



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

*“CONECTIVIDAD CORTICO-TALÁMICA DEL CIRCUITO
SOMATOSENSORIAL EN EL MODELO MONOGENICO DE
AUTISMO SHANK3 KNOCKOUT”*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A :
MIGUEL VELASCO OROZCO

ASESORA:
DRA. VIOLETA GISELLE LÓPEZ HUERTA
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

Ciudad Universitaria CD. MX. NOVIEMBRE, 2022

Facultad de Medicina



NEUROCIENCIAS
UNAM



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.

Agradecimientos:

A la Dra. Violeta Gisselle López Huerta, por haberme guiado y enseñado durante todo el tiempo que fui miembro de su laboratorio, por confiar en mí para realizar este proyecto de investigación.

A la Biol. Marcela Palomero Rivero por su asistencia técnica y apoyo.

A Juan Carlos Gómez Mendoza por su apoyo en el análisis de datos.

A José Durán por su apoyo en el diseño de algunas de las figuras.

A todos mis compañeros que contribuyeron con discusión fructífera durante la realización de este proyecto, sus sugerencias y sus correcciones.

A la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo y al M. en C. Francisco Pérez Eugenio del departamento de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Al Ing. Manuel Ortiz Benavides y al Ing. Aurey Galván Lobato del Taller de Mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular.

Al comité sinodal conformado por la Dra. Elvira Galarraga Palacio, Dra. Aliesha Araceli González Arenas, Dr. Salvador Leonardo Hernández López y al Dr. Daniel Reyes Haro por su valiosa retroalimentación.

Este trabajo fue realizado gracias a los programas:

UNAM-PAPIIT IA203520 “Control inhibitorio de circuitos talámicos en el adulto y durante el desarrollo”

UNAM PAPIIT IA206621 “Neurobiología de los déficits somatosensoriales del trastorno del espectro autista”

UNAM-PAPIME PE209622 “Diseño y generación de materiales digitales para la enseñanza teórico-práctica de la neurofisiología celular”

IBRO Early Career Award 2021 otorgado a la Dra. Violeta Gisselle López Huerta.

UNAM-DGOAE BECA DE TITULACIÓN-EGRESADOS ALTO RENDIMIENTO 2022-2023 otorgado a Miguel Velasco Orozco

Contenido:

Agradecimientos:.....	2
Sección 1: Antecedentes.....	6
1.1: Trastornos del Espectro Autista	6
Definición.....	6
Prevalencia e incidencia	7
Fisiopatología	8
Etiología.....	8
Genética	9
Variantes sindrómicas y no sindrómicas	10
Modelos de estudio	13
Síndrome Phelan-McDermid y Shank3	13
El modelo murino Shank3 KO.....	15
1.2: Procesamiento Somatosensorial.....	16
El circuito somatosensorial	17
El circuito córtico-talámico / tálamo-cortical	18
La Corteza somatosensorial primaria (S1).....	21
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos.....	22
Sección 2: Métodos	23
2.1: Ratones y genotipificación.....	23
2.2: Perfusión y Extracción	24
2.3: Registro y estimulación	25
2.4: Farmacología.....	26
2.5: Análisis de datos.....	27
-Preprocesamiento.....	27
-Visualización y Depuración.....	28
-Graficado General y medición de curva por estructura	29
-Área bajo la curva (AUC).....	31
2.6: Estadística	31
2.7: Curvas generales.....	32

Sección 3: Resultados.....	33
La respuesta de potencial de campo local en P0m y S1 en condiciones basales.....	33
La respuesta sináptica poblacional en S1 es similar en ambos grupos.....	35
La inhibición cortical se encuentra alterada en el modelo de autismo Shank3b KO	38
Las pendientes de la curva de actividad en S1 son significativamente diferentes entre grupos	41
El área bajo la curva muestra cambios en la inhibición cortical entre grupos.....	43
P0m tiende a hiperactividad en Shank3.....	44
Contribución de la inhibición en P0m	47
P0m conserva tendencias durante las diferentes condiciones experimentales	49
Actividad en P0m es mediada por inhibición dinámica.....	50
Sección 4: Discusión	53
La actividad cortical en Shank3.....	53
Excitabilidad incrementada, ¿inhibición disminuida?.....	55
Una perspectiva novedosa al microcircuito cortical alterado en S1 de Shank3.....	56
La integración talámica de orden superior	57
Referencias Bibliográficas:.....	61
Figuras suplementarias	75
Anexos	80

“A person who thinks all the time has nothing to think about except thoughts. So he loses touch with reality and lives in a world of illusion.”

-Alan Watts

Sección 1: Antecedentes

1.1: Trastornos del Espectro Autista

Definición

El trastorno del espectro autista (TEA) se refiere a una serie de alteraciones del neurodesarrollo donde los pacientes presentan déficits en la comunicación e interacción social, alteraciones en la percepción sensorial, conductas repetitivas o intereses restringidos (Lord et al., 2020). En el TEA, hasta el 70% de pacientes son diagnosticados con alguna comorbilidad psiquiátrica como ansiedad o depresión; o neurológica, como epilepsia (Mannion & Leader, 2013). Los criterios para catalogar un trastorno como TEA -según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales en su 5° edición (DSM-V) (American Psychiatric Organization, 2013)- son:

A) Plano social:

Interacción social anormal, fallos en la reciprocidad social-emocional, reducción emocional o afectiva, fallos para iniciar o responder a interacciones sociales.

Fallos en las conductas comunicativas usadas para interacción social, que pueden presentarse como una mala integración en la comunicación verbal-no verbal; mal uso de lenguaje hablado, gestos o lenguaje corporal, además de dificultad para entender los mismos; falta de expresión facial y contacto visual. Falta de comunicación no verbal.

Fallos al desarrollar, mantener y entender relaciones humanas, ausencia de interés en otras personas o sus intereses.

B) Plano conductual:

Patrones de conducta repetitiva y restricción en intereses y actividades. Estereotipias, uso de movimientos característicos o frases repetidas (constructos idiosincráticos o ecolalia).

Flexibilidad conductual pobre, rutinas altamente estructuradas y necesidad compulsiva de seguirlas, patrones ritualizados de comportamiento verbal o no verbal. El incumplimiento de estas rutinas o cambios externos producen ansiedad en quienes lo padecen.

Intereses exacerbados en situaciones, cosas u objetos específicos, con una intensidad anormal y una restricción perseverativa.

Hiper o hiporreactividad a estímulos sensoriales, respuestas anormales a texturas, temperatura, sonidos, olores, movimiento o luces. Intereses inusuales en aspectos del ambiente o aversión a ellos.

C) Neurodesarrollo:

La sintomatología debe comenzar a aparecer en períodos tempranos del desarrollo, pero puede no manifestarse en su máxima intensidad hasta que se llegue a la edad donde las demandas sociales excedan la capacidad de enmascaramiento desarrolladas durante el aprendizaje en los periodos anteriores de la vida (usualmente previo a la pubertad).

D) Afectación significativa:

La sintomatología debe generar un impedimento clínicamente significativo en el ámbito social, laboral u otras áreas donde se desenvuelva el sujeto.

E) La sintomatología y el desarrollo del trastorno no se explican mejor por alguna otra patología.

El DSM-V clasifica el diagnóstico según el grado de severidad del TEA en 3 categorías: Grado 1 'Requiere apoyo', Grado 2 'Requiere apoyo sustancial' y Grado 3 'Requiere mucho apoyo'.

Prevalencia e incidencia

En la población mexicana, Fombonne y colaboradores (2016; 2022) describen que la prevalencia del TEA ronda entre el 0.87% y 1%. Diversos estudios muestran de forma consistente que es mayor la proporción de hombres que mujeres diagnosticados con este trastorno; los estimados rondan desde los 0.8:1 hasta 6:1, con un promedio de 4:1 hombres a mujeres (Elsabbagh, 2020; Fombonne et al., 2022; Lord et al., 2020). A lo largo del tiempo se ha observado un incremento en la población que es diagnosticada con TEA, se desconoce si el efecto es debido a un incremento real en la aparición de la enfermedad o porque ahora se cuenta con mejores herramientas de diagnóstico (Fombonne, 2009; Fombonne et al., 2022; Volkmar et al., 2014). Otros autores discuten que este efecto es debido a las

metodologías de los estudios, donde se toman en cuenta los registros administrativos en vez de analizar a las poblaciones; sin cambios de incidencia relevantes a través del tiempo en niños o adultos (Brugha et al., 2014; James et al., 2018; Marcheselli et al., 2018).

Fisiopatología

La sintomatología del TEA aparece en los primeros años de vida, pero se sabe que muchos de los mecanismos que subyacen al trastorno tienen que ver con la maduración de los circuitos neuronales. Ejemplos de esto son: desbalance entre la excitación-inhibición (Yizhar et al., 2011) el cual se deriva de una maduración neuronal alterada al romperse la homeostasis intrínseca de las redes neuronales debido a fallos en las conexiones o refinamiento de las sinapsis ya sea por factores externos o internos (como genes alterados) (Turrigiano & Nelson, 2004); maduración y formación de dendritas y procesos sinápticos (Famitafreshi & Karimian, 2018), que ultimadamente afectan la consolidación de las redes y el establecimiento de conectividad funcional; fallos en autofagia y poda sináptica que impiden al sistema procesar correctamente la información y que probablemente alteren el proceso de lateralización cerebral ya que, al no refinarse las redes, los patrones de conectividad local y a larga distancia impiden el funcionamiento normal de las diferentes regiones cerebrales diferenciadas espacialmente (Courchesne et al., 2007; Eyster et al., 2012; Yenkovyan et al., 2017) ; también se ha hipotetizado que puede deberse a la ausencia de las llamadas 'neuronas espejo' (teoría del espejo roto) (Ramachandran & Oberman, 2006) aunque esta premisa se ha cuestionado de forma empírica y experimental (Fan et al., 2010).

Etiología

En general, dentro de la etiología e historia natural del TEA podemos encontrar que el desarrollo comprende factores heredables (genéticos) y no heredables (ambientales y epigenéticos). Estudios en gemelos revelan que el TEA tiene una alta contribución genética; se estima que entre el 39 y 95% de las personas diagnosticadas tienen al menos otro hermano con este trastorno. Entre los factores ambientales con mayor evidencia que se correlacionan con el

diagnóstico de TEA son: Hipoxia neonatal, diabetes Mellitus gestacional, uso de valproato sódico (anticonvulsivo) durante el embarazo, intervalo entre embarazos menor a 12 meses, edad materna mayor a 40 años, edad paterna mayor a 50 años, nacimiento prematuro, alteraciones o deficiencias metabólicas pre y perinatales, obesidad materna (Famitafreshi & Karimian, 2018; Lord et al., 2018, 2020). Los genes de regulación epigenética que controlan procesos de transcripción, modificación de cromatina y reparación del ADN se encuentran alterados (Tseng et al., 2022). El eje intestino-cerebro, mediado por los productos metabólicos de la microbiota, puede encontrarse alterado (de Magistris et al., 2014; Yenkovyan et al., 2017). Además de una deficiencia nutrimental que puede ser provocada por la ingesta restringida de alimentos, o por cambios en necesidades metabólicas provocados por alteraciones genéticas asociadas con TEA, como mutaciones en el gen MTHFR, que incrementa la demanda de folato en estos individuos (Compart, 2013).

Genética

La literatura muestra que los trastornos del neurodesarrollo, entre ellos el TEA, son altamente hereditarios, estimando que del 40% al 90% de individuos con un padre/madre diagnosticada también desarrollará TEA (Devlin et al., 2013; Lord et al., 2020). La mayoría de los pacientes con TEA no tienen una sola mutación en su genoma, sino una serie de alteraciones que dan como resultado una alta heterogeneidad genética. Los datos de tamizaje y análisis genético detectaron mutaciones *de novo* y variaciones en el número de copias en pacientes con TEA en 6 *loci* y de 65 hasta 102 genes de riesgo. Una gran cantidad de estos genes codifica proteínas encontradas en las neuronas, como: ARID1B, GRIN2B, SCN2A, SYNGAP1, DSCAM, SHANK2, SHANK3, FOXP1, NRXN1 entre otros (Lord et al., 2020; Sanders et al., 2012; 2015; Tatavarty et al., 2020). Los estudios de estos genes de riesgo reportaron que la temporalidad de activación de cada uno no es compartida y se expresan en diferentes tiempos de la vida del individuo (Sestan & State, 2018). Un factor interesante es que los genes afectados sobrelapan entre las diversas enfermedades del neurodesarrollo, además del trastorno bipolar e incluso

esquizofrenia; esta evidencia soporta la hipótesis del continuo genético, donde diferentes combinaciones de genes afectados desencadenan diferentes patologías con síntomas compartidos (Morris-Rosendahl & Crocq, 2020; Sanders et al., 2015). Esto genera la hipótesis de que varios de esos genes pueden estar compartiendo rutas metabólicas o cascadas de señalización, lo cual hace que desemboken en un punto en común. Este razonamiento pudiera servir para identificar mecanismos patológicos comunes, aun cuando existe una alta heterogeneidad genética (Devlin et al., 2013; Satterstrom et al., 2020). Otro dato importante es la sobrerrepresentación del sexo masculino en la incidencia, lo cual da la noción de que existe un efecto 'protector' sobre el sexo femenino al poseer 2 copias del cromosoma X, así que la carga genética alterada en el cromosoma X que debe tener una mujer para presentar una sintomatología clínicamente relevante es mayor y por ende las mujeres diagnosticadas suelen tener un cuadro más severo (Elsabbagh, 2020). El rol hormonal en el TEA no ha sido esclarecido en su totalidad, pero diversos estudios que investigan el rol diferencial de las hormonas sexuales en la plasticidad demuestran que según el sexo del animal tendrán diferente efecto los estrógenos o los andrógenos, pero en general las hormonas más relevantes para cada uno tienen un efecto estabilizador en la sinapsis. Estudios en humanos demuestran que las diferencias de actividad cerebral relacionadas al sexo en TEA son diferentes según la tarea que se está ejecutando y no necesariamente muestra una diferencia clara entre sexos o entre pacientes TEA y pacientes neurotípicos. Otros estudios correlacionan la presencia de testosterona fetal como un potenciador de riesgo para el desarrollo del TEA. Finalmente se ha propuesto que el efecto de una mayor proporción en hombres se debe a la manifestación propia del trastorno y pudiera ser diferente en mujeres, por lo que es sub diagnosticada (Beacher et al., 2012; Brandt & Rune, 2020; Ferri et al., 2018).

Variantes sindrómicas y no sindrómicas

Ahondando en las variantes del TEA, cuando el perfil genético del paciente diagnosticado posee mutaciones en varios genes de riesgo se le denomina 'TEA no sindrómico'. Los pacientes con TEA pueden ser definidos por mutaciones puntuales

y alteraciones monogénicas (10-20%), a estas variantes se les denomina 'TEA sintromico' (Devlin & Scherer, 2012; Morris-Rosendahl & Crocq, 2020). En el TEA no sintromico participan una serie de genes asociados a diferentes funciones celulares, la mayoría de estos están asociados a redes proteicas o cadenas de interacción que codifican para reguladores de cromatina o proteínas sinápticas (Sanders et al., 2015), además de diferentes canales ionotrópicos (sodio y calcio), ligasas de ubiquitina, proteínas de adhesión celular, cinasas, fosfatasas, metiltransferasas y demetilasas; así como factores de transcripción (**Figura 1**). Una característica importante es que las variantes no sintromicas son idiopáticas y no están asociadas a un cambio morfológico característico (Lord et al., 2020; Shen et al., 2021).

En contraste, el TEA sintromico se puede puntualizar a un solo gen afectado (también llamados desórdenes Mendelianos). Los pacientes que lo presentan tienen facies y morfolgia característica, además de identificarse un mayor grado de discapacidad cognitiva. Entre los síndromes se encuentran el Síndrome de la X frágil (gen FMR1), el síndrome de Rett (gen MECP2), el síndrome de Angelman/Prader-Willi (gen UBE3A), síndrome de Cohen (gen VPS13B), Esclerosis Tuberosa (gen TSC1/2) y síndrome Phelan-McDermid (gen SHANK3). Más del 30% de pacientes con estos síndromes (75% para Phelan-McDermid) también son diagnosticados con TEA, lo cual da indicios acerca de los mecanismos que subyacen al trastorno, ya que presentan los mismos síntomas (**Figura 1 Panel inferior**) (Elsabbagh, 2020; Grier et al., 2015; Lord et al., 2020; Morris-Rosendahl & Crocq, 2020; Sanders et al., 2015; Sestan & State, 2018; Susco et al., 2020).

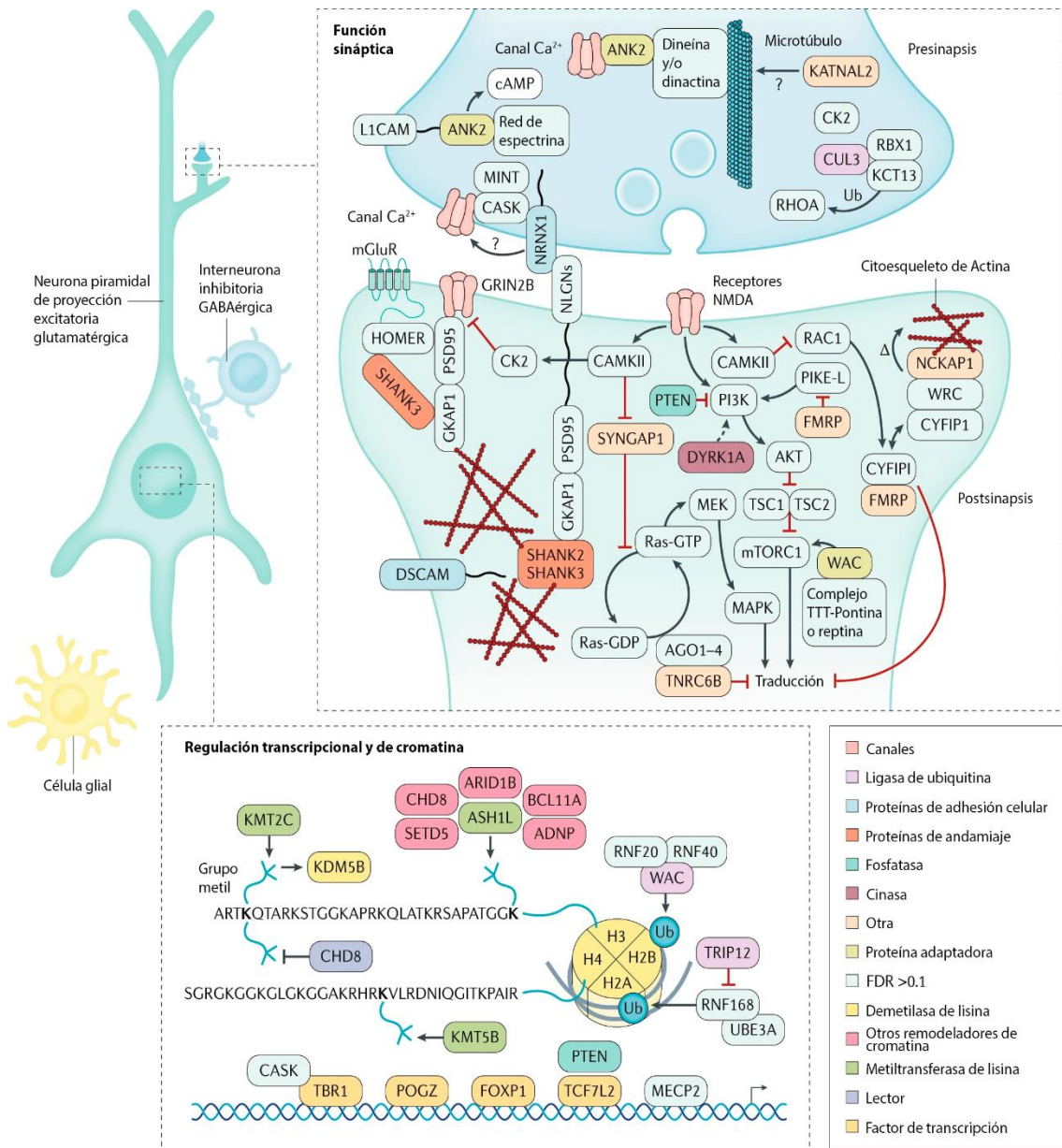


Figura 1: Proteínas y cascadas proteicas afectadas en el TEA.

