3Dq) expresados en interneuronas GABAérgicas de la corteza somatosensorial en el modelo murino de TEA inducido por VPA.

4. HIPÓTESIS

- El modelo murino de TEA inducido por VPA presentará un perfil somatosensorial alterado. Y la activación de las interneuronas GABAérgicas de la corteza

somatosensorial *in vivo*, favorecerá la detección táctil en animales expuestos a VPA prenatalmente.

5. MÉTODO

5.1 Caracterización del modelo de TEA inducido por VPA

Animales

Todos los experimentos se realizaron bajo las pautas y lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (CICUAL-IFC, protocolo VLH151-19). Todos los animales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12:12 (luces encendidas 7:00 am), a temperatura controlada (22°C), 40% de humedad y con libre acceso a alimento y agua. En todos los grupos experimentales se procuró el mínimo número de animales para obtener significancia estadística.

Gestación en hembras

Para la obtención de hembras gestantes se pusieron cruces de la cepa C57BL/6, de 2 a 4 meses de edad. Previamente al establecimiento de las cruces, se verificó la fertilidad y/o receptividad de apareamiento de las hembras por medio de un frotis vaginal (Cora et al., 2015, McLean et al., 2012; Champlin et al., 1973) o inspección visual (Byers et al., 2012; Ekambaram et al., 2017). Una vez que se identificaron a las hembras en etapas estrales fértiles, se colocó una caja de apareamiento que contenía dos hembras y un macho por un periodo de 12 horas. Posterior al periodo de apareamiento, se realizó una exploración visual del conducto vaginal para identificar el tapón vaginal. Adicionalmente, se mantuvo un control de peso cada 4 días desde el día del apareamiento, hasta el día 12 de gestación. Las hembras que fueron preñadas exhibieron una ganancia de peso de 3 a 5 gr a los 8 días posteriores al día de apareamiento (Heyne et al., 2015). Todos los animales que se utilizaron en este protocolo contaron con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Establecimiento del modelo de TEA inducido por VPA.

Las hembras gestantes, recibieron una inyección subdérmica a los 12.5 días de gestación de solución salina (Solución CS PISA, Cloruro de sodio al 0.9%), (Vehículo) o 450 mg/Kg de ácido valproico (Sigma Aldrich, número de producto: P4543). En este procedimiento se utilizaron agujas de 27G X 13 mm. Después de la inyección, las hembras se mantuvieron en observación por las siguientes cuatro horas y posteriormente se trasladaron al vivarium por los siguientes días con revisiones periódicas para supervisión del periodo gestacional e identificación del día de nacimiento de las crías.

5.2 Experimentos Conductuales para la validación del modelo

Evaluación de conductas fenotípicas en el autismo inducidas por VPA.

Con el fin de caracterizar las conductas fenotípicas en el modelo animal de TEA en los ratones neonatos, se realizaron evaluaciones conductuales dentro de los primeros 20 días. A continuación, se describen las conductas evaluadas:

Emisión de vocalizaciones ultrasónicas por separación materna.

Con el objetivo de evaluar los déficits en la comunicación a través de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas (VUS), cada ratón, se separó momentáneamente de su caja habitual y su madre, para ser colocado gentilmente en un vaso de precipitados de 1L. El vaso de precipitado y el ratón neonato se colocaron dentro de una caja de aislamiento sonoro con un micrófono ultrasónico colocado al centro de la caja de aislamiento y que es capaz de detectar frecuencias sonoras de hasta 384 KHz (ULTRAMIC 384K EVO). En estas condiciones se realizaron grabaciones de audio de 5 minutos de cada una de las crías que se separan momentáneamente de la madre. Durante el registro, las crías y la madre que no están siendo evaluadas, se mantuvieron en un cuarto distinto al cuarto de registro de vocalizaciones ultrasónicas. Al término del registro, las crías se regresaron cuidadosamente al nido junto con su madre y posteriormente se alojaron en el vivarium, hasta el siguiente día de evaluación postnatal. Con esta evaluación se pretendió describir las posibles diferencias en las vocalizaciones ultrasónicas en los ratones expuestos a VPA durante el periodo gestacional. Los audios fueron registrados por medio del Software Audacity (Figura 7E) y se analizaron los datos en el software DeepSqueak (Coffey et al., 2019), (Figura 7F), un sistema basado en aprendizaje profundo para la

detección y análisis de vocalizaciones ultrasónicas (Coffey et al., 2019). Esta prueba se realizó el día 8 postnatal.

Reconocimiento de nido familiar

Con el objetivo de evaluar la percepción olfativa, cada ratón se separó momentáneamente de su caja habitual y su madre, para ser colocado gentilmente en el centro de una arena de acrílico de 20 X 40 X 20 cm (ancho, largo y alto), que contiene dos cajas Petri, una con aserrín estéril y otra con aserrín proveniente de su caja habitual, en ambos casos se colocan 6 gr de aserrín. En esta evaluación se realizó una videograbación de 3 minutos de exploración libre de la arena. Al término del registro, las crías se regresaron cuidadosamente al nido junto con su madre y posteriormente se alojaron en el vivarium, hasta el siguiente día de evaluación postnatal. Con este experimento se buscó describir las posibles diferencias en la percepción olfativa de reconocimiento del nido familiar en los ratones expuestos a VPA durante el periodo gestacional, ya que la conducta esperada es buscar y permanecer en la caja Petri con el aserrín de su caja habitual. Esta prueba se realizó a los 12 días postnatales.

5.3 Experimentos Conductuales para la evaluación del perfil sensorial

Prueba de remoción de cinta

Con el objetivo de evaluar el perfil somatosensorial, se colocó una cinta micropore en el puente de la nariz y se contabilizó el tiempo que transcurre para que el animal se retire por sus propios medios la cinta adhesiva.

En esta prueba, se utilizó una arena de acrílico de 20 X 20 X 20 cm (ancho, largo y alto). Como primer paso, los ratones exploraron libremente la arena durante 5 minutos para su habituación. Después, los ratones fueron sujetados gentilmente para restringir el movimiento y colocar un cuadro de cinta micropore de 5 X 5 mm aproximadamente en la frente. Posteriormente, se colocó al ratón en la arena y se analizó el tiempo que tarda en percibir la cinta en su cara, y el tiempo que tarda en quitarse la cinta. Con esta prueba se pretendió evaluar la somatosensación y actividad motora en ratones expuestos a VPA durante el periodo gestacional. Esta prueba se realizó entre los 20 y 40 días postnatales.

Prueba de estimulación de patas traseras por aire a presión

Con el objetivo de evaluar el perfil somatosensorial, se administraron ráfagas de 200 ms de aire comprimido en las patas traseras del animal a través de un micro inyector. Para ello, se utilizó una plataforma de acrílico de 20 X 20 X 20. En la cara de arriba, una malla sostiene una caja más pequeña de 6 X 10 X 5 en donde se colocó al ratón. Debajo de la malla, se colocó un estimulador que se conecta a un dosificador de aire Narishige IM-300 Micro inyector conectado a un tanque de aire INFRAMEDIC. Se administraron estímulos de las siguientes intensidades 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8, 10, y 12 PSI, al menos 3 veces cada estímulo.

Durante el momento en que el ratón colocó alguna de sus patas traseras dentro de la zona de interés, se estimuló por medio del dosificador de aire a diferentes intensidades. La intensidad de los estímulos se entregó de manera aleatoria. Esta tarea consistió en observar la probabilidad de respuesta del ratón (retirada de la pata trasera o respuesta de sobresalto) ante la estimulación de manera cuantitativa. Esta prueba se realizó entre los 20 y 40 días postnatales.

5.4 Manipulación de la conducta en vivo

Cirugía estereotáxica y expresión de receptores de diseño (hM3Dq)

Para la expresión de receptores de diseño en la corteza somatosensorial primaria, se realizó una cirugía estereotáxica en condiciones asépticas dentro de una campana de extracción, con acceso al aparato estereotáxico. Los ratones fueron profundamente anestesiados con ketamina (30 mg / kg, ip; Anesket) y xilazina (3 mg / kg, ip; Rompun; Bayer), así como con anestesia local (lidocaína). Posteriormente, el cráneo fue expuesto en condiciones antisépticas. A los ratones se les inyectó bilateralmente un volumen de 180 nl de virus adeno-asociados (VAA) que contienen secuencias de DNA que codifican para receptores de diseño (hM3Dq), fusionado con proteínas fluorescentes (dTomato), bajo el promotor genético (hDlx), mismo que sólo se expresa en las interneuronas GABAérgicas (Dimidschstein et al., 2016). Se inyectó en la corteza somatosensorial utilizando las siguientes coordenadas a partir de bregma: AP -.5 y -1, ML 2.7 y DV 2.5 con relación al cráneo. La incisión cutánea se cerró con Vetbond y se proporcionó cuidado postoperatorio por tres días consecutivos. Estos animales se mantuvieron en

observación por una semana, antes de considerarse para experimentos de conducta. Se permitió un periodo de 10 a 15 días para la expresión de las proteínas de diseño (hM3Dq y dTomato), antes de la experimentación.

Validación *in vitro* de la expresión de las proteínas de diseño y fluorescentes en Interneuronas GABAérgicas en el modelo murino de TEA inducido por VPA

Con el objetivo de validar la expresión de la proteína dTomato y la presencia específica de la proteína de diseño hM3Dq, se obtuvieron registros electrofisiológicos de célula única por medio de la técnica de patch clamp en la modalidad de fijación de corriente para evaluar la modulación de la excitabilidad de las interneuronas GABAérgicas a través de la activación del receptor hM3Dq por la exposición a CNO (10 μ m) en el modelo de TEA inducido por VPA. A continuación, se describirán los pasos necesarios para este procedimiento:

- Obtención de rebanadas

Para los registros electrofisiológicos *in vitro* se obtuvieron rebanadas coronales de cerebro de roedor de la siguiente manera: Se anestesió al animal con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 85ml/15ml por kg de peso) y se perfundió trans-cardialmente con una solución salina modificada con la siguiente composición (en mM): 225 sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 28 NaHCO₃, 7 glucosa, 1 ácido ascórbico y 3 piruvato (pH 7.4 con NaOH; saturado con 95% O₂ y 5% CO₂). Posteriormente se obtuvo el cerebro mediante decapitación. Se colectaron rebanadas coronales de 300 nm de espesor a 4^o C con ayuda de un vibratomo. Las rebanadas adquiridas se incubaron a temperatura ambiente por 40-60 minutos para el restablecimiento del tejido en líquido cefalorraquídeo artificial "LCA" (composición en mM: 123.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃ y 11.0 glucosa). Las soluciones se saturaron con 95% O₂ y 5% CO₂ en todo momento, posteriormente el tejido se trasladó a una cámara de registro a temperatura ambiente. Durante los experimentos se mantuvo una perfusión constante de LCA de 3 ml/min.

- Registros electrofisiológicos *in vitro*

Para el registro electrofisiológico de las células se empleó la técnica de patch clamp en la modalidad de célula entera ya sea en fijación de corriente o voltaje. Para ello, se observaron las neuronas con un objetivo de inmersión de 40X e iluminación infrarroja conectada a una cámara y un monitor. Se eligieron las neuronas con las características requeridas (interneuronas). Los registros se realizaron con un amplificador Multiclamp-700b (Axon instruments, Foster city, CA) y se almacenaron en un software para su análisis offline. Se usaron pipetas de borosilicato con una resistencia de 3-6 M Ω que contenían una solución interna compuesta de (en mM): 72 KH₂PO₄, 36 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP y 0.5% de biocitina.

Posterior al registro electrofisiológico, se fijó con paraformaldehído (4%) y ácido pícrico (1%) en buffer salino de fosfatos, (PBS) con un pH de 7.4 a 4°C por al menos 24 horas. Subsiguientemente se realizaron tres lavados de diez minutos cada uno y se incluye el tejido en sacarosa al 10% y 6%. Finalmente, todos los cortes se montaron en portaobjetos con medio de montaje para muestras con fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories). Esta preparación se realizó para la adquisición de imágenes de microscopia confocal. Todas las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Confocal Zeiss LSM800 (Zeiss, Göttingen, Alemania). En el cual se obtuvieron imágenes de 1024 X 1024 pixeles que fueron exportadas en formato de archivo TIFF.

- **Farmacología *in vitro***

Con el objetivo de validar la expresión y función del receptor de diseño hM3Dq (Receptor acoplado a proteína Gq modificado), se registró la modulación del receptor por medio de la administración de 10 μ M de Clozapine N-oxide. Tocris. No Cat: 4936 (CNO) "agonista específico de los receptores de diseño hM3Dq" a través del sistema de perfusión del equipo de registro electrofisiológico. Los registros obtenidos se utilizaron para verificar la modulación de la frecuencia de disparo de las interneuronas GABAérgicas (Identificadas por la expresión de la proteína fluorescente (dTomato) antes y después de la aplicación de CNO en la solución fisiológica de registro (LCA)

Evaluación conductual de la modulación *in vivo* de la transmisión GABAérgica de la corteza somatosensorial

Después de 7 a 10 días de expresión de las proteínas de diseño hM3Dq (Receptor acoplado a proteína Gq modificado), específicamente en las interneuronas GABAérgicas en la corteza somatosensorial primaria, y con el fin de evaluar el impacto conductual de la activación farmacológica de estos receptores sobre la conducta, se administró una dosis de 3.5 mg/kg de CNO diluida en 100 ul de solución salina (Solución CS PISA, Cloruro de sodio al 0.9%), vía intraperitoneal a los ratones que previamente fueron expuestos a la solución salina o al VPA durante el día 12.5 del periodo de gestación. Esta molécula sólo presentará interacción farmacológica con las neuronas que tengan expresado el receptor (hM3Dq), inducido por la exposición al virus “pAAV-hDlx-GqDREADD-dTomato-Fishell-4” (Dimidschstein et al., 2016; Sharma & Pienaar, 2018). Posterior a la inyección del fármaco, se dejó al ratón 15 minutos en su caja habitual para que el fármaco se una a su receptor de diseño y lo active. Posteriormente, se evaluó la prueba conductual de estimulación de patas traseras por aire a presión. En esta evaluación se utilizaron machos y hembras VPA tratados con CNO porque no encontramos diferencias significativas en la curva psicofísica ni en el umbral de detección táctil ante la presión de aire en las patas traseras entre sexos.