Existe una alta diversidad de proteínas que se han encontrado involucradas en el TEA y sus subsecuentes cascadas de señalización, indicadas dentro de los óvalos en letras mayúsculas. Estas proteínas poseen una alta heterogeneidad de funciones, indicado en el color del óvalo y en el panel inferior derecho. Las proteínas involucradas se encuentran tanto en la presinapsis, como ANK2 y KATNAL2; como en la postsinapsis (panel superior), donde se encuentra la familia SHANK, FMRP o PTEN. También participan procesos nucleares, expresión y regulación del ADN, tales como MECP2, FOXP1 o

POGZ; y en la regulación de la cromatina, como CHD8, TRIP12 o KDM5B (panel inferior)
Modificado de Lord et al., 2020.

Modelos de estudio

Para poder entender la contribución de cada uno de estos genes al proceso fisiopatológico del TEA se han generado diferentes modelos animales. Los roedores (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus domestica*) se han convertido en el modelo principal por la facilidad y gran cantidad de literatura que existe al respecto de la mutagénesis en estos animales (Crawley, 2022). También hay modelos inducidos farmacológicamente que no poseen modificaciones genéticas, como lo es la exposición a ácido valproico (VPA) (Markram et al., 2008). La característica más relevante de los modelos de TEA es la capacidad de reproducir su sintomatología central, ya que esto proporciona las bases para poder investigar acerca de mecanismos neurobiológicos conservados entre especies y así dilucidar los mecanismos que lo subyace. En el TEA existe un grado de disfunción sináptica, ya que un conjunto de los genes involucrados codifican para proteínas de la sinapsis, lo cual puede dar como resultado un desbalance excitación-inhibición (Berkel et al., 2010; E. Lee et al., 2017; Peça et al., 2011; Tabuchi et al., 2007). El desbalance excitación-inhibición es un fenómeno que se produce por respuestas excitatorias exacerbadas o por redes inhibitorias hipoactivas, lo cual da como resultado un procesamiento anormal de la información. En sistemas neuronales de redes autoorganizadas se traduce en ruido que pudiera generar estados hiperexcitables (Chen et al., 2020; Rubenstein & Merzenich, 2003). Dentro de los modelos con mayor relevancia traslacional se encuentran el modelo de Síndrome X Frágil (deleción del gen FMR1); modelo de Esclerosis tuberosa (deleción del gen TSC1/2); y finalmente los modelos que involucran glicoproteínas de adhesión celular, donde se encuentran el modelo Cntnap2 (deleción del gen CNTNAP2) y el modelo Phelan-McDermid (deleción del gen SHANK3) (Crawley, 2022).

Síndrome Phelan-McDermid y Shank3

El síndrome Phelan-McDermid fue descrito por primera vez en 1988 por las Dras. Kathy Phelan y Heather McDermid, quienes encontraron una deleción en el

brazo largo del cromosoma 22 (22q13) en un paciente (Phelan et al., 2001). Los pacientes que presentan síndrome Phelan-McDermid se caracterizan por tener bajo tono muscular, retraso severo en la aparición del habla, retraso generalizado del desarrollo y características faciales dismórficas. Además, presentan discapacidad intelectual de moderada a profunda y patrones de comportamiento autista. La deleción del gen SHANK3 en la pérdida del segmento 22q13 es la causa principal de la enfermedad, aunque la gravedad está correlacionada con el grado de pérdida del extremo del brazo de este cromosoma (Betancur & Buxbaum, 2013; Phelan et al., 2005; Uchino & Waga, 2013). Las proteínas de la familia Shank, específicamente Shank3 está altamente expresada en la sinapsis de neuronas de la corteza, tálamo, estriado, hipocampo y células granulares del cerebelo (Monteiro & Feng, 2017). Shank3 es una proteína de andamiaje (post) sináptico, interactúa con receptores ionotrópicos AMPA y NMDA; además de metabotrópicos como mGluR, todos dependientes de glutamato **Figura 2** (Uchino & Waga, 2013). Diferentes estudios reportaron que el gen SHANK3 se encuentra mutado, además, en pacientes con diagnóstico de TEA sin síndrome Phelan-McDermid. Por lo tanto, la causa más común de TEA monogénico se debe a la haploinsuficiencia de este gen por su alta tasa de mutación y deleción (Hamdan et al., 2011). Todos estos hallazgos señalan que las mutaciones en Shank3 desembocan en mecanismos fisiopatológicos que provocan la sintomatología del TEA (Betancur & Buxbaum, 2013; Monteiro & Feng, 2017; Uchino & Waga, 2013).

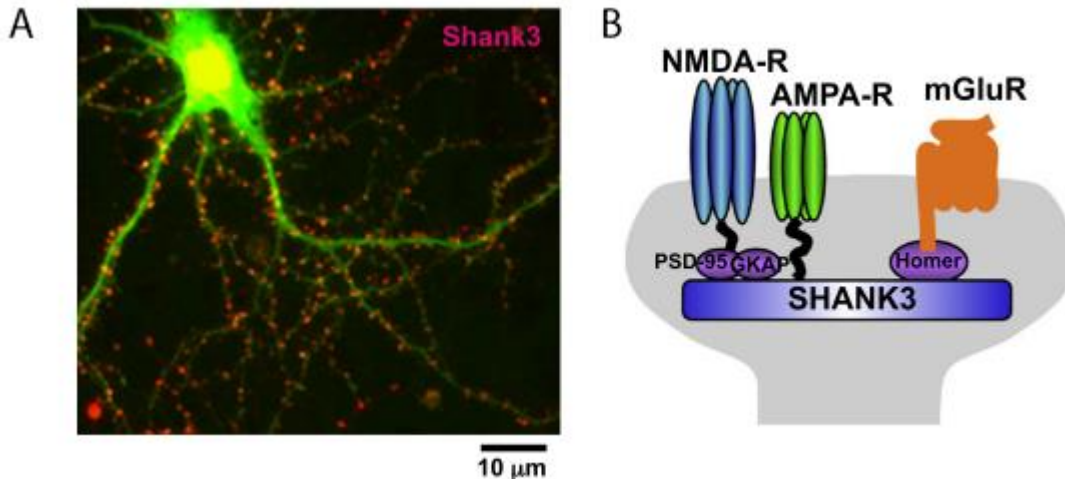


Figura 2: Expresión de Shank3 en las sinapsis glutamatérgicas y su interacción con receptores.

A) Micrografía óptica de inmunofluorescencia de cultivo primario de neuronas neocorticales de ratón, 12 días de edad, transfectada con proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) (color verde) y teñida con anticuerpo anti-Shank3 (color rojo). **B)** Note que Shank3 se encuentra en la sinapsis. Esquema del complejo Shank3-receptores glutamatérgicos. El receptor ionotrópico N-metil-D-Aspartato (NMDA-R) interactúa con la proteína PSD-95 y GKAP, formando un complejo multiproteico con Shank3. El receptor metabotrópico a glutamato (mGluR) está adosado a Shank3 a través de la proteína adaptadora Homer. El receptor ionotrópico de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA-R) se acopla directamente a Shank3. Modificado de Uchino & Waga, 2013

El modelo murino Shank3 KO

Debido al impacto de la mutación de SHANK3 en el ser humano y la sintomatología característica de TEA que provoca en los pacientes Phelan-McDermid, el equipo de Peça y colaboradores (2011) desarrollaron un modelo de ratones *Knockout* (KO) para el gen SHANK3 isoforma B [Shank3B^{-/-}] que recapitula tres de los signos cardinales del TEA: interacción social anormal, patrones de conducta repetitivos y alteraciones somatosensoriales. En su modelo encuentran que los ratones tienen un patrón de acicalamiento repetitivo, déficits en la

interacción social, alteración de la composición molecular en la densidad postsináptica estriatal, cambios en la morfología neuronal, hipertrofia estriatal y función alterada en este mismo núcleo; sembrando las bases de estudio de los mecanismos neuronales asociados al TEA en un modelo monogénico (Peça et al., 2011).

Este modelo puede utilizarse para explorar las bases neurobiológicas del TEA, así como buscar las alteraciones en las redes que dan origen a la sintomatología y fenotipos propios del trastorno.

1.2: Procesamiento Somatosensorial

Las alteraciones somatosensoriales en pacientes con TEA fueron descritas desde la década de 1940 (Kanner, 1943), y fueron incluidos como criterio diagnóstico en el DSM en su quinta edición (DSM-V) (American Psychiatric Organization, 2013). Las alteraciones se catalogan en los subtipos híper e hiposensible, donde cada uno de los subtipos está asociado a un fenotipo de desarrollo neurológico (Simpson et al., 2019). El desarrollo cortical, como parte del sistema somatosensorial, depende de la entrada activa de estímulos -si llega información imprecisa o alterada a la corteza de forma subsecuente ésta se va a desarrollar de forma anormal (Balasco et al., 2020). Hay grupos de investigación que sugieren que las reacciones de hipersensibilidad pueden estar alterando la atención hacia estímulos relevantes (por ejemplo, en un contexto social) al estar dirigiéndola a otro que no es útil para el contexto (por ejemplo, la sensación del roce de la ropa contra la piel), además de estar asociado a niveles elevados de ansiedad, estrés y depresión. En el caso contrario, cuando existe un perfil hiposensible los estímulos externos pueden no ser lo suficientemente llamativos para la persona, lo cual podría llevarla a buscar otros (por ejemplo, la repetición de patrones motores) y se asocia con comportamiento social disminuido y habilidades de comunicación empobrecidas (Balasco et al., 2020). La disrupción en el procesamiento cortical primario altera el funcionamiento de todas las redes asociadas y de los sistemas que las gobiernan, así como la temporalidad del desarrollo cerebral (Chomiak et al.,

2010; Elsabbagh, 2020; Moriuchi et al., 2017; Shen et al., 2021). Hay evidencia que sugiere que los circuitos involucrados en las alteraciones somatosensoriales en el TEA son los tálamo/estriato-corticales, prefrontales y regiones paralímbicas. Estos circuitos también controlan funciones ejecutivas y otros dominios cognitivos (Alexander et al., 1986; Briggs & Usrey, 2008; Verdejo-garcía & Bechara, 2010). El tálamo es uno de los puntos de preprocesamiento y direccionamiento de señales sensoriales hacia cada una de sus cortezas primarias asociadas para casi todas las modalidades sensoriales (excepto la olfativa); existe evidencia que el tálamo tiene cambios morfológicos y funcionales en pacientes con TEA, como la conectividad funcional talámica (Fu et al., 2019), morfología tálamo-estriatal (Schuetze et al., 2016) e hiperconectividad distribuida a lo largo del cerebro (Woodward et al., 2017). El circuito corticotalámico participa de forma extensiva en la regulación del procesamiento sensorial (Briggs & Usrey, 2008; Crandall et al., 2015). Toda esta evidencia apunta a que la disfunción de este núcleo y sus proyecciones hacia la corteza pudieran estar explicando cómo se altera el procesamiento de la información en el TEA.

El circuito somatosensorial

En los seres humanos, el circuito sensorial que se encarga de transmitir las señales de presión, tacto ligero, tacto discriminatorio y vibración se origina en las terminaciones nerviosas y receptores (corpúsculos de Meissner y Pacini) que se encuentran distribuidas por la superficie corporal, los nervios que conducen esta señal ascienden por la columna dorsal y hacen sinapsis con los núcleos Grácilis y Cuneatos (neurona de primer orden); la segunda sinapsis se da a nivel talámico, con el núcleo Ventral Posterolateral (neurona de segundo orden); para finalmente llegar a la corteza somatosensorial primaria (neurona de tercer orden) (Snell, 2010).

En el circuito somatosensorial de roedores la información llega a la corteza a través de vías paralelas: la vía lemniscal, la vía extralemniscal y la vía paralemniscal (Bureau et al., 2006; Ma, 1991; C. Mo et al., 2017; Veinante et al., 2000):

- En la vía lemniscal la información viaja de las vibrisas y la cara; al ser tan relevante esta información para la percepción del animal se mantiene una

representación topográfica 1:1 de cada bigote a lo largo de toda la vía, comenzando en el nervio trigémino, donde las estructuras que se forman asociadas a cada bigote se denominan barriletes; de ahí la siguiente sinapsis es en el tálamo, específicamente en núcleo Ventral Postero-Medial (VPM), donde las subestructuras se nombran barriloides. Este núcleo del tálamo proyecta aferentes hacia la corteza somatosensorial primaria (S1), capa IV, en la denominada 'corteza de barriles'. La vía lemniscal es la principal acarreadora de la información relevante para ser procesada en la corteza primaria y distribuida a cortezas asociativas.

- En la vía paralemniscal se hace sinapsis con el núcleo interpolar del nervio trigémino (segmento rostral), de ahí las aferencias proyectan al núcleo Postero-Medial (POm) y a su vez hacia S1 capa V, hacia la corteza somatosensorial secundaria (S2) y hacia cortezas motoras. La vía paralemniscal posee dos funciones principales: acarrear y distribuir información para su procesamiento en la corteza primaria y también es responsable de modular este mismo procesamiento en su corteza.
- Finalmente, en la vía extralemniscal la información que viaja por el nervio trigémino llega al núcleo interpolar (segmento caudal), donde proyecta hacia VPM, de ahí las proyecciones hacia corteza S1 llegan a la zona inter-barriles (septos) y hacia S2.

Estos circuitos poseen cierto grado de homología dada su conservación evolutiva, por lo que la información generada en el estudio de modelos sirve para extrapolar mecanismos compartidos (Kaas, 1989).

El circuito córtico-talámico / tálamo-cortical

El tálamo es una estructura situada por debajo de la corteza, por delante del cerebelo y arriba del mesencéfalo, en el centro del cerebro. Hay un tálamo por cada hemisferio cerebral, estos dos tálamos se unen a través de la adhesión intertalámica. Posee una alta cantidad de conexiones recíprocas entre la corteza y otras áreas cerebrales, por lo que sus conexiones son dispersas a lo largo de todo el cerebro. Es una estructura excitatoria, por lo que sus sinapsis son del tipo

glutamatérgico. En su interior existen divisiones cito-funcionales (núcleos) asociadas a diferentes modalidades sensoriales (táctil, visual, auditiva). Sus núcleos se denominan de orden primario (PO) si la información proviene del exterior y viaja hacia la corteza primaria; si la información proviene de la corteza primaria y viaja hacia cortezas asociativas se denominan núcleos de orden superior (SO) (Sherman, 2006). Además de los núcleos internos existe otro denominado Núcleo Reticular Talámico (NRT) que se encuentra localizado exterior al tálamo, cubriéndolo en su cara lateral-dorsal en extensión antero-posterior. Su localización intermedia entre el tálamo y la corteza es clave para el procesamiento de la información, ya que los axones provenientes del tálamo hacia la corteza (tálamo-corticales [TC]) y los que provienen de la corteza hacia el tálamo (córtico-talámicos [CT]) hacen sinapsis con el NRT. El NRT es el único núcleo inhibitorio del tálamo y proyecta hacia todos los núcleos interiores de éste (**Figura 3**) (Dong et al., 2019; C. C. Lee & Sherman, 2008; X. C. Mo & Sherman, 2019; Pinault, 2004; Sherman, 2006; Staiger & Petersen, 2021; Vertes et al., 2015).

Los núcleos PO se consideran los iniciadores '*driver*' de la actividad en cortezas primarias, mientras que los SO poseen funciones modulatorias hacia el procesamiento de la información en corteza primaria, pero actúan como '*driver*' de cortezas secundarias (Whilden et al., 2021; Zhang & Bruno, 2019).

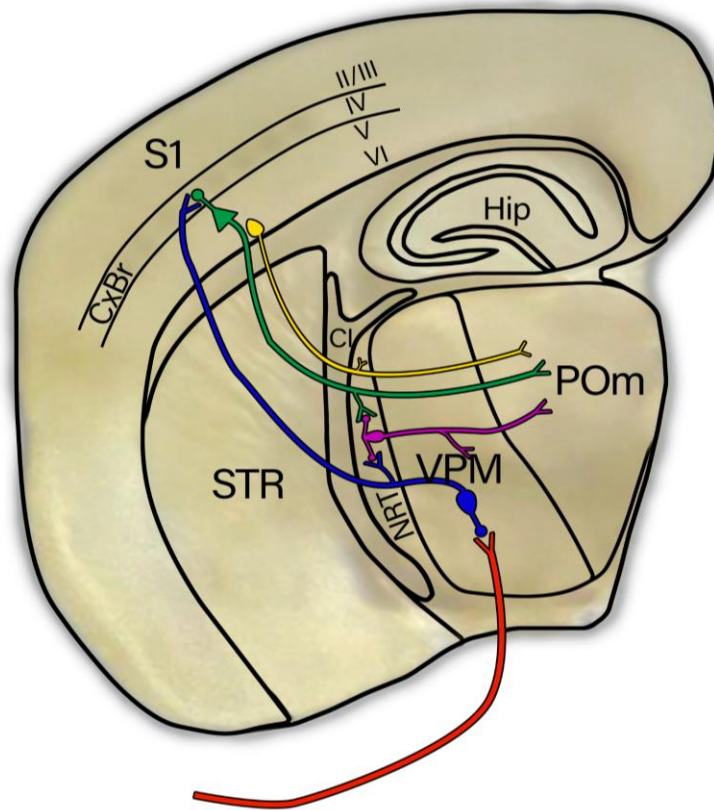


Figura 3: Esquema de los circuitos tálamo-corticales-corticotalámicos (TC-CT)

En general, la información proveniente del exterior, captada por las vibrisas, viaja por el nervio trigémino y llega al núcleo VPM (PO), de ahí la información se proyecta hacia la corteza S1, capa IV (barriles) pasando por el NRT, donde hace sinapsis. Desde la corteza S1, capa V y VI, la información proyecta hacia el núcleo POm (SO) pasando de nuevo por NRT. Desde POm la información es transferida hacia cortezas de asociación como S2 y corteza motora secundaria (M2). El NRT recibe entradas sinápticas desde todos los axones que lo atraviesan (CT y TC) y proyecta hacia tálamo, ejerciendo su efecto inhibitorio tanto en núcleos PO como núcleos SO. La cápsula interna es el tracto principal por donde pasan los axones tanto TC como CT (Adibi, 2019). **Simbología:** S1: Somatosensorial primaria, CxBr: Corteza de Barriles; STR: Estriado; Cl: Cápsula Interna; NRT: Núcleo Reticular del Tálamo; VPM: Núcleo Ventral Postero-Medial; POm: Núcleo Postero-medial; Hip: Hipocampo. Rojo: Aferencia trigeminal vía lemniscal. Azul: Neurona Tálamo-Cortical (TC). Verde: Neurona Córico-Talámica (CT). Morado: Neurona Reticular Talámica. Amarillo: Neurona Capa VI.

La Corteza somatosensorial primaria (S1)

El microcircuito cortical columnar referente a un barril en la corteza S1 posee varios componentes involucrados en el procesamiento de la información, asociados a cada una de sus capas. La capa II/III tiene una baja tasa de disparo basal y poca actividad correlacionada con la actividad de su barril subyacente; recibe aferencias desde corteza motora primaria (M1), así como POm y corteza somatosensorial secundaria (S2), la actividad de esta capa es responsable de la modulación sensitiva e integración recíproca cuando se ejecuta una actividad motora (Zhang & Bruno, 2019). La capa IV de la corteza S1, en los denominados barriles, recibe aferencias primariamente de capa VI (~50%) y del núcleo VPM (~5%), esta capa se considera el principal centro de procesamiento somatosensorial, donde cada barril está asociado a una sola vibrisa. Proyecta principalmente hacia capa V (C. C. Lee & Sherman, 2008). La capa V recibe entradas de forma columnar a lo largo de todas las capas, se les considera un centro integrador; proyecta hacia POm (Staiger & Petersen, 2021). La capa VI recibe entradas tanto de VPM como POm, facilitan conexiones cortico-corticales y están asociadas a control espacio-temporal y sincronización (Staiger & Petersen, 2021).

El circuito TC-CT involucrado en el procesamiento sensorial ha sido ampliamente descrito en condiciones no patológicas. Con el modelo murino de autismo monogénico Shank3 KO podemos explorar las alteraciones en este circuito, específicamente en la corteza de barriles (S1) y el núcleo SO POm, para así poder entender cuáles son las bases neurobiológicas en las alteraciones somatosensoriales en los TEA.

Investigaciones previas mostraron que los circuitos TC-CT poseen conectividad alterada en pacientes con TEA, ya sea en niños (Nair et al., 2013, 2021), como en adultos (Ayub et al., 2021; Braden et al., 2017). A nivel molecular también se han encontrado cambios en el tálamo, por ejemplo, el sistema GABAérgico está alterado, lo que soporta la hipótesis sobre el desbalance excitación-inhibición (Fung et al., 2021). Toda esta evidencia apunta a que los

sistemas C3rtico-T3lamicos / T3lamo-Corticales tienen alg3n grado de disfunci3n, que recae -en el caso del modelo Shank3 KO- en una sinapsis alterada al no poseer las prote3nas necesarias para el correcto funcionamiento de los receptores excitatorios glutamat3rgicos y esto a su vez provoca un desbalance en la proporci3n Excitaci3n-Inhibici3n que alteran el procesamiento de la informaci3n en el cerebro.

Hip3tesis

La amplitud sin3ptica poblacional evocada el3ctricamente en el n3cleo tal3mico posteromedial (POm) y en la corteza somatosensorial primaria (S1) ser3 menor en el modelo de autismo Shank3b KO comparado con sujetos WT.

Objetivo general

Comparar los potenciales sin3pticos de campo evocados por estimulaci3n el3ctrica de fibras cortico-tal3micas en POm y estimulaci3n intracortical en S1 de ratones Shank3b KO y WT de la misma camada.

Objetivos espec3ficos

- Realizar registros de potenciales post-sin3pticos poblacionales evocados por estimulaci3n de fibras corticotal3micas en POm ex vivo en ratones Shank3b KO y ratones WT de la misma camada.
- Registrar potenciales post-sin3pticos evocados por estimulaci3n intracortical en la corteza de barriles S1 ex vivo en ratones Shank3 KO y ratones WT de la misma camada.
- Disecar farmacol3gicamente los componentes inhibitorios y excitatorios de las respuestas en los diferentes n3cleos registrados.

Sección 2: Métodos

2.1: Ratones y genotipificación

El protocolo de uso de animales fue evaluado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (CICUAL-IFC) código de registro VLH151-19. Todos los experimentos fueron realizados bajo las pautas y lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándares 22°C, 40% de humedad, con un ciclo luz/oscuridad de 12hr (luces encendidas 7:00am) con agua y alimento *ad libitum* en las instalaciones de Bioterio y Vivarium del Instituto de Fisiología Celular.

Los experimentos fueron realizados en el modelo murino (*Mus musculus*) SHANK3B Knockout, cepa *Shank3tm2Gfng* (Peça et al., 2011) Los dos genotipos de interés, KO Homocigoto y Wild-Type, se obtuvieron por medio de cruza entre heterocigotos; se realizó una genotipificación de tejido por muesqueo de oreja y PCR convencional (Joubert et al., 2020). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron: reverso KO 21798 (GCT ATA CGA AGT TAT GTC GAC TAG G), reverso WT 21796 (TGA CAT AAT CGC TGG CAA AG) y común 21795(GAG ACT GAT CAG CGC AGT TG).

En total se usaron 20 ratones (8 machos,12 hembras), de 8 camadas diferentes, con un rango de edad de 20 a 25 días postnatales (media: 22.33 días, desviación estándar: 1.35); 10 para el grupo Shank3 KO, 10 para el grupo Control. El rango de pesos fue de 5.4g-11.8g (Media: 8.07g, desviación estándar: 1.8g) **(Tabla 1)**.

Para evitar sesgos durante los registros y análisis de datos se mantuvo un protocolo doble ciego, donde los diferentes genotipos fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos: A o B. El autor desconocía cuál grupo correspondía a qué genotipo hasta que se completaron los experimentos y los análisis de datos.

2.2: Perfusión y Extracción

Los ratones fueron pesados (**Tabla 1**) y anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (100 mg/kg, 16 mg/kg respectivamente) para extraer el cerebro del ratón y realizar registros electrofisiológicos *ex vivo* (CSH, 2006).

Una vez alcanzado y comprobado el plano anestésico profundo se perfundió de forma trans-cardial con una solución alta en sacarosa (**Tabla 2.1**) a $\sim 2^{\circ}\text{C}$ saturada con una mezcla de carbógeno por 15 minutos antes de la perfusión (95% O_2 + 5% CO_2) (Mezcla Médica Carbógeno 5%, INFRA). El volumen de perfusión fue en promedio 7ml de solución por animal, lo que es aproximadamente 7 volemias para el ratón. Después de decapitar y extraer el cerebro del cráneo éste se colocó en un papel filtro donde se retiraron los bulbos olfatorios y el cerebelo con un corte coronal, y se separaron los hemisferios por la línea media (**Figura 4A**) La forma óptima de extracción de rebanadas que conserven los circuitos tálamo corticales fue descrita por Agmon y Connors (1991), donde el corte se realiza de forma coronal oblicua a 45° en Vibratomo (Vibratome 1000 Plus, The Vibratome Company) (**Figura 4A**). El grosor de los cortes fue de $250\mu\text{m}$. El circuito se mantiene íntegro en aproximadamente 2 rebanadas de cada hemisferio, los cuales se seleccionan de forma cuidadosa buscando los marcadores anatómicos señalados en la **Figura 3**. Una vez recolectadas las rebanadas de interés se incuban en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF/Krebs) (**Tabla 2.2**) a 33°C por 10 minutos, después se dejan incubando a temperatura ambiente durante 1 hora para el restablecimiento y estabilización del tejido, saturados con carbógeno en todo momento (Suter et al., 1999). La perfusión, extracción y corte de cerebro de todos los experimentos se hizo entre 11:30am y 12:00pm.

Grupo	Rango de Edades	Rango de Pesos
Shank3 KO	21-25 Días Post Natales	5.5-10.7g
Wild Type	20-24 Días Post Natales	5.4-11.8g

Tabla 1: Rango de edades y pesos para ambos grupos de ratones

2.1: Solución de Sacarosa		2.2: ACSF / Solución Krebs	
<u>Compuesto</u>	<u>Concentración</u>	<u>Compuesto</u>	<u>Concentración</u>
NaCl	30 mM	NaCl	136 mM
KCl	4.5 mM	KCl	3.5 mM
NaH ₂ PO ₄	1.2 mM	NaH ₂ PO ₄	1.25mM
Glucosa	10 mM	NaHCO ₃	26mM
Sacarosa	194 mM	Glucosa	11mM
NaHCO ₃	26 mM	MgCl ₂	1mM
MgCl ₂	2 mM	CaCl ₂	2mM
CaCl ₂	0.2 mM	Para ambas: Osmolaridad 300mOsm y pH 7.36	

Tabla 2: Concentraciones de las soluciones de Sacarosa y Líquido Cerebro-Espinal Artificial (ACSF)/Solución Krebs

2.3: Registro y estimulación

El método de registro utilizado fue Potencial Local de Campo (LFP, Local Field Potential) usando una micropipeta de borosilicato con una resistencia de 2 a 3M Ω (Sutter Instrument Company) y con un amplificador Cornerstone BVC-700A (Dagan Corp., Minneapolis, ME). Las estructuras registradas fueron el núcleo Postero-medial (POm) y la corteza somatosensorial primaria (S1), también llamada corteza de barriles, según lo descrito por Landisman y Connors (2007). Para generar los potenciales evocados se estimuló eléctricamente en una zona focalizada con un electrodo bipolar concéntrico de Iridio-Platino, con un diámetro de 12.5 μ m (FHC Neural Microtargeting worldwide, #CBBPC75) y con un estimulador aislado Digitimer DS2A (Digitimer Ltd., UK) con voltajes desde 10V hasta 100V en

incrementos de 10V. Las características de la estimulación fueron: Una secuencia de pulso pareado de 1ms de duración cada uno, que se presentaban 50ms después de iniciar el ensayo, con una separación de 99ms entre ellos completando una frecuencia de 10Hz y con una duración de ciclo entre trenes de 10 segundos (para evitar depletar la sinapsis y permitir al tejido restablecerse). Para cada amplitud se realizaron 20 ensayos (ciclos) del pulso pareado, colocando el electrodo en la cápsula interna (CI) (**Figura 4B, negro**) cuando se registraba el núcleo P_{Om} (**Figura 4B, rojo**) o en la capa II/III de la corteza S1 (**Figura 4B, azul**) mientras se registraba la capa IV de la misma (**Figura 4B, verde**), generando curvas Amplitud-respuesta (Zhou et al., 2016) comprendidas por 7 iteraciones de registro por cada estructura, un total de 140 ensayos por amplitud. Durante los experimentos se mantuvo una velocidad de perfusión constante de solución ACSF de 1ml/min (Suter et al., 1999).

2.4: Farmacología

Después de haber completado una curva Amplitud-Respuesta con las 10 amplitudes en condición basal se cambió la solución ACSF del baño por una que contenía ACSF + Metilioduro de Bicuculina (Sigma Chemical Co.), antagonista competitivo GABA_A, a una concentración de 10μM, la cual se dejó circular por 5 minutos antes de repetir el protocolo. Una vez finalizada la condición Bicuculina (BC) se cambió a otra solución ACSF que contenía una mezcla de NBQX (Alomone Labs), antagonista AMPA, a una concentración 1μM; y DL-AP5 (Alomone Labs), antagonista NMDA, a una concentración 10μM; y de nuevo bicuculina a concentración 10μM para no perder el bloqueo GABAérgico. Igualmente se dejó circular esta solución por 5 minutos antes de repetir el protocolo y generar la curva amplitud-respuesta condición cocktail (K) (**Figura Suplementaria 4, panel izquierdo**).

2.5: Análisis de datos

Ya que no existe un software especializado para nuestras necesidades de análisis, el análisis de datos se programó en varios *scripts* hechos en Python para automatizar y mantener constancia entre todos los análisis, así como en GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.; California). El flujo de análisis se divide en 4 partes principales (todo detallado en su correspondiente sección): Preprocesamiento automático; los archivos se preparan con la estructura correcta para ser leídos en los siguientes scripts, se corrige offset de voltaje y se filtra la señal. Depuración; se visualiza la información de cada uno de los archivos para verificar que no haya artefactos en los diferentes ensayos de cada una de las amplitudes, condiciones y estructuras; se remueven aquellos que no correspondan a una señal útil. Graficado general y medición de curva por estructura; se toman todos los archivos correspondientes a una estructura de un día de registro con las 3 condiciones y se miden los diferentes parámetros de amplitud, pendiente y área de forma semi automática. Curvas generales; se toman todos los archivos de resultados generados por el paso anterior de todas las iteraciones para todas las estructuras y todas las condiciones y se hacen las gráficas finales. Estadística; se mide la significancia de las diferencias observadas entre cada uno de los grupos en las diferentes condiciones utilizando el estadístico U Mann-Whitney. Se determinó que debía usarse esta prueba no paramétrica, no pareada, ya que de los 28 sets de datos experimentales solamente 1 cumplió con el criterio Shapiro-Wilk para normalidad.

Todos los *scripts* se programaron con interfaces gráficas y se generalizaron para que puedan seguir siendo utilizados en experimentos de LFP similares en el laboratorio (**Figura 4C**).

-Preprocesamiento

Los archivos que genera el programa Im-Patch, desarrollado en ambiente Lab View (Pérez-Ortega, National Instruments, México; www.im-patch.com) de registro son formato CSV con valores de voltaje muestreados a una frecuencia de

5kHz, dichos valores no se encuentran centrados a cero y se registran con el offset inducido por la tina de registro, por lo que era necesario tener un punto de referencia común para que todas las variables fueran medidas correctamente. Este offset se obtuvo al promediar el valor de voltaje de los 50ms antes de la aparición del primer pulso, este valor promedio se consideró como el offset inicial de la señal y se le restó al resto de la señal, este proceso se repitió por cada uno de los ensayos para todos los archivos, (**Anexo 1**). Después de corregir el offset se aplica un filtro Savitzky-Golay, ya que este filtro tiene la característica de conservar bien la forma y amplitud de la señal mientras que reduce el ruido, además de haber sido utilizado en protocolos similares anteriormente (Schlabrendorff, 2004) (**Anexo 2**). Los parámetros del filtro se determinaron con la condición de que debían conservar la amplitud original de la señal (para el factor de amplificación) debía conservar la forma general de la ecuación (orden) y debía reducir el ruido de alta frecuencia (ancho de ventana); según las características de la señal y de cada una de las estructuras, probando manualmente el filtro con rangos de valores entre 0.5 y 2 para el factor de amplificación, 1 y 3 para el orden de la ecuación y 0.5-3ms para el ancho de ventana se obtuvo que los parámetros apropiados para P0m fueron de 1.18 para amplificación, 1° orden, 1ms para ancho de ventana; mientras que para S1 fueron 1.1 para amplificación, 1° orden y 1ms de ancho de ventana. Se remueven las primeras 5 filas de cada uno de los archivos, ya que estas solamente contienen datos técnicos que no son necesarios para el análisis, pero si se dejan interfieren con los demás programas. Por último, se guarda como un archivo nuevo y se conservan los datos crudos en los originales. **Anexo 7: Diagrama del script.**

-Visualización y Depuración

Después de haber corregido el offset y filtrado cada uno de los archivos, el siguiente *script* tiene la función de visualizar todos los eventos contenidos dentro de un mismo archivo, se exploran en la interfaz interactiva de Matplotlib y esto permite navegar con el ratón toda la señal, buscando artefactos (**Anexo 3**). En caso de ser necesaria la depuración se introduce manualmente el número de evento a depurar,

para lo cual es necesario haberlo identificado desde el momento de grabar el registro y haber grabado ensayos extra (más de 20) ya que al momento de que se remueva el depurado se va a reemplazar con alguno de los ensayos extra.

El límite de depuración de eventos por archivo fue de 5 eventos. Al finalizar la depuración se reescribe el archivo y se trunca a 20 eventos (en el caso de que hubiera más), para que todos los experimentos, en todas las amplitudes y todas las condiciones tuvieran 20 ensayos. **Anexo 8: Diagrama del script.**

-Graficado General y medición de curva por estructura

Para el siguiente paso se toma alguna de las estructuras registradas por cada uno de los días, el programa solicita los 10 archivos de cada una de las condiciones (Basal, BC, K) y pide rangos en X y Y para generar las gráficas, las cuales hace una por cada amplitud, mostrando los 20 ensayos y la curva promedio; y una gráfica general donde aparecen las 10 amplitudes, esto para las 3 condiciones. Las siguientes gráficas que genera son las restas digitales, donde resta para cada uno de los ensayos, la condición bicuculina - basal (para visualizar la contribución del componente inhibitorio); y otro set de restas de Basal - Cocktail (para visualizar la respuesta sináptica sin la salva aferente) (**Anexo 4, Figura Suplementaria 4, panel derecho**). Después de crear y guardar las gráficas el programa inicia el segmento de anotación de puntos temporales, esta anotación sirve para determinar 4 puntos:

- Fiber Volley Peak (FVP):

Este punto representa el inicio de la salva aferente, es decir, la transmisión del potencial de acción a través de los axones, partiendo desde el área estimulada hacia el área registrada.