Para analizar las diferencias conductuales entre los grupos de las diferentes pruebas, se realizó la prueba no paramétrica para muestras independientes U de Mann Whitney. Para la obtención de las curvas psicofísicas, se realizó un ajuste Sigmoidal también llamada ajuste logístico de tres parámetros, la cual permite observar la respuesta conductual en función de la intensidad del estímulo, así como obtener los umbrales de sensibilidad a la presión de las patas por medio de la obtención de la estimulación mínima requerida para provocar una respuesta del 50% de probabilidad. En el caso de los análisis de los umbrales para el grupo CTRL, VPA y VPA + CNO, se realizó la prueba Kruskal-Wallis que es la versión no paramétrica del ANOVA. Ambas pruebas se realizaron por medio del programa estadístico Prism – GraphPad.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización del modelo de TEA inducido por VPA

Para caracterizar el modelo de TEA inducido por VPA, se identificó la presencia de dos conductas características de los síntomas centrales tales como: déficits en la comunicación y alteraciones sensoriales durante el desarrollo posnatal temprano. La figura 6 muestra la cronología de las evaluaciones conductuales, la cirugía estereotóxica e inyección de virus, así como la evaluación de la modulación *in vivo* de las interneuronas GABAérgicas durante la estimulación por presión de aire.

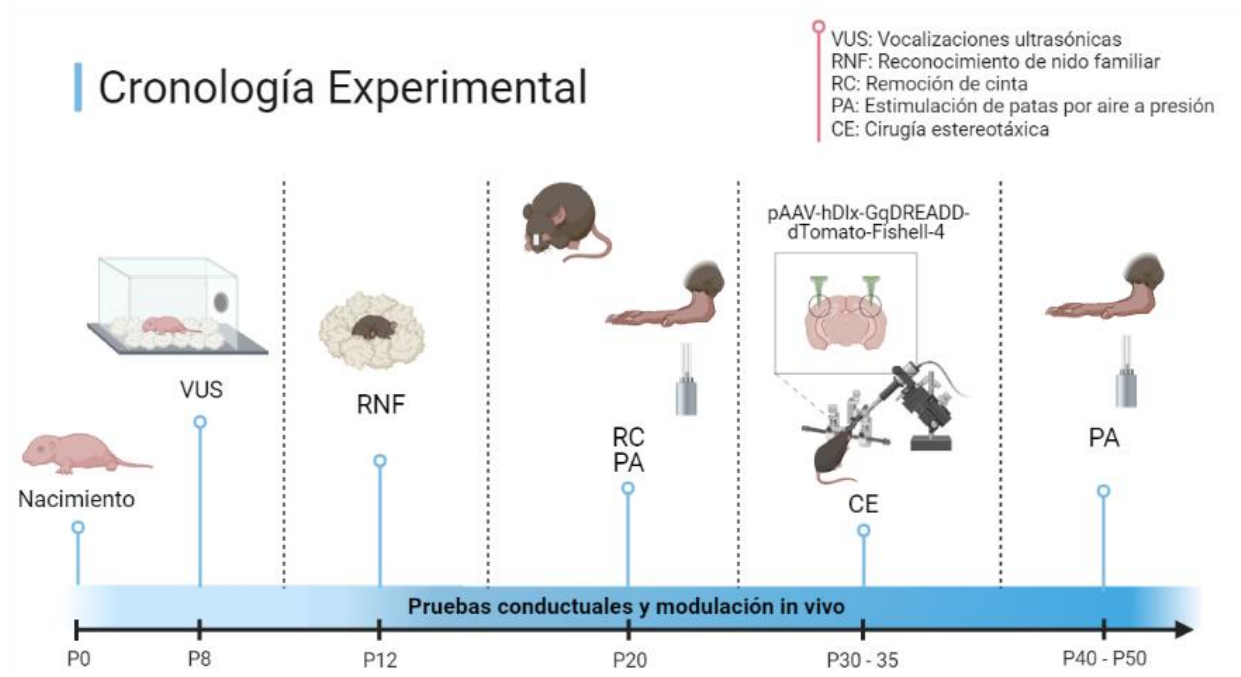


Figura 6. Cronología de pruebas conductuales, cirugía estereotóxica y modulación *in vivo*. *VUS:* Vocalizaciones Ultrasónicas. *RNF:* Reconocimiento del Nido Familiar. *RC:* Remoción de Cinta. *PA:* Estimulación por aire a presión. *CE:* Cirugía Estereotóxica. *P:* Día posnatal.

6.1.1 Déficit en la comunicación

Con el propósito de evaluar los déficits en la comunicación se realizó la prueba de Emisión de VUS por separación materna. Para este propósito se construyó una caja experimental (Figura 7A) la cuál fue cubierta en su interior con paneles de aislamiento acústico (Figura 7B). Se utilizó un sensor ultrasónico sensible al rango de frecuencias a las que vocalizan los ratones (Figura 7C), el ratón fue separado de la madre e introducido

gentilmente en un vaso de precipitados de 1L. El sensor se posicionó en medio del vaso de precipitados para adquirir las VUS (Figura 7D). Posteriormente, se llevó a cabo el registro del procesamiento de las señales adquiridas por medio de softwares especializados (Figura 7E y F).

Los resultados muestran diferencias significativas en distintas características de las VUS. El grupo VPA presentó un número significativamente mayor de llamadas (Figura 7G) durante el día posnatal 8 en comparación al grupo control (CTRL 200.9 ± 43.20 , VPA: 309.6 ± 37.46 ; $p = 0.0384$). También se encontraron diferencias significativas al evaluar el tiempo de inicio de las VUS (CTRL: 180.7 ± 14.89 , VPA: 136.8 ± 10.41 ; $p = 0.022$), (Figura 7H). Sin embargo, al analizar las frecuencias principales de las VUS en ambos grupos, no se encontraron diferencias (Figura 7I). Similar a otros trabajos (Picker et al., 2006; Scattoni et al., 2008, Tsuji et al., 2020), estos resultados indican la presencia de déficits en la comunicación en el modelo murino de TEA inducido por VPA.

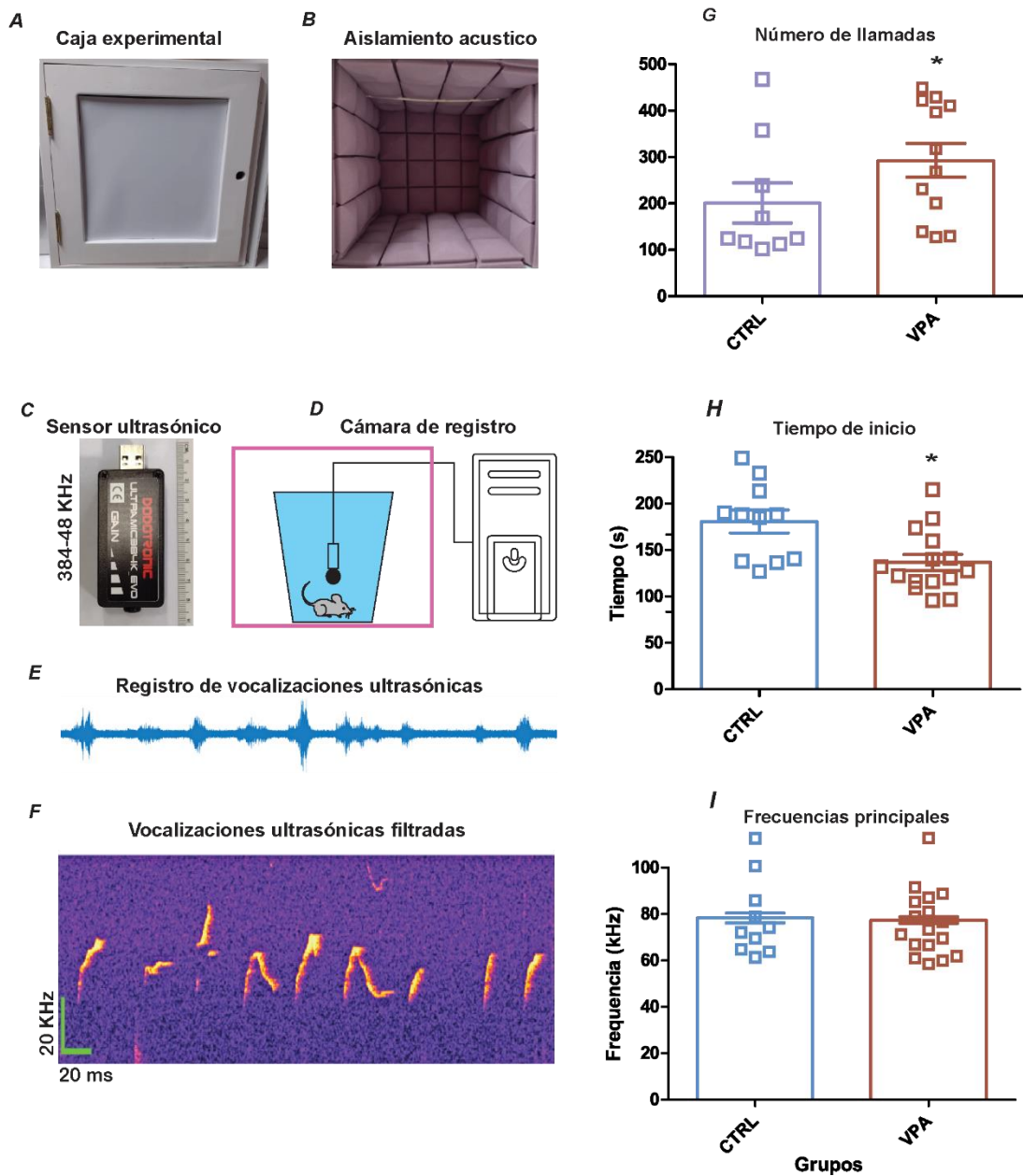


Figura 7. Déficits en la comunicación en el modelo inducido por VPA. **A)** y **B)** Caja experimental de aislamiento acústico para la grabación de las vocalizaciones ultrasónicas. **C)** Sensor Ultrasónico ULTRAMIC 384K EVO de la marca DODOTRONIC capaz de detectar frecuencias sonoras de hasta 384 KHz. **D)** Ilustración del ratón dentro de la caja experimental y la adquisición de las vocalizaciones. **E)** Registro bruto de las vocalizaciones en el software Audacity. **F)** Vocalizaciones Filtradas en el software DeepSquak. **G)** Número de llamadas, el grupo VPA ($n=13$) emite menos vocalizaciones que el grupo CTRL ($n=9$). **H)** Latencia de inicio de las vocalizaciones, el grupo VPA ($n=15$) tarda más tiempo en emitir la primera vocalización que el grupo CTRL ($N=11$). **I)** Frecuencias principales a las cuales vocalizan los ratones, no se encontraron diferencias entre el grupo VPA ($n=17$) y el grupo CTRL ($n=10$). Imágenes E y F tomadas de Coffey et al., 2019. Los resultados se presentan como media \pm S.E.M.

6.1.2 Alteraciones sensoriales

Para evaluar los déficits sensoriales, en particular el reconocimiento del nido familiar (RNF) a través del olfato, se llevó a cabo la "tarea de reconocimiento de nido familiar" que consiste en llenar dos cajas de Petri, una de ellas con aserrín estéril y la otra con aserrín tomado del nido de la caja habitual (Figura 8A). Ambas cajas de Petri se colocan en una caja experimental de acrílico con una separación de 20 cm y el ratón se coloca en el punto medio entre ambas cajas de Petri, los parámetros a medir son la latencia de llegada y la permanencia en el nido familiar (Figura 8B). Considerando que la conducta esperada en este paradigma es la elección del nido familiar, el ratón puede elegir dirigirse al nido familiar o al nido nuevo (Figura 8C), basándose en su orientación olfativa ya que, en esta edad del desarrollo, los ratones aun no presentan abertura palpebral (Figura 8D).

Se evaluaron un total de 18 ratones VPA y 16 CTRL. Sin embargo, respecto a la latencia de llegada al nido familiar, se consideran únicamente aquellos ratones cuya primera elección fue el nido familiar. Con este criterio de análisis solamente 9 ratones VPA y 7 CTRL eligieron en primera instancia dirigirse al nido familiar. Así mismo, en cuanto a la permanencia en el nido, solamente 11 ratones CTRL y 12 ratones VPA eligieron y se movilizaron hacia los nidos (Figura 8E). Por lo tanto, en los resultados se pudo observar una mayor latencia de llegada al nido familiar del grupo VPA en comparación al grupo CTRL (Figura 8F) (CTRL: 38.29 ± 6.26 , VPA: 74.33 ± 13.10 ; $p = 0.029$), pero no se observaron diferencias en el tiempo de permanencia en el nido familiar (Figura 8G). Estos resultados indican alteraciones sensoriales en el reconocimiento del nido familiar a través del olfato. Cabe mencionar que estos resultados son consistentes con investigaciones que utilizan este paradigma en el modelo murino de TEA inducido por VPA (Favre, 2013, Servadio, et al., 2016 y 2018; Melancia, et al., 2018; Tartaglione et al., 2019).