- Fiber Volley End (FVE):

Este punto simboliza el final de la salva aferente, es decir, el final del potencial de acción a través de los axones estimulados.

- Synaptic Peak (SP):

En este punto inicia la actividad sináptica, es el potencial generado en la post-sinapsis después de la liberación de neurotransmisores presinápticos.

- Synaptic Valley (SV):

Este punto es el final de la actividad sináptica y la subsecuente repolarización de las neuronas post-sinápticas estimuladas por la liberación de neurotransmisores.

Estos términos fueron creados durante este trabajo para poder mantener homogeneidad en los análisis y describir los componentes de la señal de potencial de campo generada tras la estimulación eléctrica. También se evalúan sus símiles en condición BC: bFVP, bFVE, bSP, bSV; se puede observar cada uno de estos componentes en la **Figura 4D**.

El programa además obtiene de forma automática las crestas y valles del segmento de señal a considerar, el cual es una ventana de 10ms a partir de cada uno de los pulsos. También se incluye la primera derivada de la señal, para corroborar los máximos y mínimos locales de la señal, donde el detector de crestas y valles no logró detectarlos; y la segunda derivada de la señal, para mostrar los puntos de inflexión de la señal y determinar dónde hubo un cambio de voltajes cuando la señal no se separa en sus componentes de forma inmediata. Toda esta anotación de puntos temporales también se corrobora con la resta de la condición Basal-Cocktail, pero la medición se realiza sobre la condición basal y BC, no en las restas digitales. También se tomó en cuenta la temporalidad de aparición de cada uno de los eventos y su duración para poder determinarlos entre sí.

El programa mide 3 características de la señal: La amplitud de la deflexión sináptica, la pendiente del valle sináptico y la pendiente de la salva aferente (todos estos componentes se describen a detalle en la primera parte de la **Sección 3: Resultados**). La amplitud de deflexión sináptica se determina como la diferencia de voltajes entre el SV y SP sobre la señal promedio de cada amplitud asociada a esa estructura. La pendiente del valle sináptico se determina al tomar los datos comprendidos entre SV y SP y haciendo una regresión lineal entre ellos, el resultado que se toma en cuenta es la pendiente de la recta generada por la regresión (**Anexo 5**); este mismo proceso se hace con los datos comprendidos entre los puntos FVP y FVE, como se puede observar en la **Figura 4D**. Al finalizar el programa se generan

archivos con cada una de las mediciones, para después ser concatenados en el script de curvas generales. **Anexo 9: Diagrama del script.**

-Área bajo la curva (AUC)

Para determinar la contribución GABAérgica en los registros se tomó la condición BC y se le restó digitalmente la condición basal, por cada ensayo, en cada amplitud para el mismo experimento y se graficó la curva promedio resultante de la resta, en esta curva resultante se calculó el área bajo la curva del segmento que cruza hacia el lado negativo, es decir, corrientes excitatorias; utilizando el método de integración por trapezoides entre cada uno de los puntos muestreados de la señal con respecto al voltaje 0. Esta medición se hizo desde el final del pulso con una ventana de 50ms (**Anexo 6**). El programa genera otro archivo con el valor numérico de la integración asociada a cada una de las amplitudes de estimulación. **Anexo 10: Diagrama del script.**

2.6: Estadística

Para determinar qué tipo de estadístico debería usarse se tomaron todos los sets de datos que generaron los scripts anteriores y se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con un criterio de $p < 0.05$ para determinar normalidad, la cual no se cumplía en la mayoría de los casos, por lo que se seleccionó la prueba no paramétrica para muestras independientes U Mann-Whitney, igualmente con un criterio de $p < 0.05$ para determinar significancia estadística entre ambas poblaciones. Para cuantificar la diferencia estadística entre los ajustes lineales se hizo la prueba de Fisher, se considera significancia estadística cuando el valor de $p < 0.05$.

2.7: Curvas generales

El Script designado para generar las curvas generales toma todos los archivos generados por el análisis de curva y por el script para determinar área bajo la curva, los concatena, aplica la prueba estadística y genera las gráficas finales. También se obtuvieron a partir de las generadas por el software de GraphPad Prism.

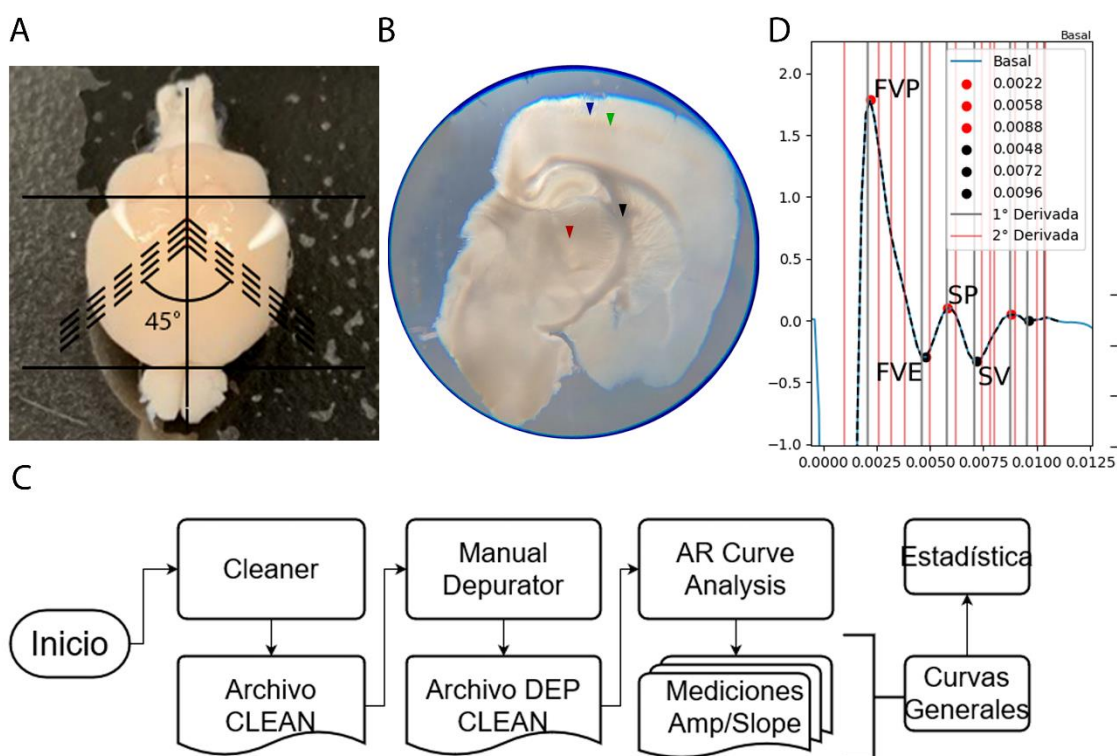


Figura 4: Métodos.

A) Sitios de corte en el cerebro: Línea media, bulbos y cerebelo en línea continua; rebanadas TC, línea punteada. **B)** Micrografía de rebanada ejemplo. Sitios de registro: Rojo, P0m; Verde, S1. Sitios de estimulación: Negro, P0m; Azul, S1. **C)** Diagrama de flujo de trabajo para el análisis de datos. **D)** Componentes en la medición: Fiber Volley Peak (FVP), Fiber Volley End (FVE), Synaptic Peak (SP), Synaptic Valley (SV).

Sección 3: Resultados

La respuesta de potencial de campo local en P_{Om} y S1 en condiciones basales

Para analizar si existen alteraciones en la conectividad funcional poblacional en la corteza somatosensorial primaria y en el núcleo talámico P_{Om}, se realizaron registros de potencial de campo evocado en rebanadas de cerebro donde se conservó el circuito somatosensorial (ver **Métodos**).

Para S1 la estimulación se hizo en la capa II/III y se registró en capa IV, aquí se observa despolarización axonal, también existen componentes somáticos y estimulación de otras células e interneuronas circundantes. En el caso de P_{Om} el electrodo fue colocado en la cápsula interna, la estimulación se hizo sobre los axones CT que descienden, pasando por NRT y finalmente llegando al núcleo registrado.

En general en la señal se pueden distinguir 4 componentes (en orden de aparición):

1) Artefacto de estimulación:

Es una deflexión de una amplitud muy grande comparada con la respuesta sináptica y es generada por la caja de estimulación. Representa el pulso cuadrado que se da con el electrodo. Aparece en el milisegundo 50 y 150, con una duración de 1ms y voltajes que sobrepasan los 1V. Debido a la polaridad utilizada durante los experimentos aparece como una respuesta negativa (**Figura 5.1**).

2) Salva Aferente:

También conocido como *Fiber Volley* en inglés. Esta señal se genera por la despolarización y subsecuente conducción axonal. Esta respuesta es insensible a los bloqueadores de receptores sinápticos BC, NBQX y AP-V. Aparece como una deflexión negativa entre el milisegundo 2-3 después del pulso y tiene una duración de aproximadamente 3 milisegundos para P_{Om} y 5ms para S1. Conforme se aumenta el voltaje de estimulación se va recorriendo hacia la izquierda (**Figura 5.2**). En S1 (**Figura 6B, sombreado verde**) y en P_{Om} (**Figura 10B, sombreado verde**). La salva aferente está comprendida entre los puntos FVP y FVE de la **Figura 4D**.

3) Respuesta sináptica excitatoria:

Es una deflexión negativa que aparece después de la salva aferente, en algunos casos puede traslaparse con esta. Esta señal es generada por la liberación de neurotransmisores de los axones estimulados, su acoplamiento a receptores glutamatérgicos y el disparo de potencial de acción en neuronas postsinápticas, cuando esto último sucede la respuesta también es conocida como *population (Pop) Spike* en inglés. Participa principalmente glutamato; los primeros receptores que se activan son los AMPA (señal rápida) y después los NMDA (señal lenta) por sus características intrínsecas. Esta señal es sensible al NBQX y AP-V. Aparece en el milisegundo 3-5 después del pulso. Igual que la salva aferente, se va recorriendo hacia la izquierda conforme aumenta la intensidad de estimulación y se reclutan más neuronas presinápticas. Tiene una duración de 5 a 20ms dependiendo si es *Pop Spike* o potencial postsináptico subumbral (**Figura 5.3a Exc; Figura 5.3b**). En S1 (**Figura 6B, sombreado azul**) y en POm (**Figura 10B, sombreado azul**).

4) Respuesta sináptica inhibitoria:

Esta señal es producida por la actividad de receptores GABA_A y se denota por una deflexión positiva. Se observa de forma pronunciada en S1, y en menor medida en POm. Esta señal es sensible a BC. Aparece inmediatamente después de la respuesta sináptica excitatoria (**Figura 5.3A**). En S1 (**Figura 6B, trazo morado**) y en POm (**Figura 10B, trazo morado**).

En algunas rebanadas se observa un componente más cuando la actividad axonal es muy pronunciada: la repolarización axonal. Se puede ver como un pico positivo inmediatamente después de la salva aferente (**Figura 5.4**).

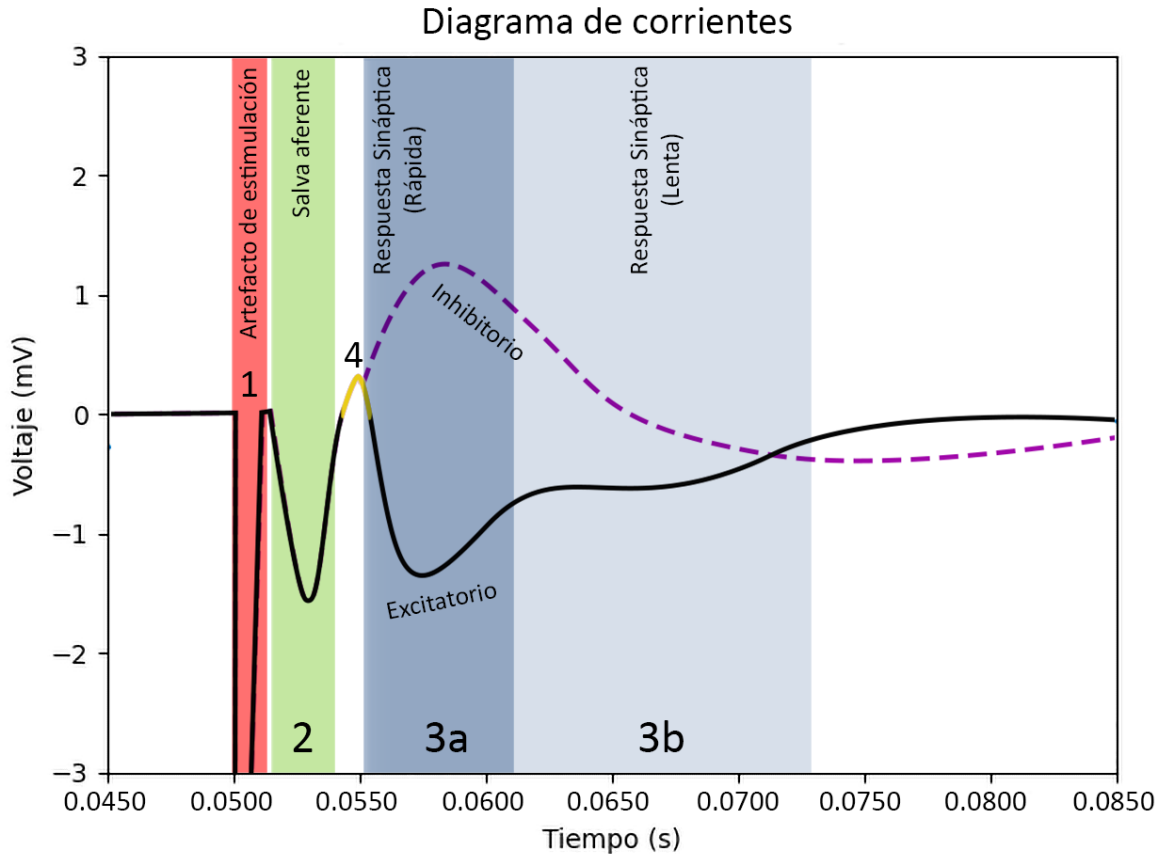


Figura 5: Diagrama de corrientes encontradas en LFP tras un pulso de estimulación.
1)[Rojo] Artefacto del estimulador, es un pulso cuadrado que dura 1ms, se presenta en el milisegundo 50 y 150, **2)[Verde]** Salva aferente (Fiber Volley) **3)[Azul]** Evento sináptico.
3a: Dinámica rápida **3b:** Dinámica lenta. **4)[Amarillo]** Repolarización Axonal

La respuesta sináptica poblacional en S1 es similar en ambos grupos

Al estimular en la capa II/III de la corteza S1, mientras se registra en la capa IV (**Figura 6A**) es posible observar la actividad sináptica *Pop Spike*, además de un gran componente inhibitorio inmediatamente después de la actividad sináptica excitatoria, como puede observarse en los trazos representativos en la **Figura 6B**, donde se ilustran los registros en las intensidades de estimulación de 20, 60 y 100V. Para evaluar diferencias a nivel pre y postsinápticos se aplicó un protocolo de pulso pareado. En negro para el grupo control (WT) y en rojo para el grupo Shank3 KO. Ya que en la respuesta cortical se encuentran embebidas las deflexiones producidas

no solamente por la actividad sináptica y axonal, sino también por actividad somática y otros componentes del microcircuito cortical, la medición de la pendiente del evento sináptico es proporcional a la cantidad de neuronas postsinápticas reclutadas por la estimulación (Ferguson & Huguenard, 2022). La curva intensidad-respuesta muestra diferencias significativas en la pendiente del *Pop Spike* del primer pulso (FRST) para la intensidad de estimulación de 10V (**Figura 6C**), donde Shank3 fue hiporresponsivo (pendiente media WT 0.2749 ± 0.068 mV/ms, pendiente media Shank3 KO 0.1056 ± 0.0219 mV/ms, U Mann-Whitney $p=0.0487$ y $U=11$). Si se ajusta una curva exponencial sobre las medias de ambos grupos (**Figura 14, superior, línea continua**) se puede observar un cambio más pronunciado en las tendencias, donde Shank3 continúa incrementando la pendiente a mayor intensidad, casi de una forma lineal, mientras que el grupo control llega a un *plateau* de saturación, indicando una mayor respuesta en el grupo KO. Al cuantificar la pendiente, pero ahora en la respuesta al segundo pulso (SCND) (**Figura 6D**) la dinámica se ve muy parecida entre ambos grupos, no hay diferencias significativas. Lo que sugiere que no existen cambios a nivel presináptico. La medición de las pendientes sinápticas del *Pop Spike* del primer y segundo pulso muestran dinámicas parecidas a las encontradas en las amplitudes (**Figura 14, superior**).

Ya que el protocolo de pulso pareado induce procesos de plasticidad (Mo & Sherman, 2019) se utilizó la medición de las amplitudes de la respuesta sináptica *Pop Spike*, específicamente la proporción entre la amplitud máxima de deflexión entre el segundo pulso y el primero, lo que se denomina en inglés '*Paired Pulse Ratio*' (PPR). Un PPR por arriba de 1 estaría hablando de un proceso de facilitación ya que aumenta la amplitud de la respuesta sináptica en el segundo pulso y es común en sinapsis con baja probabilidad de liberación; al contrario, si es por debajo de 1 estaría deprimiéndose la sinapsis e indica una alta probabilidad de liberación. En condiciones basales (**Figura 6E**), a intensidades bajas tanto Shank3 como WT tienden a potenciarse, en amplitudes elevadas, se deprimen. No hubo diferencia significativa entre grupos para ninguna de las intensidades. Lo anterior sugiere que probablemente la respuesta esté compensada a nivel circuito, a pesar que se observa hiperexcitabilidad a nivel celular como fue descrito por Chen et al., (2020).

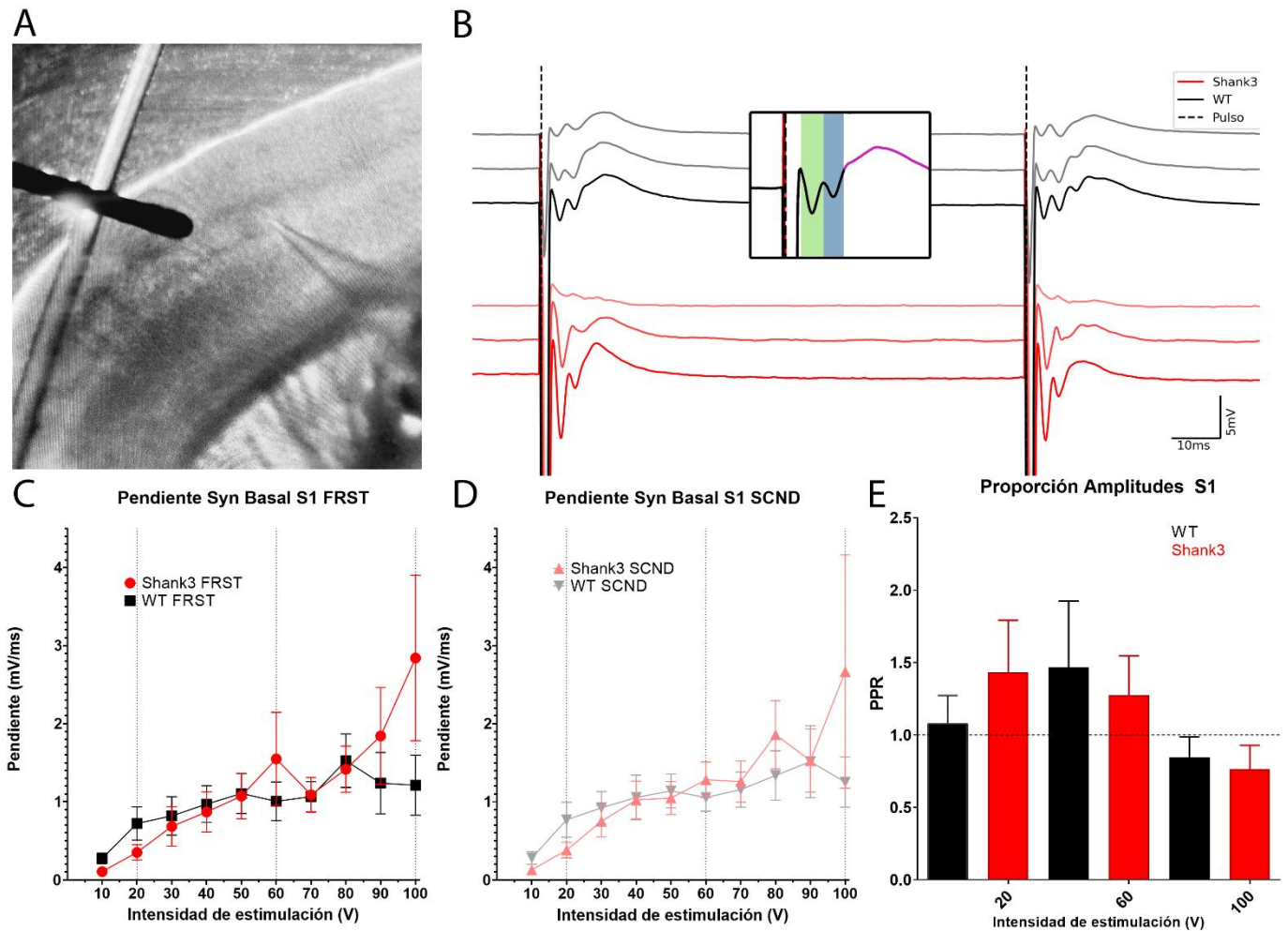


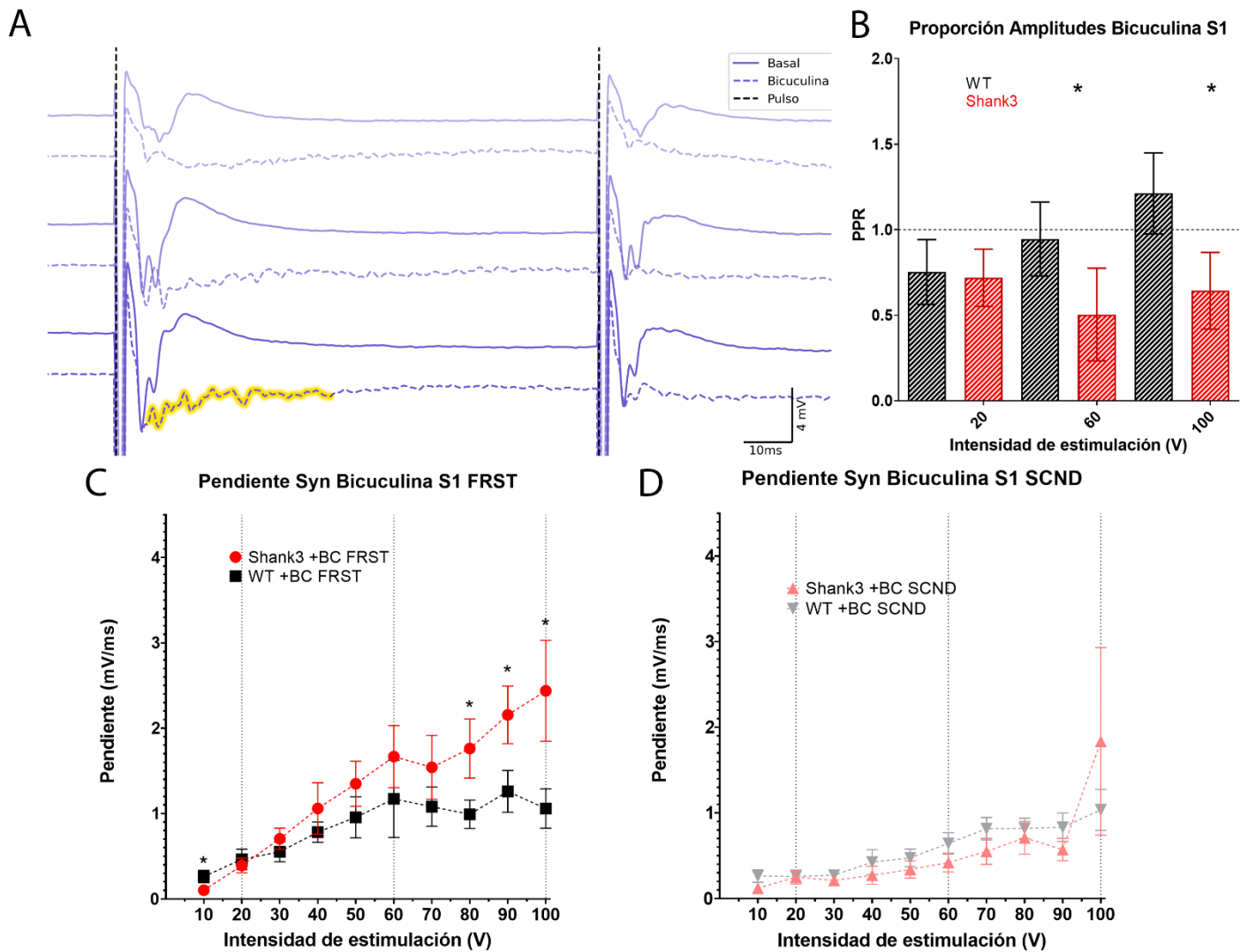
Figura 6: Medición de pendientes sinápticas en S1, condición basal.

A) Fotografía representativa donde se ilustra el acomodo de la micropipeta de registro colocada en capa IV y electrodo de estimulación colocado en capa II/III. **B)** Trazos representativos de la respuesta de S1 a la estimulación eléctrica con 3 diferentes intensidades de estimulación (20,60 y 100V) para ambos grupos. **Zoom:** Salva aferente (sombreado verde), evento sináptico excitatorio (sombreado azul), evento sináptico inhibitorio (trazo morado). **C)** Medición de pendiente del Pop Spike del primer pulso, condición basal. Diferencia significativa en intensidad 10 (milivolts/milisegundo). **D)** Medición de pendiente del Pop Spike del segundo pulso, condición basal. Sin diferencias significativas (milivolts/milisegundo). **E)** Proporción entre amplitudes del Pop Spike segundo/primer pulso en condición basal para las intensidades 20, 60 y 100V, sin diferencias significativas. (Paired Pulse Ratio, PPR). **Simbología:** [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. U Mann-Whitney]. Control (WT) en negro, Shank3 en rojo. Se grafican la media \pm error estándar.

La inhibición cortical se encuentra alterada en el modelo de autismo Shank3b KO

Para conocer la contribución GABAérgica a los circuitos corticales en S1 se realizó la curva Amplitud-Respuesta en presencia de bicuculina [10 μ M] (**Métodos**). En la **Figura 7A** se pueden observar trazos representativos de S1 en la condición basal (línea continua) versus la condición bicuculina (línea discontinua) en las intensidades de estimulación de 20, 60 y 100V. En la presencia de bicuculina se suprime el componente inhibitorio que aparecía después de la actividad sináptica excitatoria, además que esta última incrementa en amplitud; en algunos casos la actividad tiene una morfología epileptiforme, la cual se caracteriza por una oscilación rápida y sostenida provocada por la retroalimentación positiva entre las redes y capas corticales al perder inhibición (**Figura 7A, sombreado amarillo**) (Vanleer et al., 2016). En presencia de bicuculina, la pendiente del primer pulso es significativamente mayor en el grupo Shank3 KO en comparación al grupo WT a partir de la intensidad de estimulación 80V (pendiente media WT [80V] 0.9915 ± 0.1675 mV/ms, pendiente media Shank3 KO [80V] 1.7613 ± 0.3469 mV/ms, U Mann-Whitney $p=0.0364$ y $U=10$; pendiente media WT [90V] 1.2599 ± 0.2453 mV/ms, pendiente media Shank3 KO [90V] 2.1559 ± 0.3377 mV/ms, U Mann-Whitney $p=0.0364$ y $U=10$; pendiente media WT [100V] 1.0577 ± 0.2305 mV/ms, pendiente media Shank3 KO [100V] 2.4375 ± 0.5906 mV/ms, U Mann-Whitney $p=0.0131$ y $U=7$) (**Figura 7C**). En contraste, en la intensidad de estimulación de 10V la pendiente fue significativamente menor en el grupo Shank3 comparado con el control (pendiente media WT: 0.2616 ± 0.0738 mV/ms, pendiente media Shank3 KO: 0.1020 ± 0.0325 UA, U Mann-Whitney $p=0.0487$ y $U=11$). La pendiente de la respuesta del segundo pulso (**Figura 7D**) se encuentra reducida para ambos grupos, Shank tiende a una reducción mayor para casi todas las intensidades de estimulación, exceptuando en la 100V, donde la pendiente es mayor que el grupo control. Al tomar las amplitudes de la respuesta sináptica y evaluar el PPR (**Figura 7B**) podemos observar que en presencia de bicuculina el grupo Shank3 tiende hacia la depresión de corto plazo, mientras que el grupo control hacia la potenciación. Las tendencias que siguen las pendientes del primer y segundo pulso en presencia del bloqueador de receptores GABA_A se pueden apreciar mejor al ajustar una curva

exponencial (**Figura 8A**). La pendiente del primer pulso en el grupo Shank3 KO se aleja de forma acentuada con respecto al grupo WT; la pendiente en el segundo pulso se deprime prácticamente al mismo nivel entre ambos grupos. Se puede observar la comparación de amplitudes entre las condiciones basal y bicuculina para el primer pulso y ambos grupos en la **Figura 14, superior, línea punteada**; donde se aprecia que el grupo Shank3 tiende hacia mayores amplitudes del sináptico, es decir, hay hiperexcitabilidad. Estos resultados sugieren una mayor inhibición en el grupo KO comparado a los ratones control, pero la excitación basal está incrementada lo cual produce un 'enmascaramiento' de la respuesta inicial.



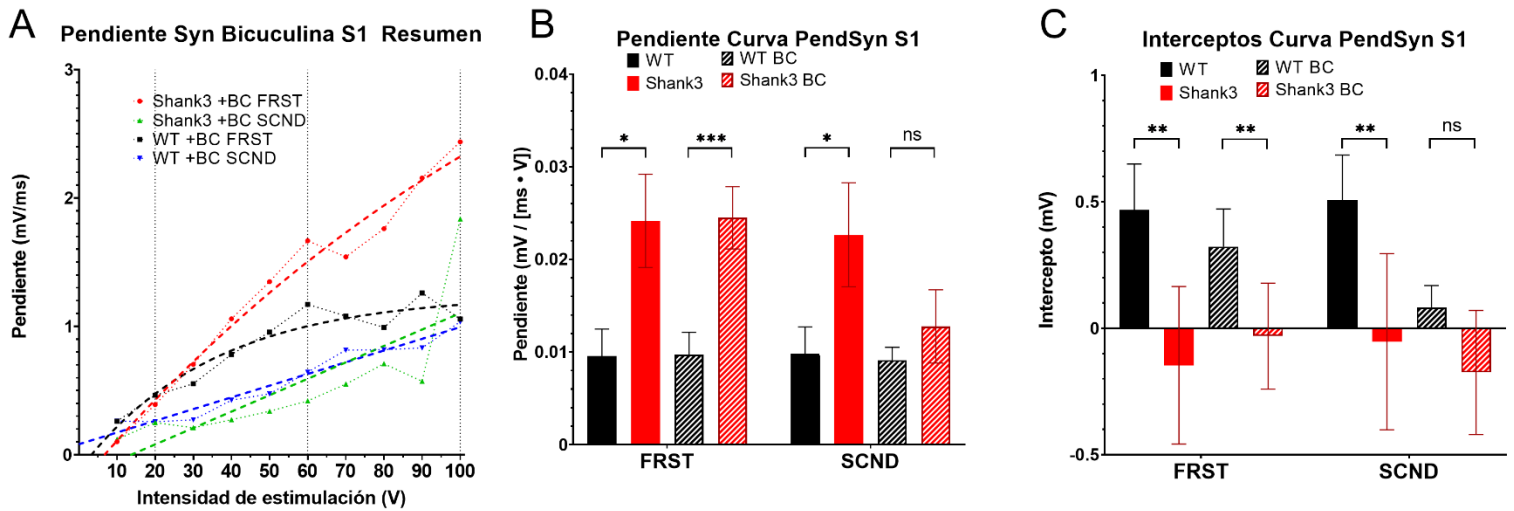


Figura 8: Ajustes y características de la pendiente en S1.

A) Figura resumen para las pendientes del primer y segundo pulso en condición bicuculina para ambos grupos (milivolts/miliseundos). **B)** Medición de las pendientes de la recta para el ajuste lineal sobre la curva de pendientes sinápticas en S1 (milivolts{registro} / [miliseundos • volts{estímulo}]). **C)** Medición del intercepto Y del ajuste lineal (milivolts). **Simbología:** [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Test de Fisher para regresión lineal] Control (WT) en negro, Shank3 en rojo. Condición basal: Barras de color sólido. Condición Bicuculina: Barras ralladas. Se grafican la media \pm desviación estándar.

Las pendientes de la curva de actividad en S1 son significativamente diferentes entre grupos

Siguiendo el método de análisis reportado en Banerjee y colaboradores (2013) donde analizan las tendencias de la actividad, lo siguiente que se hizo fue realizar ajustes lineales a las curvas intensidad-respuesta generadas en las **Figura 6C,D y Figura 7C,D (Figura Suplementaria 2)** para obtener la pendiente de dichas curvas, por cada uno de los experimentos. Los resultados se aprecian en la **Figura 8B**, donde las pendientes de la recta ajustada a las distintas intensidades para el primer y segundo pulso en condición basal (barras sólidas) son significativamente diferentes entre ambos grupos, siendo Shank3 la mayor (pendiente WT FRST 0.00956 ± 0.00292 mV/[ms·V], pendiente Shank3 KO FRST 0.0241 ± 0.005024

mV/[ms•V], Test de Fisher para regresión lineal $p=0.0132$ $F=6.313$; pendiente WT SCND 0.00984 ± 0.00286 mV/[ms•V], pendiente Shank3 KO SCND 0.0226 ± 0.00561 mV/[ms•V] Test de Fisher para regresión lineal $p=0.0442$ $F=4.124$). Durante la condición bicuculina (barras rayadas) la dinámica del primer y segundo pulso cambia: durante el primer pulso la pendiente de la actividad sigue siendo significativamente mayor en Shank3, aunque ambos grupos se comportan de una forma muy similar a lo visto en la condición basal (pendiente WT BC FRST 0.00972 ± 0.00240 mV/[ms•V], pendiente Shank3 KO BC FRST 0.0245 ± 0.00337 mV/[ms•V] Test de Fisher para regresión lineal $p=0.0005$ $F=12.71$). En cambio, durante el segundo pulso de la condición BC, la pendiente generada por la actividad de Shank3 se reduce llegando casi a los niveles encontrados en el grupo WT, ahora las diferencias entre ambos grupos no son significativas (pendiente WT BC SCND 0.00912 ± 0.00139 mV/[ms•V], pendiente Shank3 KO BC SCND 0.0127 ± 0.00395 mV/[ms•V] Test de Fisher para regresión lineal $p=0.3842$ $F=0.7621$).

Otra medición sobre estos ajustes es el intercepto Y (**Figura 8C**), el cual refleja las condiciones iniciales de la respuesta, a modo que un intercepto Y mayor indica que la actividad tiene un inicio mayor, es decir, más actividad a intensidades de estimulación bajas; mientras que un intercepto Y menor reflejaría que la actividad inicial es menor a intensidades de estimulación bajas. También se puede interpretar como el desplazamiento en X del ajuste lineal, donde el intercepto Y mayor habla de una curva desplazada hacia la izquierda y un intercepto Y menor es una curva desplazada hacia la derecha. Lo primero que resalta a la vista es que la media de los interceptos para el grupo WT es positivo, mientras que para el grupo Shank3 es negativo. Al igual que en la pendiente de la curva de actividad, las diferencias entre grupos son significativas para la condición basal, ambos pulsos, y para la condición BC solamente durante el primer pulso. Estos resultados sugieren que hay un cambio en la integración de la respuesta según la intensidad del estímulo, reflejado en el cambio en la tendencia de la curva en cada uno de los pulsos.