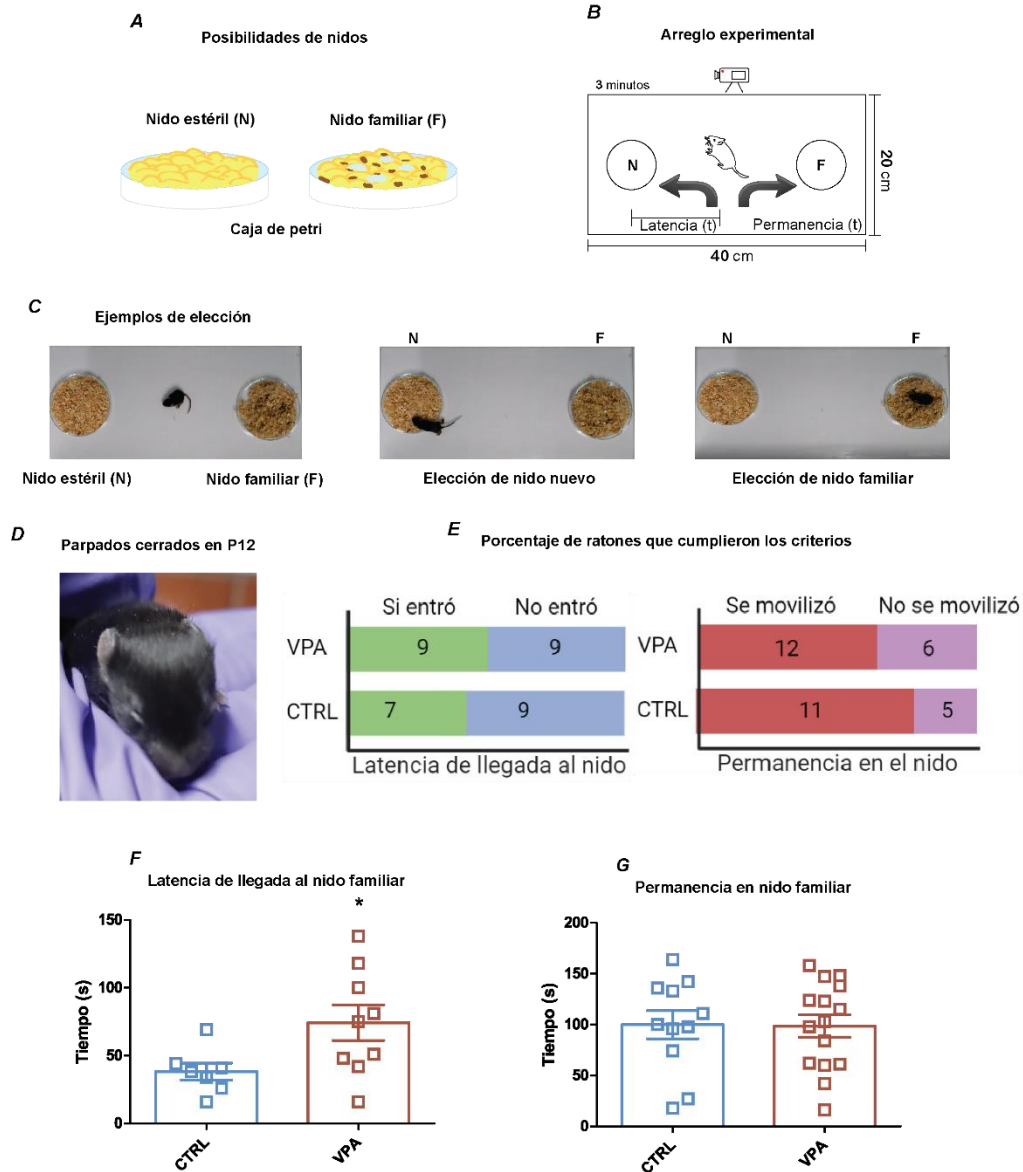


Figura 8. Alteraciones sensoriales olfativas en el modelo de TEA inducido por VPA. A) Posibilidades de elección de nido, las cajas de Petri son llenadas con 6 gr de viruta estéril o de su nido. **B)** Arreglo experimental, se cuenta la latencia de entrada a una de las cajas de Petri y la permanencia en ellos. **C)** Imágenes representativas de las posibles elecciones de los ratones. Derecha: comienzo de la prueba, Centro: elección del nido estéril, Izquierda; elección del nido familiar. **D)** Los ratones aún no abren sus párpados en el día posnatal 12, por lo que su conducta es guiada principalmente por el olfato. **E)** Número de ratones de ambos grupos que cubrieron los requisitos para analizar su conducta. **F)** Latencia de llegada al nido familiar, el grupo VPA (n= 9) se tarda más tiempo en llegar al nido familiar que el grupo CTRL (n= 7). **G)** Permanencia en el nido familiar, no hay diferencias en la permanencia en el nido familiar entre el grupo VPA (n= 15) y el grupo CTRL (n= 11). Los resultados se presentan como media \pm S.E.M.

6.2 Caracterización del perfil somatosensorial del modelo de TEA inducido por VPA

6.2.1 Prueba de Remoción de cinta en el rostro

Después de haber obtenido resultados experimentales que recapitulan los déficits de la comunicación y los déficits de la orientación en el laboratorio (USV: Kuo y Liu, 2017; Servadio, et al., 2018; Sanchez, 2019. RFN: Favre, 2013, Servadio, et al., 2016 y 2018; Melancia, et al., 2018; Tartaglione et al., 2019). Se procedió a desarrollar paradigmas conductuales para determinar el perfil somatosensorial táctil de este modelo.

Con este objetivo, se realizaron dos pruebas diferentes para evaluar de manera global el perfil somatosensorial táctil. Las pruebas son: remoción de cinta y la prueba de estimulación de patas traseras por presión de aire. La prueba “remoción de cinta”, consiste en habituar al ratón en la caja experimental durante 5 minutos (Figura 9A), después se sujeta al ratón gentilmente para colocarle un segmento de cinta micropore en el tabique nasal. Finalmente, se vuelve a poner en la caja experimental para la fase de evaluación (Figura 9B). Esta tarea permite analizar alteraciones en la percepción táctil y alteraciones motoras, a través del tiempo de contacto y el tiempo de remoción que le toma al roedor retirarse una cinta del rostro (Figura 9C).

Los resultados mostraron que el grupo VPA tuvo periodos de tiempo mayores para detectar la cinta en su rostro (Figura 9D) respecto al grupo control (CTRL: 9.60 ± 2.57 , VPA: 19.00 ± 2.32 ; $p= 0.023$). Pero no se observaron diferencias significativas en el tiempo de remoción (Figura 9E). Estos hallazgos indican que los ratones VPA presentan alteraciones en la percepción táctil pero no en el procesamiento motor para retirarse la cinta por lo que se descartan posibles alteraciones motoras importantes que pudieran sesgar los resultados referentes al perfil sensorial.

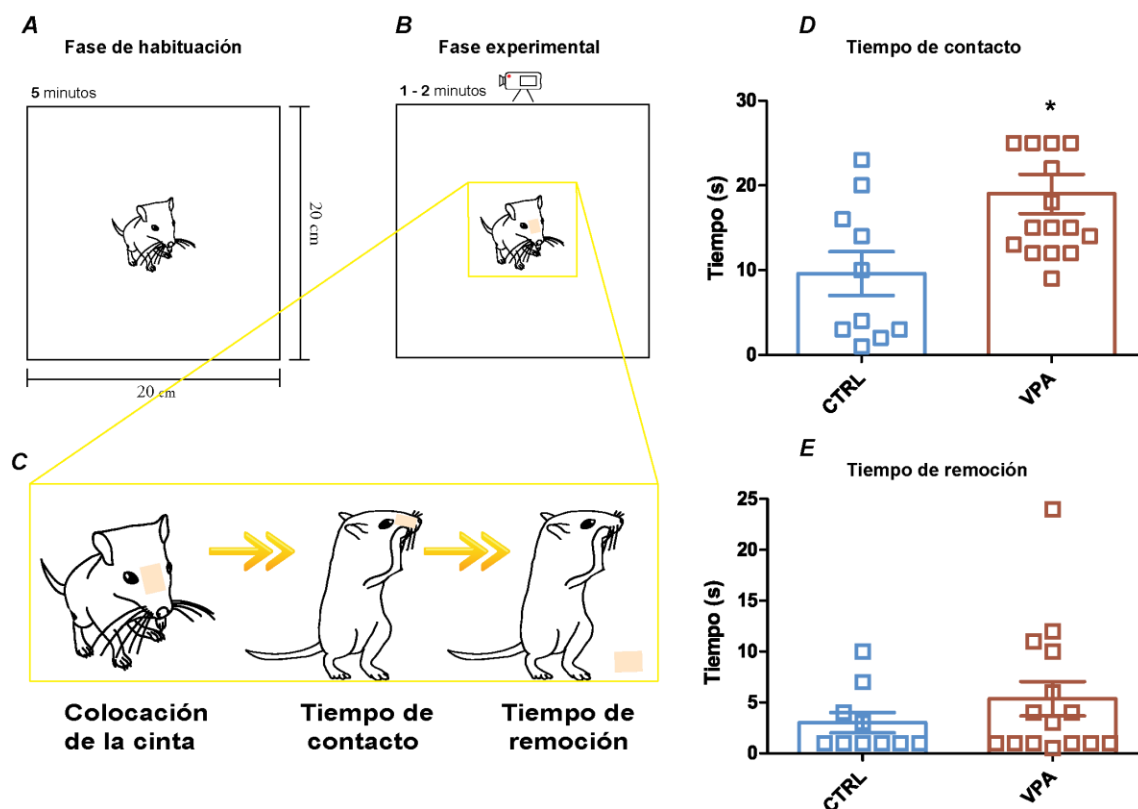


Figura 9. Alteraciones somatosensoriales en el modelo inducido por VPA. A) Fase de habituación de 5 minutos. **B)** Fase experimental en la cual se coloca al ratón con una cinta en el rostro. **C)** Parámetros medidos en esta prueba: Tiempo de contacto y Tiempo de remoción. **D)** Latencias de percepción de la cinta, el grupo VPA (n= 15) tarda significativamente más tiempo en advertir la cinta en su rostro que el grupo CTRL (n= 10). **E)** Latencias de remoción de la cinta en el rostro, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo VPA (n= 10) y el grupo CTRL (n= 15). Los resultados se presentan como media \pm S.E.M.

6.2.2 Prueba de estimulación de patas trasera por aire a presión

Con el objetivo de continuar evaluando el perfil somatosensorial, en un lugar distinto a la cara de los roedores, y con ello poder determinar el perfil de sensibilidad táctil, se utilizó una prueba de estimulación de las patas traseras por presión de aire.

Esta prueba se lleva a cabo en una caja elevada con una malla en la parte superior, donde se restringe y suspende el ratón (Figura 10A). Debajo de la malla se coloca un dosificador conectado a un microinyector de aire, por medio del cual, es posible estimular las extremidades del roedor a diferentes intensidades de presión (3.0 a 12 PSI), y de manera aleatoria, al tiempo que se registra y video graba su respuesta conductual (Figura 10B). Con este dispositivo se logró la obtención de una curva psicofísica de percepción

táctil y se obtuvieron los umbrales de detección de cada grupo (CTRL vs VPA) para comparar, y determinar su perfil de sensibilidad táctil.

Este análisis se realizó por medio de un ajuste Sigmoïdal también llamada ajuste logístico de tres parámetros, que permite observar la respuesta conductual en función de la intensidad del estímulo, así como obtener los umbrales de sensibilidad al aire a presión de las patas por medio de la obtención de la intensidad media requerida para provocar una respuesta del 50% de probabilidad.

El análisis de datos del grupo VPA mostró un desplazamiento de la curva hacia la derecha (Figura 10C) con diferencias significativas en las intensidades 5 PSI (CTRL: 0.71 ± 0.11 , VPA: 0.28 ± 0.09 ; $p= 0.018$) y la intensidad 5.5 PSI comparados con el grupo CTRL (CTRL: 0.83 ± 0.06 , VPA: 0.45 ± 0.08 ; $p= 0.005$). El coeficiente de determinación lineal para el grupo CTRL ($R^2= 0.9763$) y para el grupo VPA ($R^2 = 0.9835$) muestra que la bondad de ajuste del modelo a los datos es confiable.

Además, al comparar el umbral de detección táctil se encontró que es significativamente más alto en el grupo VPA (Figura 10D) que en el grupo CTRL (CTRL: 4.48 ± 0.23 ; VPA: 5.85 ± 0.22 ; $p= 0.001$). De acuerdo con estos resultados, el perfil somatosensorial táctil en el modelo murino de TEA inducido por VPA indica hiposensibilidad. El desplazamiento de la curva hacia la derecha y el umbral de detección más alto muestran que los ratones VPA necesitan mayor intensidad de estimulación para emitir una respuesta por encima del 50% de probabilidad de ocurrencia.