El área bajo la curva muestra cambios en la inhibición cortical entre grupos

La medición del área bajo la curva (AUC) que se genera entre la resta de la señal durante la condición BC – Basal muestra la contribución del componente inhibitorio a la respuesta sináptica (**Métodos**), en la **Figura 9A** se muestran las AUC durante el primer pulso: a intensidades de estimulación bajas la contribución inhibitoria sobre Shank3 es menor que en el grupo WT, pero a partir de la intensidad 40V ésta aumenta de manera pronunciada y se mantiene elevada durante las demás intensidades, aunque solamente tuvo significancia estadística en la intensidad 70V. Esta dinámica no se replica durante el segundo pulso (**Figura 9B**), aquí el componente inhibitorio se vuelve prácticamente igual entre ambos grupos, es decir, la inhibición no tuvo mucha contribución. Para visualizar mejor el comportamiento generalizado de las curvas se hizo un ajuste cuadrático sobre ambas (**Figura 9C**), aquí es más claro el efecto que durante el segundo pulso existe algún grado de inhibición basal ya que la curva inicia con un área elevada comparada contra la misma intensidad durante el primer pulso, esto sucede en ambos grupos. La curva que se separa más de las otras tres es para el primer pulso del grupo Shank3. Esto sugiere que existe una mayor contribución inhibitoria presentada después de la actividad excitatoria. En conjunto, estos resultados apoyan que existe un desbalance excitación-inhibición en los ratones KO. Con toda la evidencia recolectada hasta este punto podemos observar el comportamiento cortical en el modelo Shank3 KO y cómo la actividad tanto excitatoria como inhibitoria está incrementada, esto pudiera estar explicando el por qué hay déficits somatosensoriales en el procesamiento de la información; un incremento en la excitación pudiera ser lo que evoca una compensación inhibitoria plástica; o el caso contrario, que un incremento en la inhibición esté reclutando un número mayor de sinapsis, lo cual se explorará con mayor profundidad en la discusión, a continuación se encuentran los resultados encontrados en el núcleo POM.

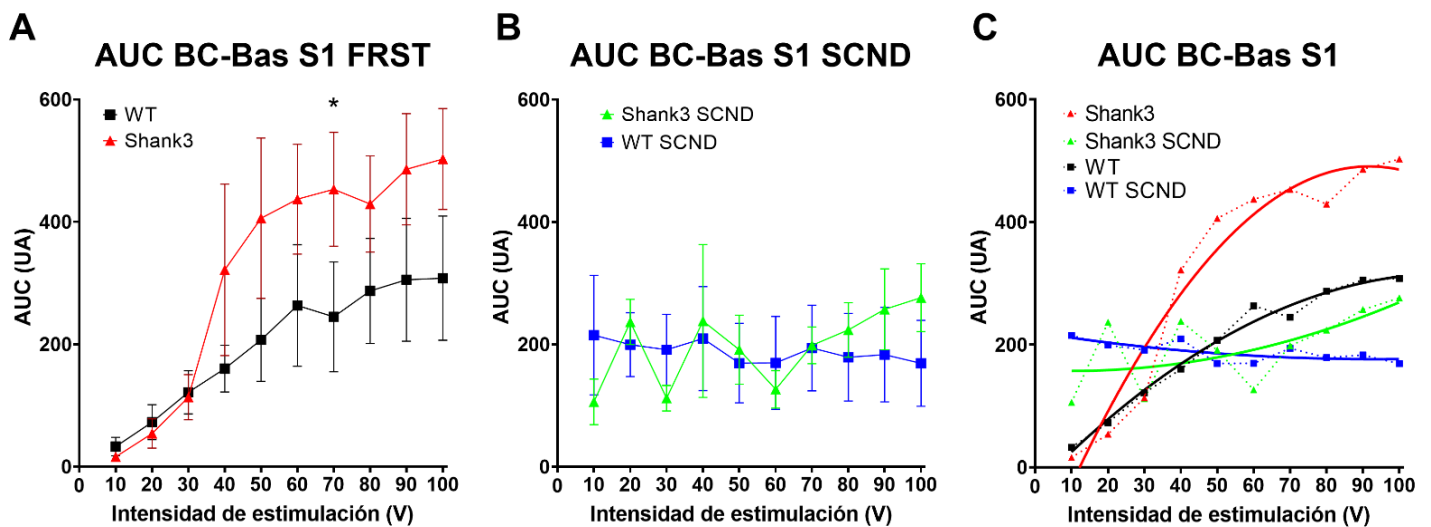


Figura 9: Área bajo la curva (AUC) de S1.

A) AUC para el primer pulso. Control (WT) en negro, Shank3 en rojo (Unidades Arbitrarias, UA). **B)** AUC para el segundo pulso. Control (WT) en azul, Shank3 en verde (Unidades Arbitrarias, UA). **C)** Ajustes cuadráticos sobre las curvas de AUC (Unidades Arbitrarias, UA). **Simbología:** [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. U Mann-Whitney] Se grafican la media \pm error estándar.

POM tiende a hiperactividad en Shank3

Para evocar respuestas en POM el electrodo de estimulación fue colocado en cápsula interna, donde pasan las fibras corticales que llegan a los diferentes núcleos talámicos (**Figura 10A**). El trazo característico para POM durante la condición basal (**Figura 10B**) muestra que la actividad sináptica tiene una amplitud de deflexión menor, comparada contra S1, la cual ronda alrededor de 1.5mV. Tampoco se observa ningún componente inhibitorio prominente, pero se presenta una segunda respuesta sináptica lenta después del *Pop Spike*, tanto en WT como en Shank3 KO. Las curvas amplitud-respuesta que se generan al cuantificar la pendiente de la respuesta sináptica *Pop Spike* (**Figura 10**) tienen tendencias más diferenciadas entre WT y Shank3 KO, donde el último tiende hacia mayores pendientes tanto en el primer pulso (**Figura 10C**) como en el segundo (**Figura 10D**),

aunque en ninguno de los casos las diferencias entre grupos fueron significativas. El ajuste exponencial sobre las amplitudes para el primer pulso en ambos grupos muestra mejor la tendencia que sigue cada uno (**Figura 14, inferior línea continua**). Estos resultados sugieren que la actividad incrementada en POm puede originarse, ya sea por una entrada menor desde corteza, o por algún proceso modulador alterado desde NRT.

Al medir el PPR en condiciones basales para POm (**Figura 10E**) en las intensidades de estimulación de 20, 60 y 100V, podemos observar que a amplitudes bajas el grupo WT tiende hacia la facilitación de corto plazo y conforme aumenta la intensidad de estimulación la segunda respuesta se va deprimiendo. En el grupo Shank3 KO la dinámica tiene una tendencia inversa, a amplitudes bajas se deprime, conforme incrementa la intensidad de estimulación la sinapsis tiende a estabilizarse y no presenta mucha plasticidad ya que el valor de PPR se mantiene muy cercano a 1, en la intensidad 100 lo supera ligeramente (**Figura Suplementaria 1**). Se puede inferir que el cambio en la plasticidad únicamente actúa en estímulos pequeños, los mecanismos de integración pueden estar alterados en este punto; también pudiera deberse a que se pierde la capacidad plástica a intensidades mayores.

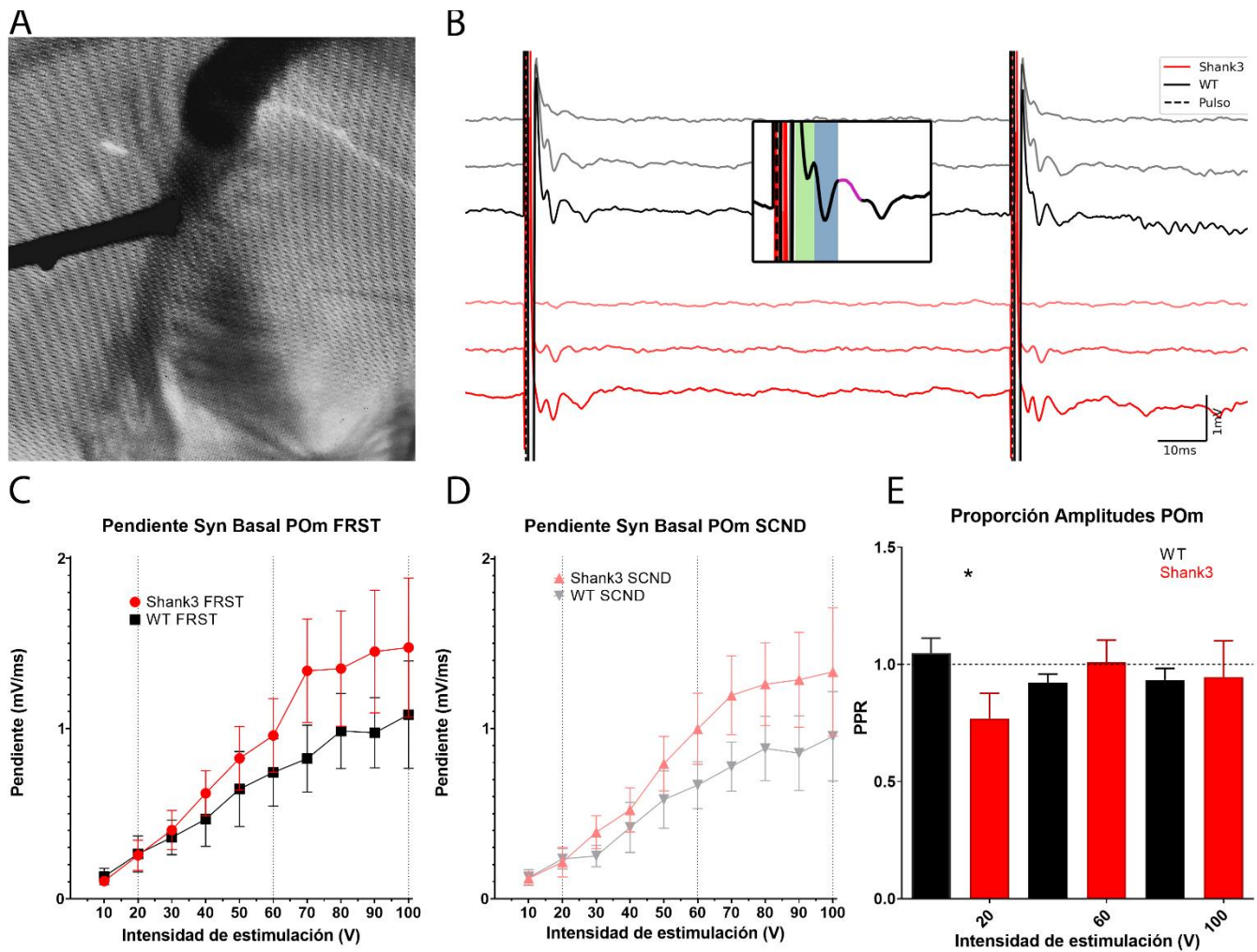


Figura 10: Medición de pendientes sinápticas en POM, condición basal.

A) Fotografía representativa donde se ilustra el acomodo de la micropipeta de registro colocada en POM y electrodo de estimulación colocado en Cápsula Interna (CI). **B)** Trazos representativos de la respuesta de POM a la estimulación eléctrica con 3 diferentes intensidades de estimulación (20,60 y 100V) para ambos grupos. **Zoom:** Salva aferente (sombreado verde), evento sináptico excitatorio (sombreado azul), evento sináptico inhibitorio (trazo morado). **C)** Medición de pendiente del Pop Spike del primer pulso, condición basal. Sin diferencias significativas (milivolts/milisegundo). **D)** Medición de pendiente del Pop Spike del segundo pulso, condición basal. Sin diferencias significativas (milivolts/milisegundo). **E)** Proporción entre amplitudes del Pop Spike segundo/primer pulso en condición basal para las intensidades 20, 60 y 100V (Paired Pulse Ratio, PPR)

Simbología: [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. U Mann-Whitney] Control (WT) en negro, Shank3 en rojo. Se grafican la media \pm error estándar.

Contribución de la inhibición en POm

Para determinar cuál es la contribución inhibitoria hacia POm lo siguiente que se hizo fue añadir bicuculina -antagonista competitivo GABA_A, suprime la señal inhibitoria- al baño de la rebanada. Como se puede observar en la **Figura 11A** la actividad en POm antes y después de añadir bicuculina, la actividad conserva la mayor parte de su morfología; no hay componentes inhibitorios mayores que desaparezcan en su presencia. La medición de la pendiente del evento sináptico *Pop Spike* durante el primer pulso (**Figura 11C**) muestra que en el grupo WT la pendiente es mayor a amplitudes bajas (10-40 V), comparadas a las del grupo Shank3 KO, un efecto que no se observaba en condiciones basales. En esta misma condición, Shank3 KO parece no variar mucho con respecto a las condiciones basales, lo cual estaría hablando de una contribución inhibitoria disminuida hacia POm en Shank3 KO en intensidades de estimulación bajas. A intensidades altas (>50V) las pendientes medidas en el grupo Shank3 KO vuelven a superar en magnitud al grupo WT, mientras que el segundo llega a un *plateau*. El efecto se observa mejor al ajustar una curva exponencial (**Figura 12A, líneas rojo y negro**).

La forma de la curva en las pendientes durante el segundo pulso (**Figura 11D**) no cambian mucho con respecto al primero, pero en ambos grupos se ve una tendencia a la baja, reflejada mejor al ajustar una exponencial (**Figura 12A, líneas verde y azul**). En las curvas de las pendientes ningún dato fue significativamente diferente entre cada grupo.

Durante la medición de PPR entre las amplitudes del primer y segundo pulso en POm en la condición bicuculina, medido para las intensidades de estimulación de 20, 60 y 100V (**Figura 11B**) se puede apreciar que el grupo WT tiene un cambio ligeramente a la baja conforme aumenta la intensidad de estimulación; en el caso de Shank3 KO a intensidades bajas hay depresión sináptica; en la intensidad de 60V hay facilitación significativamente diferente a el grupo WT (proporción media WT [60V]: 0.917 ± 0.065 UA, pendiente media Shank3 KO [60V]: 1.117 ± 0.077 UA, U Mann-Whitney $p= 0.0189$ y $U=8$), coincide además con el punto de inflexión donde las pendientes de Shank3 KO supera a WT; y a intensidades altas vuelve a presentar depresión sináptica, mayor que WT pero sin ser significativo.

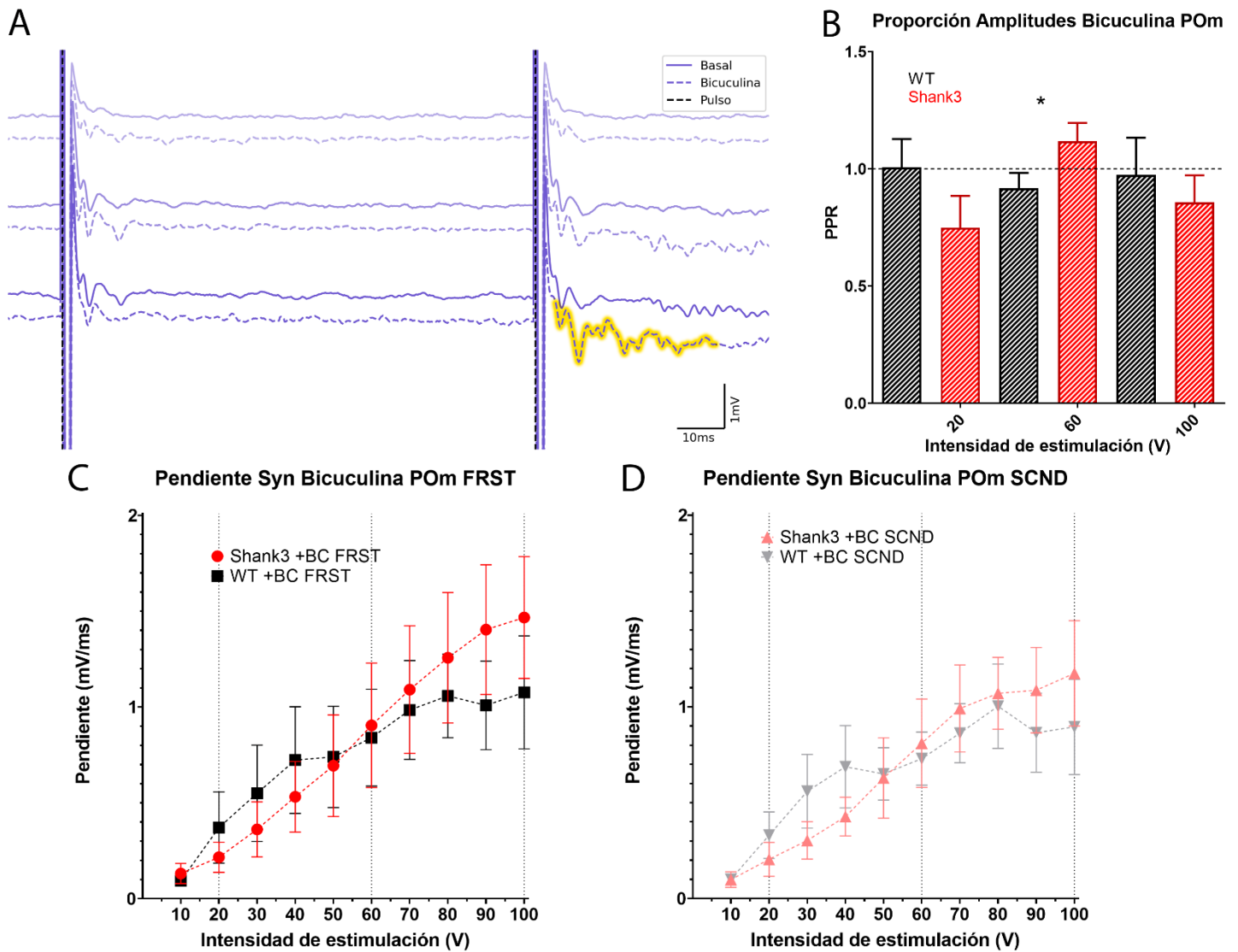


Figura 11: Medición de pendientes sinápticas en POM, condición bicuculina.

A) Trazos representativos para condición basal (línea continua) versus condición Bicuculina (BC, línea discontinua). Sombreado amarillo: Actividad epileptiforme. **B)** Proporción entre amplitudes del Pop Spike segundo/primer pulso en condición bicuculina para las intensidades 20, 60 y 100V (Paired Pulse Ratio, PPR). **C)** Medición de pendiente del Pop Spike del primer pulso, condición bicuculina (milivolts/milisegundo). **D)** Medición de pendiente del Pop Spike del segundo pulso, condición bicuculina (milivolts/milisegundo). **Simbología:** [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. U Mann-Whitney] Control (WT) en negro, Shank3 en rojo. Se grafican la media \pm error estándar.