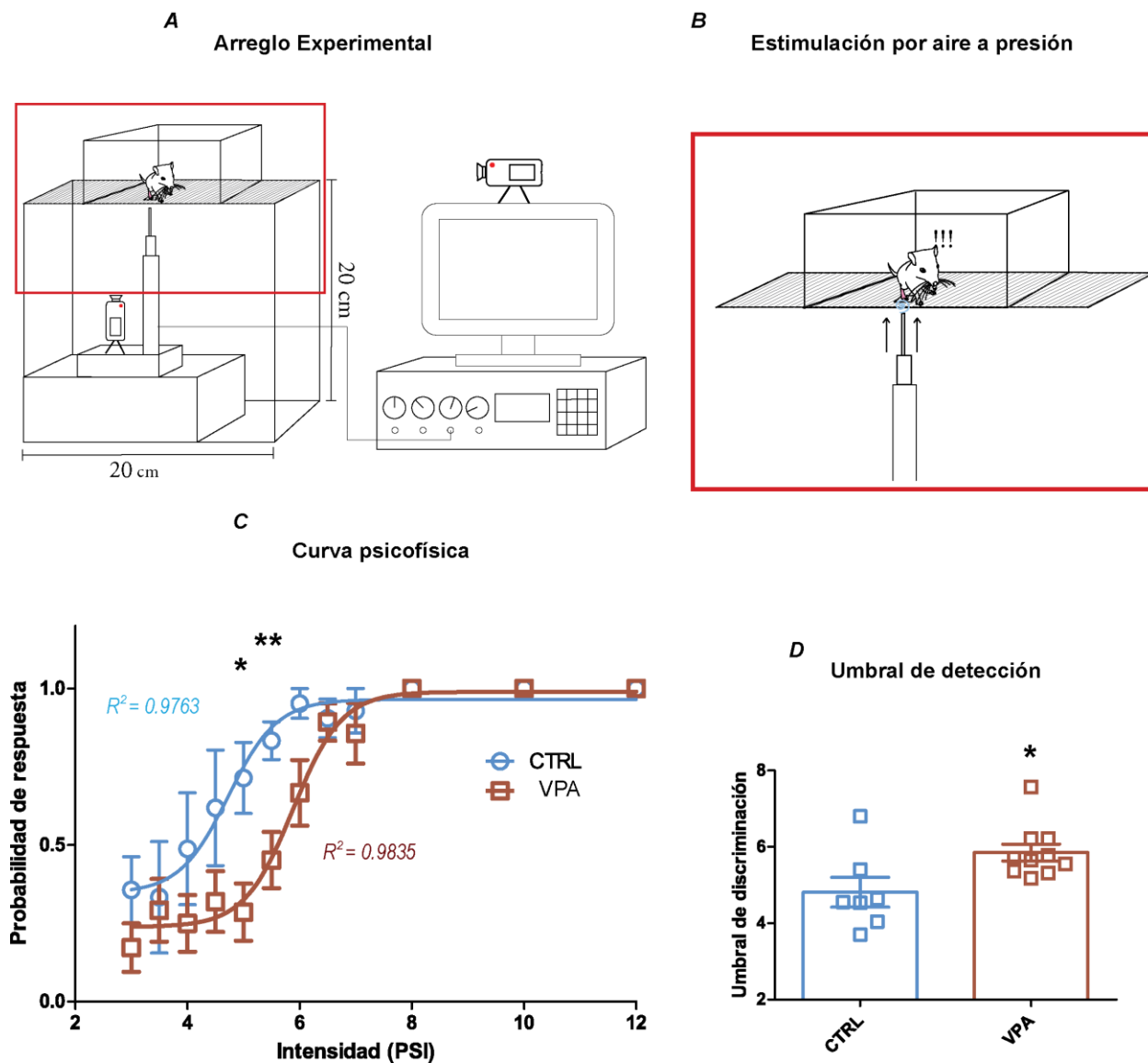


Figura 10. Perfil somatosensorial de hiposensibilidad en el modelo murino inducido por VPA. A) Esquema representativo del arreglo experimental, se observa al ratón, el estimulador y el equipo de adquisición de video. **B)** Ejemplo ilustrativo de respuesta ante la estimulación con aire. **C)** Curva psicofísica de cada grupo, se observa un desplazamiento a la derecha en la curva del grupo VPA ($n= 10$) comparado con el grupo CTRL ($n= 7$), además de diferencias significativas en las intensidades 5 ($p < 0.05$) y 5.5 psi ($p < 0.01$). **D)** Umbrales de detección por grupo, el grupo VPA ($n= 10$) presenta un umbral significativamente más alto a la estimulación de las patas traseras comparadas con el grupo CTRL ($n= 7$). Los resultados se presentan como media \pm S.E.M.

6.3 Modulación de la excitación neuronal *in vivo* de las interneuronas GABAérgicas y evaluación del perfil somatosensorial

6.3.1 Validación *in vitro* de la expresión de los receptores de diseño (hM3Dq y dTomato)

Después de analizar los resultados de la prueba de estimulación de patas trasera por aire a presión, mismos que indican una un perfil de hiposensibilidad (Figura 10) y considerando la hipótesis del desequilibrio E/I, que se ha reportado en el TEA (Rubenstein y Merzenich, 2003; Sohal y Rubenstein, 2019), la cual sugiere alteraciones a la baja en el sistema inhibitorio asociadas a la dificultad para el refinamiento de la percepción sensorial (Isaacson y Scanziani, 2011). Se estableció una estrategia para incrementar la transmisión GABAérgica a través de la modulación de la actividad celular de las interneuronas GABAérgicas en la corteza somatosensorial. Para ello se inyectó de manera bilateral 180 nl de virus adeno-asociados (VAA), que contienen secuencias de DNA que codifican para receptores de diseño hM3Dq fusionados con la proteína fluorescente dTomato bajo el promotor genético Dlx (AVV-Dlx-Gq-dTomato), (Dimidschstein et al., 2016), (Figura 11A). Con esta estrategia, se logró expresar los receptores hM3Dq, selectivamente en las interneuronas GABAérgicas, ya que el promotor no se expresa en neuronas glutamatérgicas (Stühmer et al., 2002; Pla et al., 2018; Duba-Kiss, 2021).

Para validar la expresión de los receptores de diseño en el tejido de la corteza somatosensorial, se tomó ventaja de la co-expresión de la proteína fluorescente “dTomato” en conjunto con el receptor de diseño hM3Dq. Gracias a esta característica del constructo viral, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de ambos hemisferios (Figura 11B) las cuales demuestran que la difusión del virus se dio principalmente en la corteza somatosensorial (S1), (Figura 11C). Cabe mencionar, que el receptor de diseño hM3Dq, es un receptor metabotrópico acoplado a proteína Gq que se activa farmacológicamente con el compuesto: Clozapine N-oxide (CNO) (Dimidschstein et al., 2016).

Con esta estrategia, también fue posible la identificación de las interneuronas GABAérgicas *in vitro* para llevar a cabo registros electrofisiológicos por medio de Patch-Clamp en la modalidad Whole-Cell y con ello validar las características del disparo neuronal de las interneuronas corticales “Fast spiking” (Swadlow, 2003; Orduz et al., 2013; Hu et al., 2014; Owen et al., 2018), antes (control) y después (+CNO) de la aplicación del agonista de los receptores de diseño hM3Dq específico (10 μ M de CNO), ver Figura 11 D y E.

Los registros celulares de fijación de corriente demuestran que las interneuronas en condiciones control (sin CNO), ante un pulso cuadrado de 100 pA durante 1 segundo, exhiben una serie de disparos de alta frecuencia, característicos de las interneuronas Fast spiking o PV+ (Figura 11E Izquierda, azul). Cuando se administró el CNO al sistema de registro, la respuesta de la misma interneurona aumento significativamente su frecuencia de disparo ante el mismo estímulo de inyección de corriente (Figura 11E, Izquierda, rojo), lo que demuestra un aumento en la excitabilidad neuronal y por lo tanto, que la activación del receptor de diseño está ejerciendo una modulación positiva de la frecuencia de disparo neuronal. Este resultado se replicó en 7 diferentes registros electrofisiológicos de neuronas dTomato positivas identificadas *in vitro* obtenidos de 4 diferentes cerebros de ratones expuestos prenatalmente al VPA (Control: 76.54 ± 4.518 vs +CNO: 100.3 ± 5.836 , $p= 0.011$) (Figura E11, derecha). Esta serie de experimentos demuestra que la expresión en el tejido de interés de los receptores de diseño hM3D en conjunto con el reportero fluorescente dTomato y la activación farmacológica del receptor, es eficiente en condiciones *in vitro*.

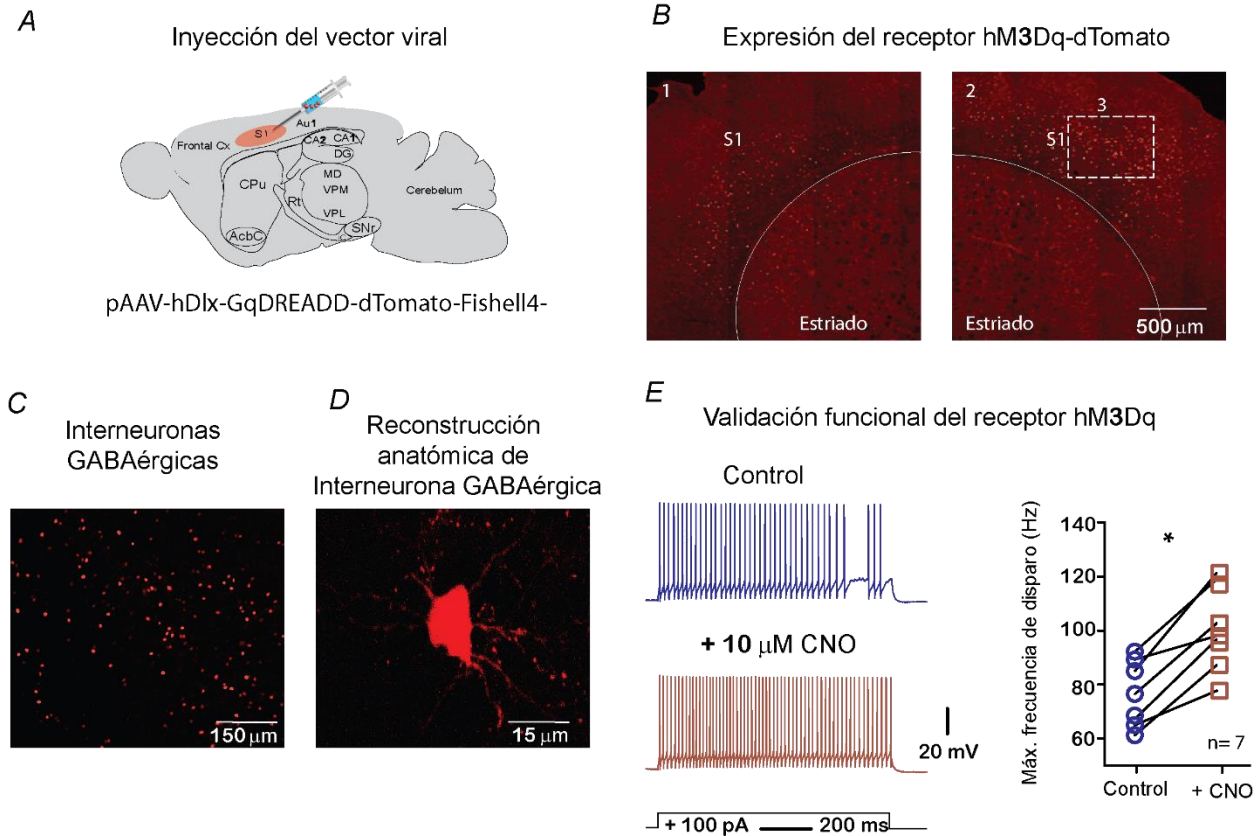


Figura 11. Validación anatómica y funcional *in vitro* de la expresión del receptor de diseño hM3Dq y dTomato. **A)** Esquema representativo del sitio de inyección en S1 del vector viral. **B)** Expresión del receptor hM3Dq-dTomato en S1 de ambos hemisferios, 1: Hemisferio derecho, 2: Hemisferio izquierdo, 3: Acercamiento en S1 sobre neuronas marcadas con dTomato indicando la presencia del receptor hM3Dq. **C)** Ampliación de 3 en B, muestra Interneuronas GABAérgicas marcadas. **D)** Ampliación de una interneurona de C) **E)** Validación funcional de receptor hM3Dq-dTomato, Izquierda: trazos representativos de la frecuencia de disparo antes (Azul) y después (Rojo) de la administración de 10 μ M de CNO a un pulso cuadrado de 100 pA durante 1 segundo, Derecha: frecuencia de disparo máxima por grupo. Ambos resultados muestran un aumento en la excitabilidad después de la administración de CNO por medio de la expresión de los receptores de diseño. La frecuencia de disparo máxima es significativamente mayor después de administrar CNO.

6.3.2 Evaluación del perfil somatosensorial modulado al alta

Finalmente, para examinar si era posible recuperar total o parcialmente el perfil somatosensorial del modelo murino de TEA inducido por VPA, se evaluó el efecto de la modulación *in vivo* de las interneuronas GABAérgicas de la corteza somatosensorial a través de la expresión y activación farmacológica de los receptores de diseño (hM3Dq).

Para este propósito, se inyectó CNO intraperitonealmente (3.5 mg/kg de peso) a los ratones del grupo VPA 15 minutos antes de la evaluación del protocolo de estimulación de patas trasera por aire a presión.