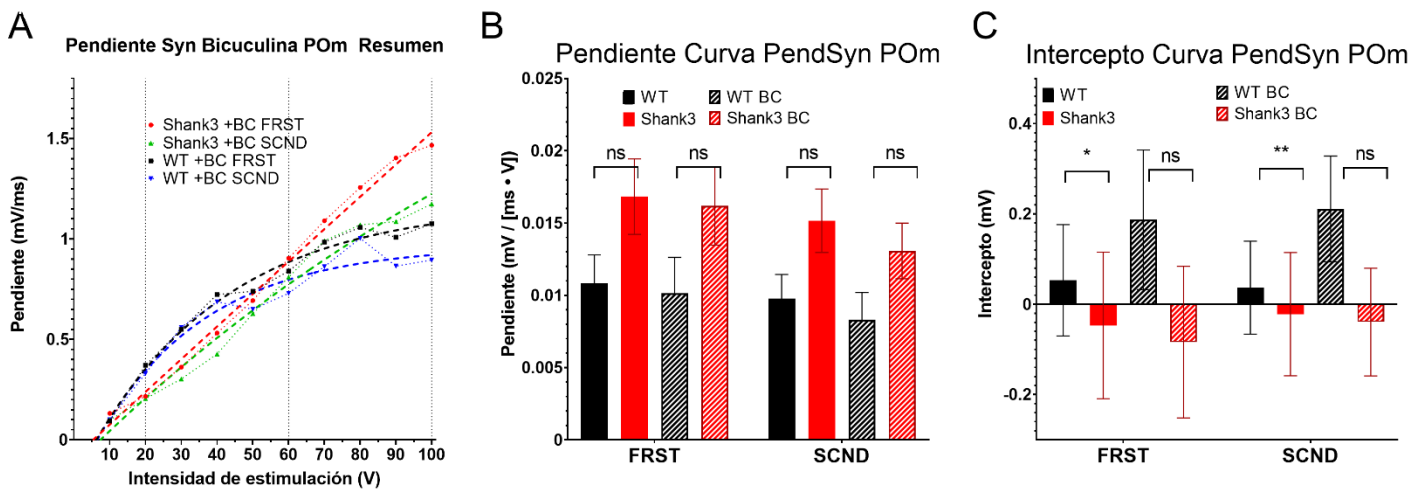


Figura 12: Ajustes y características de la pendiente en POM.

A) Figura resumen para las pendientes del primer y segundo pulso en condición bicuculina para ambos grupos (milivolts/milsegundo). **B)** Medición de las pendientes de la recta para el ajuste lineal sobre la curva de pendientes sinápticas en POM (milivolts{registro} / [milisegundos · volts{estímulo}]). **C)** Medición del intercepto Y del ajuste lineal (milivoltios). **Simbología:** [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Test de Fisher para regresión lineal] Control (WT) en negro, Shank3 en rojo. Condición basal: Barras de color sólido. Condición bicuculina: Barras ralladas. Se grafican la media \pm desviación estándar.

POM conserva tendencias durante las diferentes condiciones experimentales

Al igual que en S1, se realizaron ajustes lineales sobre las curvas de las pendientes sinápticas obtenidas en cada experimento (**Figura Suplementaria 3**), para verificar si el comportamiento de la actividad en POM es diferente entre grupos. En la **Figura 12B** se grafican las cuantificaciones de las pendientes obtenidas de cada uno de los ajustes lineales a las curvas intensidad-respuesta. En general ninguno de los valores obtenidos fue diferente entre grupos de una forma significativa; sin embargo, en la condición basal (Barras sólidas) podemos ver una fuerte tendencia entre ambos grupos, tanto en el primer como segundo pulso, ya que sus valores de p se encuentran apenas por encima de la significancia estadística ($p = 0.0687$ para el primer pulso, $p = 0.0532$ para el segundo). La media de

la pendiente es ligeramente menor para ambos grupos durante el segundo pulso. En la condición Bicuculina hay un fenómeno que contrasta con el visto en S1: durante el primer pulso la diferencia entre grupos es menor ($p=0.1029$) que durante el segundo pulso ($p=0.0796$), aquí la tendencia a mantenerse diferenciado entre grupos es mayor. Los datos obtenidos de los interceptos del ajuste lineal (**Figura 12C**) poseen diferencia significativa durante la condición basal, tanto para el primer como el segundo pulso (intercepto Y WT FRST 52.91 ± 123.3 UA, intercepto Y Shank3 KO FRST -0.04705 ± 0.1621 mV Test de Fisher para regresión lineal $p=0.0163$ $F=5.916$; intercepto Y WT SCND $0.036.69 \pm 0.103$ mV, intercepto Y Shank3 KO SCND -0.02195 ± 0.1364 mV Test de Fisher para regresión lineal $p=0.0036$ $F=8.784$), lo que nos indica que a pesar que la tasa con la que incrementa la respuesta no fue significativamente diferente, la curva de Shank3 está recorrida hacia la izquierda, a menores valores de intensidad de estimulación tiene una respuesta mayor comparado con el grupo WT (**Figura Suplementaria 3**). No hubo diferencias significativas para ninguno de los dos pulsos en condición BC. Un corrimiento de la curva hacia la izquierda (intercepto negativo) podría interpretarse como un cambio en la sensibilidad en el circuito.

Actividad en POm es mediada por inhibición dinámica

La medición del AUC para la respuesta de POm tiene una dinámica muy diferente para cada uno de los grupos; durante el primer pulso (**Figura 13A**) a amplitudes bajas ambos grupos siguen una tendencia creciente, en este caso Shank3 tiene un área menor que WT, es decir, la inhibición está contribuyendo menos. A partir de la intensidad de estimulación 60V ocurre un efecto diferenciado entre grupos: mientras que el área de Shank3 continúa creciendo y supera al grupo WT, el segundo cambia hacia una tendencia decreciente. De forma interesante, a esta misma intensidad es donde se observa también el cambio en la plasticidad durante la condición BC (**Figura 11B**). Durante el segundo pulso (**Figura 13B**) la dinámica del primero se conserva en el grupo WT. En contraste, el área a lo largo de las diferentes intensidades en Shank3 se aplana y se mantiene por debajo de WT en casi todo momento. Al hacer ajustes cuadráticos sobre estas mediciones

(Figura 13C) es mucho más claro el efecto descrito. La contribución inhibitoria en los ratones WT sigue un patrón parabólico, la inhibición es menor en los extremos y mayor en las intensidades centrales. Además, durante el segundo pulso la curva se recorre ligeramente hacia la derecha, lo que indica que es necesaria mayor estimulación para evocar la misma magnitud de componente inhibitorio. Los datos de la contribución inhibitoria presentada por Shank3 son marcadamente diferentes entre sí y entre los grupos. El primer pulso en Shank3 evoca una inhibición de forma cuasi lineal con respecto a la intensidad de estimulación. El segundo pulso solamente logra evocar una inhibición prácticamente constante y disminuida, durante todas las intensidades de estimulación, indicando una plasticidad a corto plazo alterada en el modelo de autismo. Estos resultados sugieren que POM posee una inhibición dinámica, la cual se pierde en el modelo Shank3. Esto pudiera estar repercutiendo en cómo es reclutada la sinapsis a diferentes estímulos y los efectos que pudiera tener sobre la integración de la información en este núcleo de alto orden.

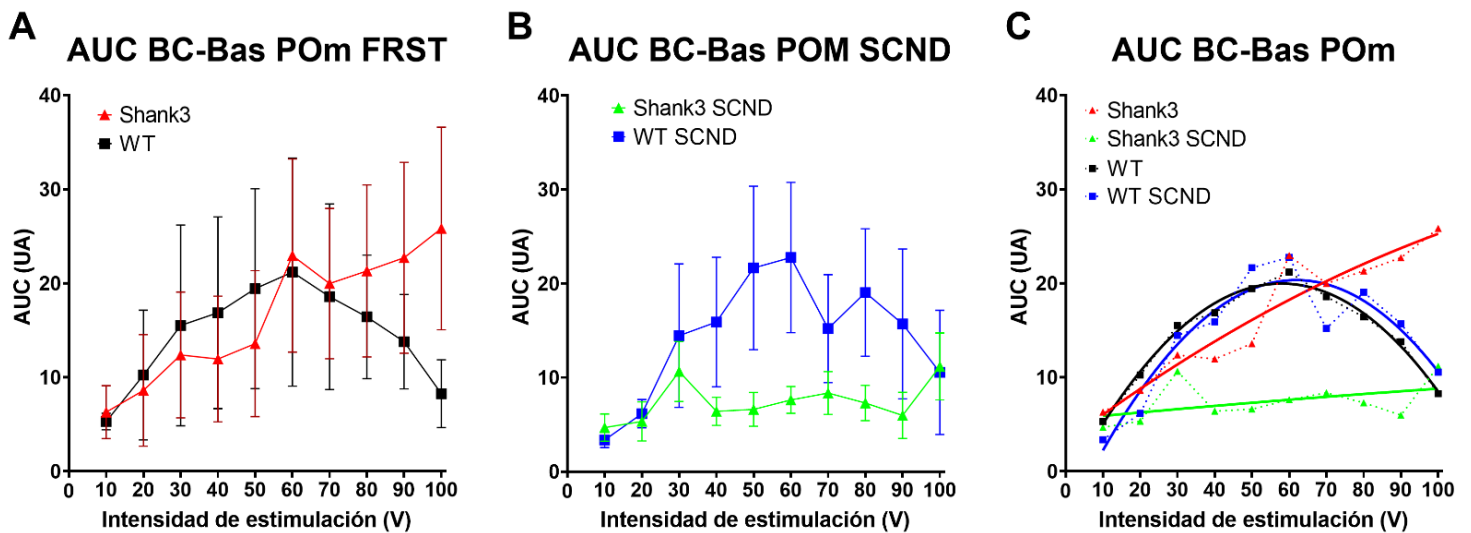
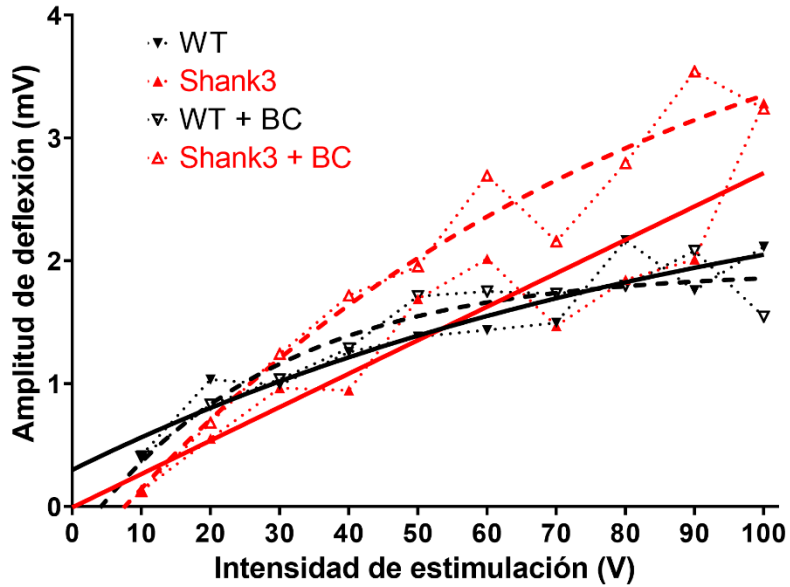


Figura 13: Área bajo la curva (AUC) de POM.

A) AUC para el primer pulso. Control (WT) en negro, Shank3 en rojo. **B)** AUC para el segundo pulso. Control (WT) en azul, Shank3 en verde. **C)** Ajustes cuadráticos sobre las curvas de AUC. **Simbología:** [*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. U Mann-Whitney] Se grafican la media \pm error estándar.

Amplitud Primer Pulso S1



Amplitud Primer Pulso POM

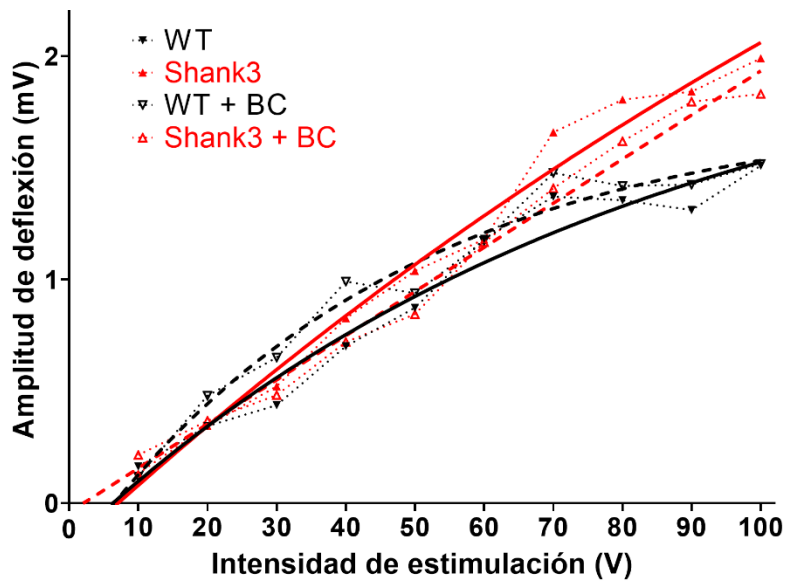


Figura 14: Amplitudes en el primer pulso

Superior: S1. Inferior: POM. Líneas Continuas: Ajuste exponencial en mediciones basales.

Líneas discontinuas: Ajuste exponencial en mediciones condición bicuculina.

Sección 4: Discusión

Los resultados mostraron que el modelo recapitula la tendencia hacia la hiperexcitabilidad en corteza (**Figura 6C y D; Figura 10C y D**) que ha sido reportada en los trastornos del espectro autista. De manera interesante encuentra diferencias en las alteraciones de conectividad sináptica dependiendo el área cerebral estudiada (S1 y POM), por ejemplo, se observan efectos opuestos en cuanto a la amplitud de la deflexión sináptica descrita en el núcleo estriado de este mismo modelo (Peça et al., 2011). Se revela también que hay una compensación y dinámica inhibitoria alterada en ambas estructuras, lo cual se comprobó con dos métodos diferentes: medición de la pendiente sináptica del *Pop Spike* en presencia del bloqueador GABAérgico bicuculina y cálculo del AUC para determinar el componente inhibitorio. Estos descubrimientos son novedosos en el modelo Shank3 para el núcleo POM y la capa IV de la corteza S1.

La actividad inhibitoria incrementada es congruente con lo descrito por Nelson y Valakh (2015) donde explican que una excitación incrementada no es la única variante de los efectos del TEA, hay evidencia que ha encontrado lo contrario (Filice et al., 2016, 2020; Marín, 2012). Así como los mecanismos compensatorios que otros grupos explican pudieran estar sucediendo en el caso de una actividad excitatoria exacerbada y en trastornos del neurodesarrollo, como lo es el TEA (Tatavarty et al., 2020; Turrigiano & Nelson, 2004).

La actividad cortical en Shank3

Las investigaciones sobre el modelo Shank3 KO reportaron que hay alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas, ya que esta proteína de andamiaje interactúa con los receptores NMDA y AMPA (Chiola et al., 2021; Monteiro & Feng, 2017; Rao & Finkbeiner, 2007; Uchino & Waga, 2013). Las corrientes mediadas por los receptores NMDA en modelo Shank3 están disminuidas (Lautz et al., 2021) , además, la sincronización y ritmos en la neocorteza se encuentran alterados (Ingiosi et al., 2019), lo cual pudiera explicar parte de la sintomatología central y disfunción cognitiva.

Trabajos previos demostraron que la actividad del núcleo somatosensorial de orden primario VPM, el cual proyecta hacia corteza S1, está disminuida (Mejía-Ortiz, 2022); ya que es posible que la información se transmita de forma alterada hacia la corteza, es lógico pensar que ésta también podría tener cambios, ya sea en su conectividad o en su respuesta, ambos directamente relacionados con el procesamiento que ocurre en esta área, sumado al hecho que Shank3 se encuentra altamente expresado en la corteza (Peça et al., 2011) y sus sinapsis glutamatérgicas también se ven afectadas al no expresar esta proteína. Durante este trabajo se encontró que la amplitud de la respuesta sináptica cortical S1 en capa IV en condiciones basales no tiene una alteración significativa en el grupo Shank3 KO (**Figura 14, superior, líneas continuas**), esto puede deberse al hecho que dentro de la amplitud de la respuesta en S1 puede haber contaminación por respuesta somática, esto es, los cambios eléctricos originados por la propia neurona presináptica en su soma y no por la actividad sináptica en la postsinapsis; la actividad compensatoria de otras isoformas de Shank, tal como Shank1 o Shank2; o por el mismo artefacto de estimulación y la cercanía de la pipeta de registro y el electrodo, por lo cual se optó por la medición de la pendiente de esta respuesta, que está directamente relacionada con la excitabilidad y la tasa de reclutamiento de las sinapsis y es una medida estándar reportada en varios artículos de investigación. Las pendientes, al igual que las amplitudes, parecen ser similares en ambos grupos (**Figura 6C y D**), así como su plasticidad a corto plazo (**Figura 6E**), lo que podría estar implicando que los mecanismos en condiciones basales están compensados. Sin embargo, al medir la tendencia que sigue esta curva, esto es, la pendiente del ajuste lineal (**Figura 8B, barras sólidas**), podemos darnos cuenta de que las tasas de cambio a través de las diferentes intensidades de estimulación son significativamente diferentes entre ambos grupos, al igual que sus interceptos (**Figura 8C**). Ya que las medias entre grupos son similares para cada uno de los pulsos, podemos interpretar entonces que el grupo Shank3 KO en condiciones basales es más excitable que el grupo WT; mismo resultado que se había reportado en un artículo anterior por Chen y compañía (2020).

Excitabilidad incrementada, ¿inhibición disminuida?

Estudios previos reportaron que los mecanismos inhibitorios están alterados en el modelo Shank3; varios artículos encontraron una disminución en la cantidad de interneuronas inhibitorias inmunorreactivas a Parvalbúmina (PV), las cuales proyectan principalmente hacia el soma de las neuronas piramidales en corteza, concluyendo que su pérdida era lo que reducía la inhibición y movía el balance E/I hacia la excitación (Gogolla et al., 2009; Staiger & Petersen, 2021). Sin embargo Filice y colaboradores (2016) demostraron que no era una pérdida celular, sino una reducción en la expresión de esta proteína al evaluar las redes perineuronales, sugiriendo que puede ser un mecanismo compensatorio, como lo describe Turrigiano y Nelson, (2004). La reducción de expresión de PV, una proteína de unión a calcio, aumenta la actividad de las interneuronas PV, lo cual se traduce a una inhibición somática incrementada, ya que las interneuronas PV de la capa IV proyectan principalmente hacia el soma neuronal (Filice et al., 2016). Las corrientes de calcio también son afectadas por los fallos en los canales NMDA provocados por la mutación en Shank3, hay grupos de investigación que han evaluado cómo esto impacta tanto a la sinapsis glutamatérgica como a las GABAérgicas mediadas por interneuronas, donde se ha encontrado que las corrientes transientes de calcio tipo L en las neuronas piramidales, se encuentran incrementadas. El calcio interactúa con CamKIIa; esta enzima participa en procesos de plasticidad y estabilización de uniones comunicantes y canales NMDA en las sinapsis (Perfitt et al., 2020). Estas transientes grandes de calcio están moduladas a nivel dendrítico por las interneuronas somatostatina positivas (SST); las neuronas SST proyectan de forma principal hacia las dendritas, y expresan canales NMDA, los cuales están adosados a la membrana al interactuar con la proteína Shank3 (Staiger & Petersen, 2021). Al fallar los canales NMDA en las interneuronas SST su activación es menor, por lo que la modulación de calcio a nivel dendrítico está alterada, provocando que las dendritas estén en un estado más excitable (Ali et al., 2021).