Antes de modular farmacológicamente la conducta, los ratones VPA mostraron un umbral alto en la detección de estímulos y por ello no exhibían una respuesta conductual ante estímulos que los ratones del grupo control respondían favorablemente (Figura 12A). Después de la administración de CNO (Figura 12B), la curva psicofísica del grupo VPA + CNO mostró un ligero desplazamiento hacia la izquierda comparada con la curva del grupo VPA (Figura 12C). Al realizar la comparación estadística entre ambas condiciones, no se encontraron diferencias significativas con el grupo CTRL y VPA+CNO en la intensidad 5 PSI que previamente sí presentaban una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo CTRL y VPA + CNO (CTRL: 0.71 ± 0.11 vs VPA + CNO: 0.625 ± 0.239 ; $p= 0.920$) y entre el grupo VPA y VPA + CNO (VPA: 0.28 ± 0.09 vs VPA + CNO: 0.625 ± 0.239 , $p= 0.179$). Tampoco se encontraron diferencias entre el grupo CTRL y el grupo VPA + CNO (CTRL: 0.83 ± 0.06 vs VPA + CNO: 0.745 ± 0.085 ; $p= 0.120$), ni entre VPA y VPA + CNO (VPA: 0.45 ± 0.08 vs VPA + CNO: 0.745 ± 0.085 ; $p= 0.741$) en la intensidad 5.5 PSI. El coeficiente de determinación lineal (R^2) para el grupo VPA + CNO ($R^2 = 0.8935$) también demuestra una bondad de ajuste confiable al modelo.

Al analizar los umbrales de detección y compararlos mediante la prueba Kruskal-Wallis (Figura 12D) y el test de comparaciones múltiples de Dunn, no se observaron diferencias significativas entre el grupo VPA + CNO y CTRL ni el grupo VPA (CTRL: 4.81 ± 0.38 vs VPA + CNO: 5.36 ± 0.09 . VPA: 5.85 ± 0.22 vs VPA + CNO: 5.36 ± 0.232). Estos resultados demuestran una recuperación parcial del perfil somatosensorial de hiposensibilidad táctil por medio de la modulación *in vivo* de interneuronas GABAérgicas y ponen énfasis en el sistema inhibitorio como un posible blanco terapéutico para revertir las alteraciones somatosensoriales del TEA

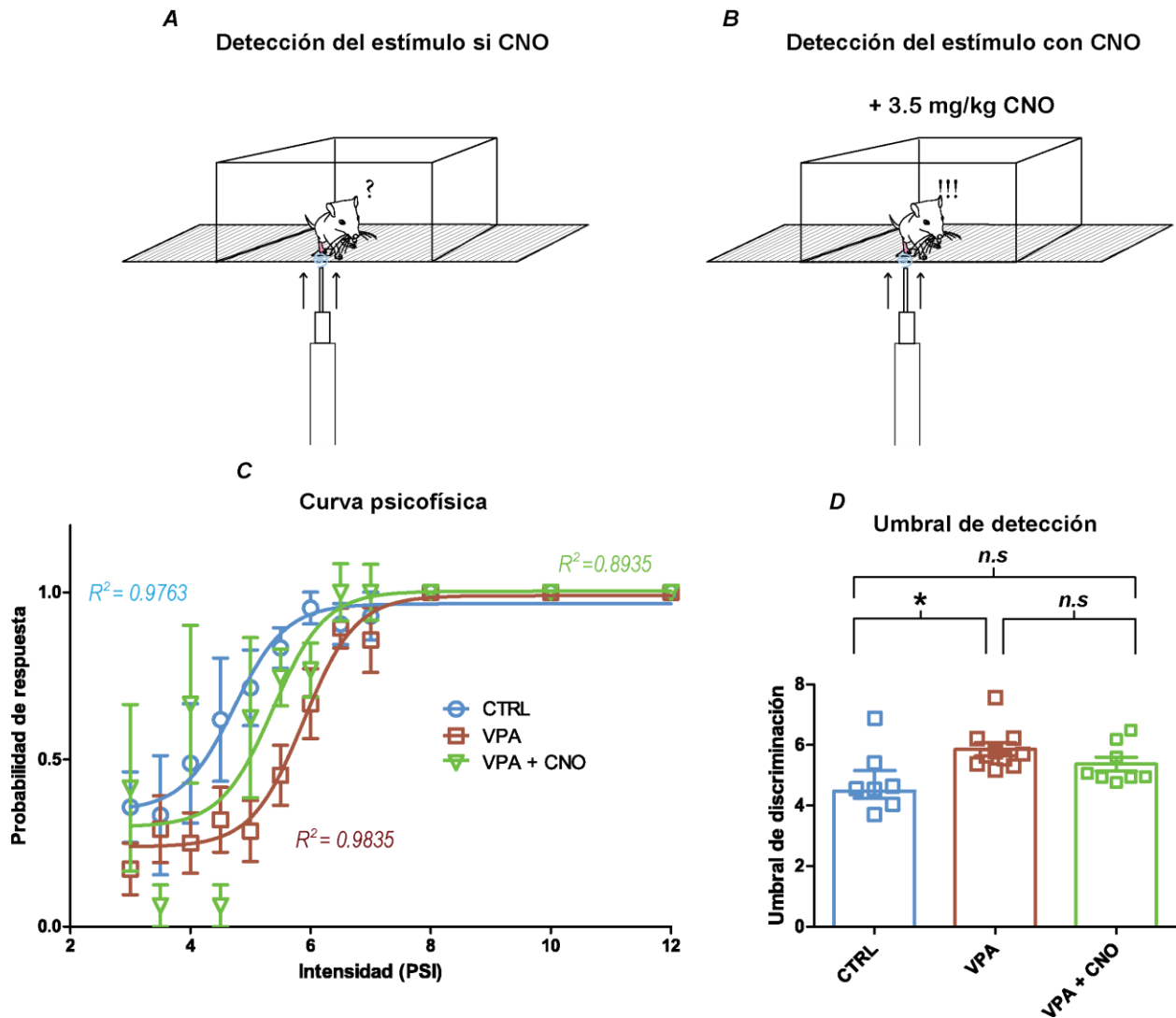


Figura 12. Perfil sensible parcialmente recuperado por medio de la modulación GABAérgica por medio de receptores de diseño. A) Ejemplo ilustrativo de un ratón VPA que no detecta el estímulo debido a su perfil somatosensorial hiposensible. **B)** Ejemplo ilustrativo de un ratón que detecta el estímulo debido a la administración de 3.5 mg/kg de CNO, el cual excita a las interneuronas GABAérgicas. **C)** Curvas psicofísicas de cada grupo, se observa un desplazamiento a la izquierda de la curva del grupo VPA + CNO ($n=8$), las respuestas a las intensidades ya no exhiben una hiposensibilidad marcada respecto al grupo control ($n=7$) y VPA ($n=10$). **D)** Umbrales de detección táctil por grupo, el grupo VPA + CNO no es diferente del grupo CTRL y el grupo VPA, la detección mejoró parcialmente.

7. DISCUSIÓN

El vínculo entre el VPA y el TEA en el modelo murino se ha confirmado en diversos estudios, esto ha demostrado que el modelo murino de TEA inducido por VPA tiene una amplia validez que permite el estudio de la neurobiología del TEA (Mabunga et al., 2015; Nicolini y Fahnstock, 2018).

Canónicamente, el modelo murino de TEA inducido por VPA se suele validar a través de la presencia de alteraciones conductuales relacionadas con alguno de los síntomas centrales del TEA, tales como: alteraciones en la comunicación e interacción social, conductas repetitivas o alteraciones sensoriales. En este trabajo, se evaluaron las alteraciones en la comunicación y las alteraciones sensoriales. Las alteraciones de las VUS por separación materna son una medida estándar de validación de los modelos de TEA en etapas tempranas del desarrollo (Woehr, 2014; Wöhr et al., 2015; Sungur et al., 2016; Maloney et al., 2018; Yang et al., 2021). En el presente estudio, los resultados han demostrado alteraciones en el número de llamadas y en el tiempo de inicio de la primera vocalización, de manera consistente a lo que se ha reportado anteriormente en otros estudios y en otros modelos de TEA (Picker et al., 2006; Scattoni et al., 2008, Tsuji et al., 2020).

Así mismo, la tarea de RNF, también llamada “Homing Behavior”, ha sido ampliamente usada para la validación y evaluación sensorial de los modelos de TEA en el desarrollo temprano. De manera consistente, tal como se ha reportado en estudios similares, nuestros resultados muestran mayores latencias para alcanzar el nido familiar (Favre, 2013, Servadio, et al., 2016 y 2018; Melancia, et al., 2018; Tartaglione et al., 2018). Cabe señalar que no todos los estudios que utilizan esta tarea reportan la permanencia en el nido familiar (Schneider y Przewłocki, 2005; Roullet et al., 2010; Melancia, et al., 2018), por otra parte, otros han reportado un menor tiempo de permanencia en el nido familiar (Servadio, et al., 2016; Tartaglione et al., 2018). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos. Posiblemente la ambigüedad de los resultados se deba a las características mismas del espectro autista, pues en esta tarea, independientemente de si su primera elección fue el nido familiar o el novedoso, en algún momento de la prueba pueden llegar al nido familiar y decidir permanecer o

moverse del nido. La conducta de permanencia puede verse influenciada por aspectos de hiperactividad o ansiedad, los cuales son comorbilidades comunes en los TEA (Mannion y Leader, 2013), pero también podría ser afectada por alteraciones en la percepción olfativa, por ejemplo, habituarse más rápido al olor del nido familiar y salir de él, o tardar más tiempo en percibirlo como sugiere la latencia de llegada al nido, resultado consistente en todos los estudios.

Finalmente, estos resultados muestran que nuestro modelo murino de TEA inducido por VPA presenta alteraciones relacionadas con dos síntomas centrales, déficits en la comunicación y alteraciones sensoriales, los cuales coinciden con los resultados previos en la literatura (Favre, 2013, Woehr, 2014; Wöhr et al., 2015; Sungur et al., 2016; Servadio, et al., 2016 y 2018; Melancia, et al., 2018; Tartaglione et al., 2018; Maloney et al., 2018; Yang et al., 2021). Por lo tanto, el modelo murino de TEA inducido por VPA que se estandarizó en el laboratorio, es consistente y reproduce los estándares del modelo reportados por otros grupos de investigación y por tanto permite considerar pertinente la confiabilidad, validez y extrapolación de los resultados que describen el perfil somatosensorial y su rescate terapéutico a través de la modulación *in vivo* del sistema GABAérgico.

7.1 Perfil somatosensorial táctil en el modelo murino de VPA

Se ha estimado que el 90% de personas con TEA, padecen alteraciones sensoriales en cualquiera de las modalidades (Leekam, 2006; Tomchek y Dunn, 2007; Geschwind, 2009; Robertson y Cohen, 2017). La prevalencia de este síntoma ha sido tal que se ha reconocido como un síntoma central y se ha agregado al DSM-V como hiper e hiporreactividad a los estímulos sensoriales (DSM-V, 2014; Balasco, 2020). La hiper o hiposensibilidad a los estímulos táctiles ha sido un tema controversial en modelos animales genéticos y ambientales de TEA (Fontes-Dutra et al., 2018; Chen et al., 2020; Balasco et al., 2019; Deemyad et al., 2022; Gouda et al., 2022), pues se ha encontrado evidencia de hipersensibilidad e hiposensibilidad con diferentes paradigmas conductuales.

Hasta ahora no se ha determinado el perfil somatosensorial táctil en el modelo murino de TEA inducido por VPA. Ya que se han descrito resultados opuestos en cuanto al perfil somatosensorial (Fontes-Dutra et al., 2018; Gouda et al., 2022).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio se enfocó en evaluar el perfil somatosensorial táctil, a través de dos pruebas conductuales: la prueba de remoción de cinta y la prueba de estimulación de patas traseras por presión de aire. En la prueba de remoción de cinta, los resultados mostraron la presencia de alteraciones en la sensibilidad del rostro al presentar mayores tiempos de detección de la cinta, sugiriendo un perfil de hiposensibilidad táctil. Además, se descartaron problemas motores porque el tiempo de remoción fue el mismo para ambos grupos, por esta razón descartamos que la hiposensibilidad se deba a alteraciones motoras para iniciar el movimiento. Esta tarea es una aproximación a los problemas sensoriomotores de fácil acceso y evaluación. Sin embargo, es sensible a la manipulación del experimentador pues al restringir a los ratones, se puede inducir un estado estrés o ansiedad, que se refleje en una hiperactividad o una hipoactividad en la fase experimental.

Por esta razón, para determinar con mayor robustez el perfil somatosensorial de hiposensibilidad táctil, se utilizó la prueba de estimulación de patas traseras por presión de aire. Nuestros hallazgos demostraron que la probabilidad de la respuesta a un rango de intensidades de estimulación es menor en los ratones expuestos a VPA prenatalmente que en los ratones controles. Además, el umbral de detección táctil fue más alto en el grupo experimental que el control. Considerando estos resultados, se refuerza la idea de que los ratones expuestos a VPA prenatalmente, exhiben un perfil de hiposensibilidad táctil.

El VPA se ha asociado fuertemente a la probabilidad de padecer un TEA, y se le considera un factor importante de TEA-i (Moore, 2000). Por otro lado, el estudio de Neklyudova y cols. (2022), muestra la gran dificultad para distinguir los perfiles de sensibilidad táctil en el amplio espectro de los TEA-i. Nuestros resultados muestran un perfil de hiposensibilidad en el modelo ambiental de TEA inducido por VPA y pueden ofrecer información valiosa de un posible subgrupo de TEA-i. Esto permitiría abordar con herramientas más precisas las necesidades sensoriales de este grupo de TEA y ofrecer

tratamientos y terapias más adecuadas a un perfil de hiposensibilidad a los estímulos táctiles del mundo.

7.2 Modulación de la excitabilidad GABAérgica *in vivo*

Estudios preclínicos y clínicos han señalado que la modulación GABAérgica, posee un potencial terapéutico para el mejoramiento de la sintomatología relacionada con el TEA. En particular, se ha comprobado un efecto terapéutico positivo en la interacción social, conductas repetitivas y el perfil de hiperactividad (Lemonnier y Ben-Ari, 2010; Erickson et al., 2011; Lemonnier et al.; 2012; Hadjikhani et al, 2013; Veenstra-VanderWeele et al., 2013). Sin embargo, a la fecha no se ha explorado el potencial terapéutico que tiene la modulación GABAérgica en la sintomatología relacionada con las alteraciones sensoriales en el TEA. Hasta donde sabemos, este estudio es uno de los primeros que aborda esta posibilidad, en la cual se encontraron resultados positivos. Cabe señalar que, la estrategia experimental que se utilizó en esta investigación delimitó la modulación GABAérgica a regiones específicas del cerebro (Corteza Somatosensorial S1) y sustrato celular específico (interneuronas GABAérgicas) (Stümer et al., 2002; Dimidschstein et al., 2016; Pla et al., 2018; Duba-Kiss, 2021). Con la ayuda de la técnica de quimiogenética *in vitro* (Figura 11) e *in vivo* (Figura 12), se logró develar el papel que juegan las interneuronas GABAérgicas de la corteza somatosensorial como potencial blanco terapéutico para el tratamiento farmacológico de las alteraciones somatosensoriales del modelo murino de TEA inducido por VPA.

En la corteza hay dos tipos principales de neuronas: por una parte, se han descrito las neuronas piramidales, que son excitatorias y de naturaleza glutamatérgica. Por otro lado, las interneuronas inhibitorias GABAérgicas, a estas se les considera la principal fuente de inhibición en la corteza cerebral (Markram et al., 2004). Ambos tipos neuronales, reciben entradas sinápticas excitatorias del tálamo y de distintas regiones corticales. La integración sináptica excitatoria e inhibitoria del microcircuito cortical, permite tener una respuesta eferente gradual y selectiva a los estímulos ambientales o sensoriales (Delevich et al., 2015). Las interneuronas modulan la excitación de la corteza, a través conexiones que regulan la actividad de las células piramidales, previenen la hiper

excitación (Trevelyan y Watkinson, 2005; Marín, 2012) y establecen el balance E/I, (Shu et al., 2003; Xue et al., 2014; Rubenstein y Merzenich, 2003; Sohal y Rubenstein, 2019).

En la corteza somatosensorial S1, las interneuronas se segregan en tres grupos por sus propiedades moleculares. Mientras que dos grupos de interneuronas se dividen en interneuronas que expresan el péptido Somatostatina (SST) y el receptor a Serotonina (5HT3aR) (~30% respectivamente), la mayoría de ellas (40%) expresa la proteína de unión a Ca⁺ Parvalbumina (PV) (Rudy et al., 2011). Particularmente, las interneuronas PV también denominadas “Fast Spiking” se caracterizan por tener propiedades de disparo rápido que subyacen a las oscilaciones gama, y por establecer una red amplia de conexiones eléctricas mediada por conexinas y por sinapsis químicas (Sohal et al., 2009; Hu & Jonas, 2014). Ejercen una fuerte inhibición al ser estimuladas por potenciales presinápticos excitatorios, inhibiendo ampliamente a través de sus contactos sinápticos dirigidos a los somas y axones de neuronas piramidales (Markram et al., 2004). Así, las interneuronas juegan un papel inhibitorio preponderante en las redes corticales locales y de largo alcance (Jouhanneau et al., 2018).

Diversos modelos animales de TEA han demostrado alteraciones en las interneuronas PV, incluyendo el modelo animal de TEA inducido por VPA (Filice et al., 2016; Lauber et al., 2016; Lauber et al., 2018; Deemyad et al., 2020), y se ha demostrado que la falta de la expresión de la proteína PV, es suficiente para desplegar un fenotipo conductual relacionado con el TEA (Wöhr, M., et al., 2015). Estos hallazgos han llevado a hipotetizar que las alteraciones en las interneuronas PV pueden ser un mecanismo compartido en los modelos de TEA (Yenkoyan et al., 2017).

En consonancia con la hipótesis del desbalance E/I (Rubenstein y Merzenich, 2003; Sohal y Rubenstein, 2019), y la evidencia de una disminución en la transmisión sináptica GABAérgica en el modelo de TEA inducido por VPA (Banerjee et al., 2013), sugerimos la presencia de hiperexcitabilidad en corteza de los ratones VPA que incrementa el ruido endógeno (Figura 4) e interfiere con la detección y codificación de los estímulos táctiles, obteniendo un perfil de hiposensibilidad táctil. Al modular al alta el sistema GABAérgico, se restableció el balance entre la excitación y la inhibición, lo que condujo a un decremento de la hiperexcitabilidad y por lo tanto del ruido endógeno de la corteza,

permitiendo una mejora en la detección, codificación dispersa y afinamiento de los estímulos táctiles (Isaacson y Scanziani, 2011; Ward, 2019).

Estos resultados coinciden con lo propuesto con Ward (2019), el cual distingue entre la sensibilidad sensorial subjetiva (autoinformes de sensibilidad), sensibilidad sensorial neuronal (grado de actividad neuronal inducida por los estímulos sensoriales) y la sensibilidad sensorial conductual (detección y discriminación de estímulos sensoriales). Mientras que, un aumento en la sensibilidad sensorial neuronal, se supone, está relacionada con un aumento en la sensibilidad subjetiva como se ha reportado antes (Green et al., 2015), la sensibilidad sensorial conductual dependería de si el aumento en la sensibilidad sensorial neuronal está relacionada con una señal o con ruido. Al haber un aumento en el ruido endógeno debido a una alteración en el balance E/I, se comprometería la sensibilidad sensorial conductual, dando como resultado hiposensibilidad. Esto también demuestra la posible coexistencia de hipersensibilidad (subjetiva y neuronal) e hiposensibilidad (conductual).

Finalmente, se ha sugerido la posibilidad de que las alteraciones sensoriales sean la base de las alteraciones conductuales y cognitivas de mayor complejidad como la comunicación, la interacción social y las conductas repetitivas (Baum et al., 2015). Otras teorías centradas en lo sensorial como elemento angular del TEA, incluyen las teorías bayesianas del cerebro (Pellicano y Burr, 2012), las cuales sugieren que las personas con TEA experimentan al mundo con mayor peso en las entradas sensoriales que en sus expectativas previas, lo que conduce a una hipersensibilidad sensorial (y posiblemente una hiposensibilidad conductual), que limita sus interacciones sociales a patrones conocidos de conductas repetitivas. Recientemente, Fabbi-Destro y cols (2022), encontraron una correlación positiva entre el perfil sensorial y problemas conductuales, emocionales y sociales de niños con TEA, enfatizando su impacto en el desarrollo de anomalías conductuales.

Sin duda se requieren futuras investigaciones que aborden el impacto de la modulación del sistema GABAérgico en la corteza somatosensorial u otras regiones del cerebro que estén relacionadas con otros síntomas centrales del TEA con el fin de evaluar si la mejora

en el procesamiento sensorial posee el potencial de mejorar los déficits en la interacción social, las alteraciones en la comunicación y las conductas repetitivas.

Así mismo, es necesario investigar con mayor precisión el papel que juegan cada una de las interneuronas corticales en el restablecimiento de las alteraciones somatosensoriales. Las estrategias metodológicas de la presente investigación no permiten delimitar si el efecto restaurador de la conducta se debe a algún tipo de interneuronas en particular (PV, SST y 5HT3aR). Sin embargo, se puede emplear una estrategia para abordar si la modulación única de las interneuronas PV recapitula los resultados de este estudio, o incluso, restablece por completo el perfil somatosensorial táctil. Esta manipulación podría ser posible por medio de un vector viral, con promotores específicos para interneuronas PV y así fortalecer a este tipo celular como un blanco terapéutico (Vormstein-Schneider et al., 2020).

8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados del presente estudio se concluye lo siguiente:

- 1.- El modelo murino de TEA inducido por VPA presenta alteraciones en la comunicación y déficits sensoriales.
- 2.- El modelo murino de TEA inducido por VPA presenta un perfil somatosensorial hiposensible.
- 3.- La activación quimiogénica de las interneuronas GABAérgicas de la corteza somatosensorial, recupera los déficits somatosensoriales de ratones expuestos prenatalmente a VPA.

9. REFERENCIAS

Al-Khater, K. M., Kerr, R., & Todd, A. J. (2008). A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 511(1), 1-18.

Allen, C. P., Dunkley, B. T., Muthukumaraswamy, S. D., Edden, R., Evans, C. J., Sumner, P., ... & Chambers, C. D. (2014). Enhanced awareness followed reversible inhibition of human visual cortex: a combined TMS, MRS and MEG study. *PloS one*, 9(6), e100350.

Anderson, Jeffrey S., Matteo Carandini, and David Ferster. (2000). "Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex." *Journal of neurophysiology* 84.2: 909-926.

Aronoff, R., Matyas, F., Mateo, C., Ciron, C., Schneider, B., & Petersen, C. C. (2010). Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex. *European Journal of Neuroscience*, 31(12), 2221-2233.

American Psychiatric Association. (2014). *DSM-5: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*.

Balasco, L., Chelini, G., Bozzi, Y., & Provenzano, G. (2019). Whisker Nuisance Test: a valuable tool to assess tactile hypersensitivity in mice. *Bio-protocol*, 9(16), e3331-e3331.

Balasco, L., Provenzano, G., & Bozzi, Y. (2020). Sensory abnormalities in autism spectrum disorders: a focus on the tactile domain, from genetic mouse models to the clinic. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 1016.

Banerjee, A., García-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P., & Atzori, M. (2013). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(6), 1309-1318.

Baum, S. H., Stevenson, R. A., & Wallace, M. T. (2015). Behavioral, perceptual, and neural alterations in sensory and multisensory function in autism spectrum disorder. *Progress in Neurobiology*, 134, 140–160.

- Baxter, A. J., Brugha, T. S., Erskine, H. E., Scheurer, R. W., Vos, T., & Scott, J. G. (2015). The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychological medicine*, 45(3), 601-613.
- Bennetto, L., Kuschner, E. S., & Hyman, S. L. (2007). Olfaction and taste processing in autism. *Biological psychiatry*, 62(9), 1015-1021.
- Blakemore, S. J., Bristow, D., Bird, G., Frith, C., & Ward, J. (2005). Somatosensory activations during the observation of touch and a case of vision–touch synaesthesia. *Brain*, 128(7), 1571-1583.
- Blakemore, S. J., Tavassoli, T., Calò, S., Thomas, R. M., Catmur, C., Frith, U., & Haggard, P. (2006). Tactile sensitivity in Asperger syndrome. *Brain and cognition*, 61(1), 5-13.
- Bozzi, Y., Provenzano, G., & Casarosa, S. (2018). Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. *European Journal of Neuroscience*, 47(6), 534-548.
- Brondino, N., Fusar-Poli, L., Panisi, C., Damiani, S., Barale, F., & Politi, P. (2016). Pharmacological modulation of GABA function in autism spectrum disorders: a systematic review of human studies. *Journal of autism and developmental disorders*, 46(3), 825-839.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4), e35538.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Screening and diagnosis of autism spectrum disorder. [Cdc. Gov/ncbddd/autism/screening. Html](https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/screening.html) (Accessed on December 01, 2019).
- Coffey, K.R., Marx, R.G. & Neumaier, J.F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. *Neuropsychopharmacol.* 44, 859–868 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic pathology*, 43(6), 776-793.

Champlin, A. K., Dorr, D. L., & Gates, A. H. (1973). Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biology of reproduction*, 8(4), 491-494.

Chen, Q., Deister, C. A., Gao, X., Guo, B., Lynn-Jones, T., Chen, N., ... & Feng, G. (2020). Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD. *Nature neuroscience*, 23(4), 520-532.

Chomiak, T., Turner, N., & Hu, B. (2013). What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. *Pathology research international*, 2013.

Clayton-Smith, J., & Donnai, D. (1995). Fetal valproate syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 32(9), 724.

Daniels, A. M., Halladay, A. K., Shih, A., Elder, L. M., & Dawson, G. (2014). Approaches to enhancing the early detection of autism spectrum disorders: a systematic review of the literature. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 53(2), 141-152.

Dawson, G., & Bernier, R. (2013). A quarter century of progress on the early detection and treatment of autism spectrum disorder. *Development and psychopathology*, 25(42), 1455-1472.

Deemyad, T., Puig, S., Papale, A. E., Qi, H., LaRocca, G. M., Aravind, D., ... & Urban, N. N. (2022). Lateralized decrease of parvalbumin+ cells in the somatosensory cortex of ASD models is correlated with unilateral tactile hypersensitivity. *Cerebral Cortex*, 32(3), 554-568.

Delevich, K., Tucciarone, J., Huang, Z. J., & Li, B. (2015). The mediodorsal thalamus drives feedforward inhibition in the anterior cingulate cortex via parvalbumin interneurons. *Journal of Neuroscience*, 35(14), 5743-5753.

Di Martino, A., Yan, C. G., Li, Q., Denio, E., Castellanos, F. X., Alaerts, K., ... & Milham, M. P. (2014). The autism brain imaging data exchange: towards a large-scale evaluation of the intrinsic brain architecture in autism. *Molecular psychiatry*, 19(6), 659-667.

Dimidschstein, J., Chen, Q., Tremblay, R., Rogers, S. L., Saldi, G. A., Guo, L., ... & Fishell, G. (2016). A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nature neuroscience*, 19(12), 1743-1749.

Duba-Kiss, R., Niibori, Y., & Hampson, D. R. (2021). GABAergic Gene Regulatory Elements Used in Adeno-Associated Viral Vectors. *Frontiers in Neurology*, 12, 745159.

Ekambaram, G., Kumar, S. K. S., & Joseph, L. D. (2017). Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(1), AC05.

Erickson, C. A., Early, M., Stigler, K. A., Wink, L. K., Mullett, J. E., & McDougle, C. J. (2011). An open-label naturalistic pilot study of acamprosate in youth with autistic disorder. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*, 21(6), 565-569.

Fabbri-Destro, M., Maugeri, F., Ianni, C., Corsini, S., Di Stefano, E., Scatigna, S., ... & Narzisi, A. (2022). Early sensory profile in autism spectrum disorders predicts emotional and behavioral issues. *Journal of Personalized Medicine*, 12(10), 1593.

Fan, L. Z., Kheifets, S., Böhm, U. L., Wu, H., Piatkevich, K. D., Xie, M. E., ... & Cohen, A. E. (2020). All-optical electrophysiology reveals the role of lateral inhibition in sensory processing in cortical layer 1. *Cell*, 180(3), 521-535.

Favre, M. R., Barkat, T. R., Mendola, D. L., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7, 88.

Feil, K., & Herbert, H. (1995). Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker—fuse nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 353(4), 506-528.

Feldmeyer, D. (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Frontiers in neuroanatomy*, 6, 24.

Felix-Ortiz, A. C., & Febo, M. (2012). Gestational valproate alters BOLD activation in response to complex social and primary sensory stimuli. *PloS one*, 7(5), e37313.

Feng, G., Jensen, F. E., Greely, H. T., Okano, H., Treue, S., Roberts, A. C., ... & Morrison, J. H. (2020). Opportunities and limitations of genetically modified nonhuman primate models for neuroscience research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), 24022-24031.

Filice, F., Vörckel, K. J., Sungur, A. Ö., Wöhr, M., & Schwaller, B. (2016). Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Molecular brain*, 9(1), 1-17.

Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M & Nealy, B. (2016). Prevalence of autism spectrum disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46, 1669-1685.

Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Brum Schwingel, G., Della-Flora Nunes, G., Hirsch, M. M., & Gottfried, C. (2018). Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 10, 9.

Fründt, O., Grashorn, W., Schöttle, D., Peiker, I., David, N., Engel, A. K., ... & Bingel, U. (2017). Quantitative sensory testing in adults with autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 47, 1183-1192.

Gauriau, C., & Bernard, J. F. (2004). A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 468(1), 24-56.

Genescu, I., & Garel, S. (2021). Being superficial: a developmental viewpoint on cortical layer 1 wiring. *Current Opinion in Neurobiology*, 66, 125-134.

Geschwind, D. H. (2009). Advances in autism. *Annual review of medicine*, 60, 367-380.

Gouda, B., Sinha, S. N., Chalamaiyah, M., Vakdevi, V., Shashikala, P., Veeresh, B., ... & Boiroju, N. K. (2022). Sex Differences in Animal Models of Sodium-Valproate-Induced Autism in Postnatal BALB/c Mice: Whole-Brain Histoarchitecture and 5-HT_{2A} Receptor Biomarker Evidence. *Biology*, 11(1), 79.

- Green, S. A., Hernandez, L., Tottenham, N., Krasileva, K., Bookheimer, S. Y., & Dapretto, M. (2015). Neurobiology of sensory overresponsivity in youth with autism spectrum disorders. *JAMA psychiatry*, 72(8), 778-786.
- Hadjikhani, N., Zürcher, N. R., Rogier, O., Ruest, T., Hippolyte, L., Ben-Ari, Y., et al. (2015). Improving emotional face perception in autism with diuretic bumetanide: A proof-of-concept behavioral and functional brain imaging pilot study. *Autism*, 19(2), 149–157.
- Halassa, M. M., & Kastner, S. (2017). Thalamic functions in distributed cognitive control. *Nature neuroscience*, 20(12), 1669-1679.
- Han, S., Tai, C., Jones, C. J., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2014). Enhancement of inhibitory neurotransmission by GABAA receptors having $\alpha 2$, 3-subunits ameliorates behavioral deficits in a mouse model of autism. *Neuron*, 81(6), 1282-1289.
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., & Martínez-Cerdeño, V. (2017). The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the prefrontal cortex in autism. *Cerebral cortex*, 27(3), 1931-1943.
- He, C. X., Cantu, D. A., Mantri, S. S., Zeiger, W. A., Goel, A., & Portera-Cailliau, C. (2017). Tactile defensiveness and impaired adaptation of neuronal activity in the Fmr1 knock-out mouse model of autism. *Journal of Neuroscience*, 37(27), 6475-6487.
- Hendry, S., & Hsiao, S. (2013). The somatosensory system. In *Fundamental Neuroscience: Fourth Edition* (pp. 531-551).
- Heyne, G. W., Plisch, E. H., Melberg, C. G., Sandgren, E. P., Peter, J. A., & Lipinski, R. J. (2015). A simple and reliable method for early pregnancy detection in inbred mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(4), 368-371.
- Hill, D. S., Cabrera, R., Wallis Schultz, D., Zhu, H., Lu, W., Finnell, R. H., & Wlodarczyk, B. J. (2015). Autism-like behavior and epigenetic changes associated with autism as consequences of in utero exposure to environmental pollutants in a mouse model. *Behavioural Neurology*.
- Hu, H., Gan, J., & Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, 345(6196), 1255-1263.

Humes, L. E., Busey, T. A., Craig, J., & Kewley-Port, D. (2013). Are age-related changes in cognitive function driven by age-related changes in sensory processing?. *Attention, Perception, & Psychophysics*, 75(3), 508-524.

Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2011). How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72(2), 231-243.

Jones, E. J., Dawson, G., & Webb, S. J. (2018). Sensory hypersensitivity predicts enhanced attention capture by faces in the early development of ASD. *Developmental cognitive neuroscience*, 29, 11-20.

Jouhanneau, J. S., Kremkow, J., & Poulet, J. F. (2018). Single synaptic inputs drive high-precision action potentials in parvalbumin expressing GABA-ergic cortical neurons in vivo. *Nature Communications*, 9(1), 1-11.

Juybari, K. B., Sepehri, G., Meymandi, M. S., Shahrbabaki, S. S. V., Moslemizadeh, A., Saeedi, N., & Bashiri, H. (2020). Sex dependent alterations of resveratrol on social behaviors and nociceptive reactivity in VPA-induced autistic-like model in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 81, 106905.

Kaiser, T., Zhou, Y., & Feng, G. (2017). Animal models for neuropsychiatric disorders: prospects for circuit intervention. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 59-65.

Kalk, N. J., & Lingford-Hughes, A. R. (2014). The clinical pharmacology of acamprosate. *British journal of clinical pharmacology*, 77(2), 315-323.

Kang, J., & Kim, E. (2015). Suppression of NMDA receptor function in mice prenatally exposed to valproic acid improves social deficits and repetitive behaviors. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 17. DOI: 10.3389 / fnmol.2015.00017

Kania, A. (2021). Sensational developments in somatosensory development?. *Current Opinion in Neurobiology*, 66, 212-223.

Kuhaneck, H. M., & Britner, P. A. (2013). A preliminary investigation of the relationship between sensory processing and social play in autism spectrum disorder. *OTJR: Occupation, Participation and Health*, 33(3), 159-167.

Kuo, H. & Liu, F. (2017). Valproic acid induces aberrant development of striatal compartments and corticostriatal pathways in a mouse model of autism spectrum disorder, *The Faceb Journal* 31(10):4458-4471

Lambert, P. A., Carraz, G., Borselli, S., & Bouchardy, M. (1975). Dipropylacetamide in the treatment of manic-depressive psychosis. *L'encephale*, 1(1), 25-31.

Lan, A., Kalimian, M., Amram, B., & Kofman, O. (2017). Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice. *Environmental health*, 16(1), 1-10.

Lauber, E., Filice, F., & Schwaller, B. (2016). Prenatal valproate exposure differentially affects parvalbumin-expressing neurons and related circuits in the cortex and striatum of mice. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 150.

Lauber, E., Filice, F., & Schwaller, B. (2018). Dysregulation of parvalbumin expression in the *Cntnap2*^{-/-} mouse model of autism spectrum disorder. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 262.

Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zagha, E., Fishell, G., & Rudy, B. (2010). The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 16796-16808.

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, 894-910.

Lemonnier, E., & Ben-Ari, Y. (2010). The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects. *Acta Paediatrica*, 99, 1885–1888.

Lemonnier, E., Degrez, C., Phelep, M., Tyzio, R., Josse, F., Grandgeorge, M., et al. (2012). A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Translational Psychiatry*, 2, e202.

Li, H., & Crair, M. C. (2011). How do barrels form in somatosensory cortex?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1225(1), 119-129.

- Li, J., Xiong, K., Pang, Y., Dong, Y., Kaneko, T., & Mizuno, N. (2006). Medullary dorsal horn neurons providing axons to both the parabrachial nucleus and thalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 498(4), 539-551.
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466-474.
- Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature reviews Disease primers*, 6(1), 1-23.
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508-520.
- Löscher, W. (2002). Farmacología básica del valproato. *Fármacos del SNC*, 16 (10), 669-694
- Luna, R., Hernández, A., Brody, C. D., & Romo, R. (2005). Neural codes for perceptual discrimination in primary somatosensory cortex. *Nature neuroscience*, 8(9), 1210-1219.
- Lund, R. D., & Webster, K. E. (1967). Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 130(4), 313-327.
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J. W., Kim, K. C., & Shin, C. Y. (2015). Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. *Experimental neurobiology*, 24(4), 285.
- Maloney, S. E., Chandler, K. C., Anastasaki, C., Rieger, M. A., Gutmann, D. H., & Dougherty, J. D. (2018). Characterization of early communicative behavior in mouse models of neurofibromatosis type 1. *Autism Research*, 11(1), 44-58.
- Mannion, A., & Leader, G. (2013). Comorbidity in autism spectrum disorder: A literature review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 7(12), 1595-1616.

Marín, O. (2012). Disfunción interneuronal en trastornos psiquiátricos. *Nature Reviews Neuroscience*, 13 (2), 107-120.

McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (67), e4389.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews neuroscience*, 5(10), 793-807.

Markram, K., Rinaldi, T., Mendola, D. L., Sandi, C., & Markram, H. (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 33

Melancia, F., Schiavi, S., Servadio, M., Cartocci, V., Campolongo, P., Palmery, M., & Trezza, V. (2018). Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. *British journal of pharmacology*, 175(18), 3699-3712.

Moore, S. J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D. J., Montgomery, T., & Dean, J. C. S. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *Journal of medical genetics*, 37(7), 489-497.

Mottron, L., Dawson, M., Soulières, I., Hubert, B., & Burack, J. (2006). Enhanced perceptual functioning in autism: An update, and eight principles of autistic perception. *Journal of autism and developmental disorders*, 36, 27-43.

Neklyudova, A., Smirnov, K., Rebreikina, A., Martynova, O., & Sysoeva, O. (2022). Electrophysiological and Behavioral Evidence for Hyper-and Hyposensitivity in Rare Genetic Syndromes Associated with Autism. *Genes*, 13(4), 671.

Nicolini, C., & Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental neurology*, 299, 217-227.

Okun, Michael, and Ilan Lampl. "Instantaneous correlation of excitation and inhibition during ongoing and sensory-evoked activities." *Nature neuroscience* 11.5 (2008): 535-537.

Orduz, D., Bishop, D. P., Schwaller, B., Schiffmann, S. N., & Gall, D. (2013). Parvalbumin tunes spike-timing and efferent short-term plasticity in striatal fast spiking interneurons. *The Journal of physiology*, 591(13), 3215-3232.

Ornoy, A. (2009). Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?. *Reproductive toxicology*, 28(1), 1-10.

Owen, S. F., Berke, J. D., & Kreitzer, A. C. (2018). Fast-spiking interneurons supply feedforward control of bursting, calcium, and plasticity for efficient learning. *Cell*, 172(4), 683-695.

Pacey, L. K., Heximer, S. P., & Hampson, D. R. (2009). Increased GABAB receptor-mediated signaling reduces the susceptibility of fragile X knockout mice to audiogenic seizures. *Molecular pharmacology*, 76(1), 18-24.

Pastor-Cerezuela, G., Fernández-Andrés, M. I., Sanz-Cervera, P., & Marín-Suelves, D. (2020). The impact of sensory processing on executive and cognitive functions in children with autism spectrum disorder in the school context. *Research in developmental disabilities*, 96, 103540.

Pellicano, E., & Burr, D. (2012). When the world becomes 'too real': a Bayesian explanation of autistic perception. *Trends in cognitive sciences*, 16(10), 504-510.

Pergola, G., Danet, L., Pitel, A. L., Carlesimo, G. A., Segobin, S., Pariente, J., & Barbeau, E. J. (2018). The regulatory role of the human mediodorsal thalamus. *Trends in cognitive sciences*, 22(11), 1011-1025.

Petersen, C. C. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*, 56(2), 339-355.

Pla R, Stanco A, Howard MA, Rubin AN, Vogt D, Mortimer N, Cobos I, Potter GB, Lindtner S, Price JD, Nord AS, Visel A, Schreiner CE, Baraban SC, Rowitch DH,

Rubenstein JLR. Dlx1 and Dlx2 Promote Interneuron GABA Synthesis, Synaptogenesis, and Dendritogenesis. *Cereb Cortex*. 2018 Nov 1; 28(11):3797-3815

Picker, J. D., Yang, R., Ricceri, L., & Berger-Sweeney, J. (2006). An altered neonatal behavioral phenotype in *Mecp2* mutant mice. *Neuroreport*, 17(5), 541-544.

Pleger, B., Ruff, C. C., Blankenburg, F., Bestmann, S., Wiech, K., Stephan, K. E., & Dolan, R. J. (2006). Neural coding of tactile decisions in the human prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12596-12601.

Pleger, B., & Villringer, A. (2013). The human somatosensory system: from perception to decision making. *Progress in neurobiology*, 103, 76-97.

Pouchelon, G., Frangeul, L., Rijli, F. M., & Jabaudon, D. (2012). Patterning of pre-thalamic somatosensory pathways. *European Journal of Neuroscience*, 35(10), 1533-1539.

Prior, N. H., Bentz, E. J., & Ophir, A. G. (2022). Reciprocal processes of sensory perception and social bonding: an integrated social-sensory framework of social behavior. *Genes, Brain and Behavior*, 21(3), e12781.

Puts, N. A., Edden, R. A., Evans, C. J., McGlone, F., & McGonigle, D. J. (2011). Regionally specific human GABA concentration correlates with tactile discrimination thresholds. *Journal of Neuroscience*, 31(46), 16556-16560.

Rahman, M., & Nguyen, H. (2020). Valproic Acid (Divalproex Sodium).

Rasalam, A. D., Hailey, H., Williams, J. H. G., Moore, S. J., Turnpenny, P. D., Lloyd, D. J., & Dean, J. C. (2005). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental medicine and child neurology*, 47(8), 551-555.

Robertson, C. E., & Baron-Cohen, S. (2017). Sensory perception in autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(11), 671-684.

Roulet, F. I., Lai, J. K., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and teratology*, 36, 47-56.

Roullet, F. I., Wollaston, L., Decatanzaro, D., Balasco & Foster, J. A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*, 170(2), 514-522.

Rozenkrantz, L., Zachor, D., Heller, I., Plotkin, A., Weissbrod, A., Snitz, K., ... & Sobel, N. (2015). A mechanistic link between olfaction and autism spectrum disorder. *Current biology*, 25(14), 1904-1910.

Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, 2(5), 255-267.

Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental neurobiology*, 71(1), 45-61.

Sánchez Gil, A. (2019). Ultrasonic vocalizations in pups prenatally exposed to environmental factors.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *Jama*, 311(17), 1770-1777

Scattoni, M. L., Gandhi, S. U., Ricceri, L., & Crawley, J. N. (2008). Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *PloS one*, 3(8), e3067.

Servadio, M., Manduca, A., Melancia, F., Leboffe, L., Schiavi, S., Campolongo, P., & Trezza, V. (2018). Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *European Neuropsychopharmacology*, 28(1), 85-96.

Servadio, M., Melancia, F., Manduca, A., Di Masi, A., Schiavi, S., Cartocci, V., & Trezza, V. (2016). Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. *Translational psychiatry*, 6(9), e902-e902.

Sharma, P., & Pienaar, I. S. (2018). The Use of DREADDs for Dissecting the Contribution of Cellular and Neural Circuit Mechanisms in Models of Neurodegenerative Disease. In

Molecular-genetic and statistical techniques for behavioral and neural research (pp. 565-596). Academic Press.

Sherman, C. (2019). The Senses: The Somatosensory System. Dana Foundation. Recuperado de <https://dana.org/article/the-senses-the-somatosensory-system/>

Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80-89.

Shu, Y., Hasenstaub, A., & McCormick, D. A. (2003). Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, 423(6937), 288-293.

Schwaller, B. (2020). Cytosolic Ca²⁺ buffers are inherently Ca²⁺ signal modulators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(1), a035543

Shallcross, R., Bromley, R. L., Irwin, B., Bonnett, L. J., Morrow, J., & Baker, G. A. (2011). Child development following in utero exposure: levetiracetam vs sodium valproate. *Neurology*, 76(4), 383-389.

Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L. (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular psychiatry*, 24(9), 1248-1257.

Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702.

Stühmer, T., Puelles, L., Ekker, M., & Rubenstein, J. L. (2002). Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cerebral cortex*, 12(1), 75-85.

Sungur, A. Ö., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2016). Early communication deficits in the Shank1 knockout mouse model for autism spectrum disorder: Developmental aspects and effects of social context. *Autism Research*, 9(6), 696-709.

Sofroniew, N. J., & Svoboda, K. (2015). Whisking. *Current Biology*, 25(4), R137-R140.

Swadlow, H. A. (2003). Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cerebral Cortex*, 13(1), 25-32.

Sztainberg, Y., & Zoghbi, H. Y. (2016). Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders. *Nature neuroscience*, 19(11), 1408- 1417.

Tavassoli, T., Layton, C., Levy, T., Rowe, M., George-Jones, J., Zweifach, J., ... & Siper, P. M. (2021). Sensory reactivity phenotype in Phelan–McDermid syndrome is distinct from idiopathic ASD. *Genes*, 12(7), 977.

Takesian, A. E., & Hensch, T. K. (2013). Balancing plasticity/stability across brain development. *Progress in brain research*, 207, 3-34.

Tartaglione, A. M., Schiavi, S., Calamandrei, G., & Trezza, V. (2019). Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*, 159, 107477.

Tomchek, S. D., & Dunn, W. (2007). Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. *The American journal of occupational therapy*, 61(2), 190-200.

Trevelyan, A. J., & Watkinson, O. (2005). Does inhibition balance excitation in neocortex?. *Progress in biophysics and molecular biology*, 87(1), 109-143.

Tsuji, C., Fujisaku, T., & Tsuji, T. (2020). Oxytocin ameliorates maternal separation-induced ultrasonic vocalisation calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid. *Journal of Neuroendocrinology*, 32(4), e12850.

van't Spijker, H. M., & Kwok, J. C. (2017). A sweet talk: the molecular systems of perineuronal nets in controlling neuronal communication. *Frontiers in integrative neuroscience*, 11, 33.

Veenstra-VanderWeele, J., Sikich, L., Melmed, R., von Hehn, J. S., Walton-Bowen, K. L., Kuriyama, N., & Cook, E. H. (2013). Randomized, controlled, phase 2 trial of STX209 for social function in ASD. *Int Meet Autism Res (IMFAR)*, 13, 102-001.

Vogt, D., Cho, K. K., Lee, A. T., Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L. (2015). The parvalbumin/somatostatin ratio is increased in Pten mutant mice and by human PTEN ASD alleles. *Cell reports*, 11(6), 944-956.

Vormstein-Schneider, Douglas, et al. "Viral manipulation of functionally distinct interneurons in mice, non-human primates and humans." *Nature neuroscience* 23.12 (2020): 1629-1636.

Wang, Lin-Han, Wen-Qun Ding, and Yan-Gang Sun. "Spinal ascending pathways for somatosensory information processing." *Trends in Neurosciences* (2022).

Wang, S., Jiang, M., Duchesne, X. M., Laugeson, E. A., Kennedy, D. P., Adolphs, R., & Zhao, Q. (2015). Atypical visual saliency in autism spectrum disorder quantified through model-based eye tracking. *Neuron*, 88(3), 604-616.

Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K. J., ... & Schwaller, B. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Translational psychiatry*, 5(3), e525-e525.

10. AGRADECIMIENTOS

A mis padres,

Por acompañarme a lo largo de mi vida, apoyarme, amarme y buscar mi desarrollo integral. “Mente, cuerpo y espíritu”, jamás he de olvidar la columna vertebral que son ustedes para mí. Gracias por estar conmigo en un eslabón más de mí caminar, por proteger mi ser y mis debilidades, robustecer mis fortalezas e impulsarme a crecer. Deseo con el corazón, poder regresarles aunque sea un poco de lo que me han dado.

A mi hermano,

Gracias por las risas, la atención, el respaldo y apoyo. Siempre has contado conmigo y lo seguirás haciendo, sé que te cuidas sólo, pero siempre tendrás a tu hermano mayor para respaldarte y protegerte.

A mi tutor y amigo, Dr. Mario Alberto Arias García,

Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollarme como investigador en el Laboratorio de Neurociencia Traslacional. Le admiro y respeto de sobremanera, su trayectoria es impresionante, aún más lo es la calidad de su persona. Gracias por la enseñanza continua, el profesionalismo, el acompañamiento, la amistad y el apoyo que en muchos sentidos me ha otorgado. Aún tenemos muchos proyectos y metas que alcanzar, cuente conmigo para lograrlos.

A la Dra. Violeta Gisselle Huerta López,

Gracias por la confianza y la apertura para desarrollar mi trabajo en el Laboratorio de Neurointegración. Gracias por considerarme uno más de sus alumnos, por la enseñanza, la confianza, la orientación y ejemplo de una investigadora de alto nivel. Le admiro y respeto en gran manera, conocerle es un honor.

A la Biol. Marcela Palomero,

Por la enseñanza, capacitación y orientación en técnicas como perfusión de animales y extracción de tejido nervioso. Así como todo el apoyo en la infraestructura para que el proyecto fuese una realidad. Gracias Marce, tu apoyo es vital para cumplir los objetivos del laboratorio.

A la M.en I.B.B. Gabriela Xochitl Ayala Méndez,

Por la capacitación brindada en el manejo y cuidado de los ratones Wild type y transgénicos utilizados en la presente tesis, determinación del ciclo estral y apareamientos programados, así como el apoyo académico en los experimentos de reconocimiento de nido familiar y novedoso. Por la orientación ética y de buena práctica al usar animales.

Gracias por la amistad, la alegría y el profesionalismo.

Al Técnico Académico Vladimir M. Calderón Ortiz,

Por su asesoría técnica, enseñanza, capacitación y orientación en softwares de análisis de señales ultrasónicas, así como en el análisis de videos con softwares automatizados.

Gracias por el apoyo, el tiempo, la atención y la amistad.

Al Dr. Ernesto Rendón,

Por la enseñanza y capacitación en las cirugías estereotáxicas, y la inyección de vectores virales para la expresión de los receptores de diseño.

Un agradecimiento profundo por el apoyo, la enseñanza de calidad y la amistad.

Al Biol. Dagoberto Tapia,

Por la enseñanza, capacitación y orientación en técnicas de histología. Gracias por la vasta experiencia que tiene a bien compartir con su servidor, por el tiempo, y la atención.

Al M.V.Z. Héctor Malagón Rivero,

Por la reproducción de ratones C57BL/6

A la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo,

Por la facilitación de ratones C57BL/6 para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Omar Hernández Gonzáles,

Del departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Por la orientación y revisión del manuscrito de la tesis.

Al Dr. Octavio Cesar García,

Por su orientación, comentarios y aportaciones a mi tesis, los cuales enriquecieron mi trabajo. Gracias por tal cálida atención a mi persona.

Al Dr. Fructuoso Ayala,

Por el tiempo y la atención a mi trabajo, y cuya gran experiencia me permitió enriquecer mi tesis.

Al Dr. Vladimir Orduña,

Por los cometarios, aportaciones y sugerencias tan precisas e importantes que fortalecieron mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio,

Por enseñarme con paciencia y ejemplo, la calidad y profundidad con la que se realiza la investigación en neurociencias. Por su apoyo, su amistad e impulso día a día para alcanzar esta meta.

Especialmente, un agradecimiento a la Lic. Regina Mejía por la orientación en las pruebas conductuales, su aplicación, registro y análisis. Gracias por tu amistad sincera.

Así mismo, un agradecimiento sincero y grande a la Mtra. Karina Linares, compañera de batalla, por el trabajo en equipo, la coordinación, la amistad, el impulso y la solidaridad. Gracias por tu amistad, es invaluable.

A la Dra. Olga Rojas, el Mtro. Misael Luna y el gran equipo de la Semana del Cerebro,

Gracias por tantos años de enseñanza y amor por las neurociencias que me fueron encaminando poco a poco a este campo tan apasionante. Gracias por ser una pieza fundamental en mi vida académica y personal, con tantas experiencias de por medio que sería imposible resumir. Gracias por su amistad, la llevo en mi afecto y en mi cognición.

En memoria de mi querido amigo y maestro, Dr. Julio Espinosa,

Por confiar en mí desde primer semestre, arrojarme en el Laboratorio de Cognición Numérica y permitirme impartir enseñanza. Gracias por el cariño, el aprecio, respaldo, respeto y apoyo que me otorgó. Aunque el Dr. Julio, ya no está con nosotros, permanece en mi memoria y en la memoria de los afortunados que le conocimos.

Gracias a todos aquellos que se han cruzado en mi camino y me han aportado enseñanza, amor, amistad, orientación, corrección y fortaleza.

¡Gracias!