Estos descubrimientos previos se reflejan en los datos, al tener una tendencia a la hiperexcitabilidad y un mayor reclutamiento en las curvas Intensidad-Respuesta (**Figura 8B, barras sólidas FRST**), a pesar de que existe un componente inhibitorio

mayor en Shank3 comparado contra WT, observado en el AUC (**Figura 9A**). A través del bloqueo farmacológico GABA_A en la condición BC se revela que durante el primer pulso la pendiente de la actividad en Shank3 KO es significativamente mayor a intensidades grandes (**Figura 7C**), mientras que la amplitud de deflexión solamente sigue una tendencia creciente sin ser significativamente diferente (**Figura 14, superior, línea punteada roja**). En la actividad generada por Shank3 durante el segundo pulso en condiciones basales la actividad tiene una morfología similar al primer pulso y se mantiene una pendiente significativamente diferente a WT (**Figura 8B, barras sólidas, SCND**); en cambio el componente inhibitorio se ha reducido, su AUC se vuelve muy similar a aquella del WT (**Figura 9B**), pero los mecanismos de plasticidad se mantienen (**Figura 6E**), probablemente por la regulación inducida por las neuronas PV, que pudieran no tener una actividad inhibitoria suficiente durante el segundo pulso, debido a que su alta actividad durante el primero depletó la sinapsis (Dehorter et al., 2017). En contraste, en la condición BC, la actividad del segundo pulso disminuye de forma pronunciada (**Figura 8B, barras rayadas, SCND**), comparada con el primero; la curva se vuelve muy similar a WT (**Figura 7D**), esto puede ser debido a que el primer pulso con su alta actividad depletó la sinapsis, al no ser inhibido por la actividad de las neuronas PV (**Figura 9B**); la plasticidad en este caso se volvió depresora ya que la sinapsis tuvo una alta probabilidad de liberación (**Figura 7B**). Este efecto de excitación e inhibición incrementada, así como el cambio dinámico y plástico entre el primer y segundo pulso pueden ser explicados con literatura previa acerca de la población de neuronas inhibitorias en la corteza, específicamente, las interneuronas Somatostatina positivas (SST) y Parvalbúmina positivas (PV) (Filice et al., 2016; Gogolla et al., 2009).

Una perspectiva novedosa al microcircuito cortical alterado en S1 de Shank3

Parece ser entonces que la hiperexcitabilidad y facilidad de reclutamiento se puede deber a dendritas hiperexcitables por la pérdida de inhibición por las interneuronas SST, esto provoca un evento sináptico incrementado que recluta a las interneuronas PV, las cuales están facilitadas por la reducción de expresión de

esta proteína, lo cual genera un evento inhibitorio exacerbado, el cual probablemente está contribuyendo a mantener las características plásticas de la sinapsis, a modo compensatorio.

Estos descubrimientos nos indican que, de acuerdo con la literatura previa, existe un desbalance excitación-inhibición, pero no estrictamente en un solo sentido, sino en ambos: Las dendritas se vuelven hiperexcitables mientras que el soma se ve más inhibido por el microcircuito local. Este fenómeno pudiera estar explicando el fenotipo hiposensible descrito anteriormente (Mejía-Ortiz, 2022) debido a fallos en la integración cortical, donde la información no es procesada correctamente por este doble desbalance en la red, que a su vez puede estar asociada a una mala relación señal-ruido entre el estímulo y la actividad intrínseca de la red, por ejemplo, por los fallos en las corrientes NMDA y su desincronización y desacoplamiento, así como en los fallos en la ganancia de la señal por la hiperexcitabilidad y elevada inhibición (Lautz et al., 2021; Nelson & Valakh, 2015; Schultz, 2007; Turrigiano & Nelson, 2004).

La evidencia adicional que soporta estas conclusiones sugiere que esta inhibición está incrementada en la corteza S1, lo que podría explicar por qué en los pacientes con Síndrome Phelan-McDermid la incidencia de la epilepsia clínicamente significativa es menor, solamente ~26% de pacientes, y no es considerado como un criterio diagnóstico, aunque siguen existiendo alteraciones en el electroencefalograma (Phelan et al., 2005), comparado contra otras variantes de TEA monogénicos como el Síndrome de Rett donde el ~70% de pacientes tienen epilepsia y crisis convulsivas clínicamente significativas (Nelson & Valakh, 2015).

La integración talámica de orden superior

Debido a la escasa literatura que existe al respecto del núcleo POm en el modelo Shank3 es difícil extrapolar y contrastar mucha información. POm posee conexiones recíprocas con diferentes capas de la corteza S1, además de recibir una entrada directa desde la vía paralemniscal. Su rol hacia la corteza S1 es del tipo modulador y sus proyecciones hacia S2 son del tipo integrativo. Ya que, al igual que S1, tiene una alta tendencia a la actividad incrementada (**Figura 12B, barras**

sólidas), es posible pensar que la información que recibe desde S1 pudiera ser reducida, lo cual induce una plasticidad al alta en este núcleo. Otra evidencia que se generó en los datos es la aportación inhibitoria dinámica que posee P_{Om}, la cual proviene principalmente desde el núcleo reticular del tálamo (NRT) (Pinault, 2004). En condiciones basales, amplitudes bajas reclutan una inhibición creciente, mientras que amplitudes altas lo contrario; este efecto se pierde en Shank3 (**Figura 13A y B**). Esto podría estar reflejando un mecanismo integrativo alterado, aún se desconoce si NRT es el causante o es un subsecuente de esta inhibición alterada. Es interesante notar que durante el bloqueo con BC y en la medición de AUC hay un punto de inflexión entre WT y Shank3 a la amplitud 60V, esto podría estar hablando de diferentes mecanismos de respuesta según la cantidad de sinapsis reclutadas durante la estimulación, un mecanismo conocido de integración es la coincidencia temporal de sinapsis y al ser éste un núcleo de orden superior no es ilógico pensar que puede ser debido a esto (Buhusi et al., 2016). Los cambios entre las respuestas al primer y segundo pulso están menos diferenciadas en P_{Om}, parece que la sinapsis se mantiene estable a diferentes amplitudes (**Figura 10C, D y E**), mientras que al bloquear en la condición BC el efecto disminuye (**Figura 11C y D**) pero aparece el cambio dinámico en la plasticidad (**Figura 11B**). Este efecto se observa mejor en la medición de AUC (**Figura 13C**). Todo esto nos indica que hay un cambio importante en la integración de la información somatosensorial en el modelo Shank3, lo cual pudiera estar involucrado en la sintomatología reflejada del modelo. Sin embargo, es necesario profundizar la investigación al respecto, ya que la falta de antecedentes restringe estos datos a ser meramente descriptivos.

La hipótesis inicial de este trabajo de investigación era que se encontraría una amplitud de deflexión menor en las dos zonas estudiadas, pero los resultados muestran lo contrario en condiciones basales, apoyando las hipótesis de desbalance en la Excitación/Inhibición ponderado hacia la primera, pero una aportación novedosa es la descripción del componente inhibitorio alterado hacia la alta también, posiblemente por mecanismos compensatorios, pero con una temporalidad diferente: de forma inicial ambas estructuras son más excitables (S1)

o tienen una mayor facilidad de reclutamiento (POm) que podría sugerir hiperconectividad; después de la actividad sináptica inicial exacerbada hay un componente inhibitorio aumentado, que probablemente está participando en mantener un balance en la plasticidad, aunque todo el marco de referencia se haya desplazado hacia la excitación.

Este aumento ponderado hacia la excitación y fallos temporales en la inhibición se traducen en actividad neural incrementada en la red y un aumento en la activación de redes dispersas a través del cerebro; sin una coordinación y secuencia temporal apropiadas el ruido en la red neuronal pudiera estar aumentando y esto derivar en los fallos en el procesamiento de la información (Bruining et al., 2020; Chen et al., 2020; Schultz, 2007). Los datos obtenidos en este trabajo muestran cambios en la actividad inhibitoria, los cuales pueden estar interfiriendo con los ritmos tálamo-corticales, especialmente el ritmo gamma (30-90Hz), para el cual son indispensables las interneuronas inhibitorias y es altamente sensible al balance excitación-inhibición. El ritmo gamma está asociado con procesamiento de la información en redes locales (Buzsáki & Wang, 2012) y se ha observado que los pacientes con TEA presentan alteraciones en los ritmos gamma corticales en tareas sensoriales (Seymour et al., 2019; Simon & Wallace, 2016) y motoras (An et al., 2018), las cuales podrían explicarse en parte con estos hallazgos.

Perspectivas:

Los resultados mostrados en esta investigación pudieran complementarse aumentando la N experimental, ya que la heterogeneidad en las respuestas evocadas tras la estimulación eléctrica en las diferentes zonas registradas genera una alta varianza, lo cual se refleja en la carencia de significancia en varias de las comparaciones entre grupos experimentales, aunque sus medias muestren tendencias claras. Para la corteza S1 la alta complejidad intrínseca en sus circuitos debe ser explorada a más profundidad, ya que los patrones de excitación e inhibición son específicos a cada una de las capas, ya que los diferentes tipos de células e interneuronas juegan un rol diferencial; se puede explorar la respuesta

específica a cada capa y así esclarecer más cómo es el flujo de la información dentro de la corteza y cómo puede estar alterada en el modelo Shank3. Además, estas respuestas pueden a su vez ser disecadas en más de sus componentes utilizando otros fármacos, que afecten a las corrientes de potasio y calcio, o a otros receptores que pudieran estar involucrados en la modulación de la sinapsis y su plasticidad, como los dopaminérgicos, serotoninérgicos o de histamina ya que también hay evidencia que estos sistemas están alterados en TEA. Para el caso de POm, la literatura es escasa, es necesario hacer más experimentos descriptivos de la fisiología neuronal de este núcleo para comprender cómo puede estar participando de forma diferencial (si es que lo hace) al recibir información alterada desde la corteza. También es importante explorar el núcleo VPM, ya que es el responsable de llevar parte de la información a la corteza y pudiera también estar presentando cambios en su respuesta, un nodo de la red que también se encuentra alterado pudiera explicar parte de los efectos observados río abajo.

Referencias Bibliográficas:

- Adibi, M. (2019). Whisker-Mediated Touch System in Rodents : From Neuron to Behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 13(40), 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00040>
- Agmon, A., & Connors, B. W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, 41(2–3), 365–379.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90333-J](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90333-J)
- Alexander, G. E., DeLong, M. R., & Strick, P. L. (1986). Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 9(1), 357–381.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.09.030186.002041>
- Ali, F., Shao, L. X., Gerhard, D. M., Sweasy, K., Pothula, S., Pittenger, C., Duman, R. S., & Kwan, A. C. (2021). Inhibitory regulation of calcium transients in prefrontal dendritic spines is compromised by a nonsense Shank3 mutation. *Molecular Psychiatry*, 26(6), 1945–1966. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0708-6>
- American Psychiatric Organization. (2013). Neurodevelopmental disorders. In *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM)* (5th ed.).
- An, K. M., Ikeda, T., Yoshimura, Y., Hasegawa, C., Saito, D. N., Kumazaki, H., Hirosawa, T., Minabe, Y., & Kikuchi, M. (2018). Altered Gamma oscillations during motor control in children with Autism spectrum disorder. *Journal of Neuroscience*, 38(36), 7878–7886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1229-18.2018>
- Ayub, R., Sun, K. L., Flores, R. E., Lam, V. T., Jo, B., Sagar, M., & Fung, L. K. (2021). Thalamocortical connectivity is associated with autism symptoms in high-functioning adults with autism and typically developing adults. *Translational Psychiatry*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01221-0>
- 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), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.01016>

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.

<https://doi.org/10.1017/S1461145712001216>

Beacher, F. D. C. C., Radulescu, E., Minati, L., Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Lai, M. C., Walker, A., Howard, D., Gray, M. A., Harrison, N. A., & Critchley, H. D. (2012). Sex differences and Autism: Brain function during verbal fluency and mental rotation. *PLoS ONE*, *7*(6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038355>

Berkel, S., Marshall, C. R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., Bonin, M., Riess, A., Engels, H., Sprengel, R., Scherer, S. W., & Rappold, G. A. (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature Genetics*, *42*(6), 489–491. <https://doi.org/10.1038/ng.589>

Betancur, C., & Buxbaum, J. D. (2013). SHANK3 haploinsufficiency: a “common” but underdiagnosed highly penetrant monogenic cause of autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, *4*:17, 4–6. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-17>

Braden, B. B., Smith, C. J., Thompson, A., Glaspy, T. K., Wood, E., Vatsa, D., Abbott, A. E., McGee, S. C., & Baxter, L. C. (2017). Executive function and functional and structural brain differences in middle-age adults with autism spectrum disorder. *Autism Research*, *10*(12), 1945–1959.

<https://doi.org/10.1002/aur.1842>

Brandt, N., & Rune, G. M. (2020). Sex-dependency of oestrogen-induced structural synaptic plasticity: Inhibition of aromatase versus application of estradiol in rodents. *European Journal of Neuroscience*, *52*(1), 2548–2559.

<https://doi.org/10.1111/ejn.14541>

Briggs, F., & Usrey, W. M. (2008). Emerging views of corticothalamic function. *Current Opinion in Neurobiology*, *18*(4), 403–407.

<https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.002>

- Brugha, T., Cooper, S., & Gullon-Scott, F. J. (2014). *Autism spectrum disorder. Adult psychiatric morbidity survey*. NHS Digital.
- Bruining, H., Hardstone, R., Juarez-Martinez, E. L., Sprengers, J., Avramiea, A. E., Simpraga, S., Houtman, S. J., Poil, S. S., Dallares, E., Palva, S., Oranje, B., Matias Palva, J., Mansvelder, H. D., & Linkenkaer-Hansen, K. (2020). Measurement of excitation-inhibition ratio in autism spectrum disorder using critical brain dynamics. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65500-4>
- Buhusi, C. V., Oprisan, S. A., & Buhusi, M. (2016). Clocks within clocks: Timing by coincidence detection. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *8*, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.02.024>
- Bureau, I., Saint, F. Von, & Svoboda, K. (2006). Interdigitated Paralemniscal and Lemniscal Pathways in the Mouse Barrel Cortex. *PLoS Biology*, *4*(12), e382. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040382>
- Buzsáki, G., & Wang, X.-J. (2012). Mechanisms of Gamma Oscillations. *Annual Review of Neuroscience*, *35*(1), 203–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>
- Chen, Q., Deister, C. A., Gao, X., Guo, B., Lynn-Jones, T., Chen, N., Wells, M. F., Liu, R., Goard, M. J., Dimidschstein, J., Feng, S., Shi, Y., Liao, W., Lu, Z., Fishell, G., Moore, C. I., & 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. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0598-6>
- Chiola, S., Napan, K. L., Wang, Y., Lazarenko, R. M., Armstrong, C. J., Cui, J., & Shcheglovitov, A. (2021). Defective AMPA-mediated synaptic transmission and morphology in human neurons with hemizygous SHANK3 deletion engrafted in mouse prefrontal cortex. *Molecular Psychiatry*, *26*(9), 4670–4686. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01023-2>
- Chomiak, T., Karnik, V., Block, E., & Hu, B. (2010). Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features

- of autism. *BMC Neuroscience*, 11(102). <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-102>
- Compart, P. J. (2013). The Pathophysiology of Autism. *Global Advances in Health and Medicine*, 2(6), 32–37. <https://doi.org/10.7453/gahmj.2013.092>
- Courchesne, E., Pierce, K., Schumann, C. M., Redcay, E., Buckwalter, J. A., Kennedy, D. P., & Morgan, J. (2007). Mapping early brain development in autism. *Neuron*, 56(2), 399–413. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.016>
- Crandall, S. R., Cruikshank, S. J., & Connors, B. W. (2015). A Corticothalamic Switch: Controlling the Thalamus with Dynamic Synapses. In *Neuron* (Vol. 86, Issue 3, pp. 768–782). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.040>
- Crawley, J. N. (2022). Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14:3, 293–305. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2012.14.3/jcrawley>
- CSH. (2006). *Ketamine/Xylazine*. Cold Spring Harbor Protocols.
- de Magistris, L., Picardi, A., Sapone, A., Cariello, R., Siniscalco, D., Bravaccio, C., & Pascotto, A. (2014). Comprehensive Guide to Autism. In V. B. Patel, V. R. Preedy, & C. R. Martin (Eds.), *Comprehensive Guide to Autism* (1°). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4788-7>
- Dehorter, N., Marichal, N., Marín, O., & Berninger, B. (2017). Tuning neural circuits by turning the interneuron knob. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 42, pp. 144–151). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.009>
- Devlin, B., Kelsoe, J. R., Sklar, P., Daly, M. J., O'Donovan, M. C., Craddock, N., & Wray, N. R. (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nature Genetics*, 45(9), 984–994. <https://doi.org/10.1038/ng.2711>
- Devlin, Bernie, & Scherer, S. W. (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(3), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.03.002>
- Dong, P., Wang, H., Shen, X.-F., Jiang, P., Zhu, X.-T., Li, Y., Gao, J.-H., Lin, S., Huang, Y., He, X.-B., Xu, F.-Q., Duan, S., Lian, H., Wang, H., Chen, J., & Li, X.-M. (2019). A novel cortico-intrathalamic circuit for flight behavior. *Nature*

- Neuroscience*, 22(6), 941–949. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0391-6>
- Elsabbagh, M. (2020). Linking risk factors and outcomes in autism spectrum disorder : is there evidence for resilience ? *BMJ*, 368:l6880.
<https://doi.org/10.1136/bmj.l6880>
- Eyler, L. T., Pierce, K., & Courchesne, E. (2012). A failure of left temporal cortex to specialize for language is an early emerging and fundamental property of autism. *Brain*, 135(3), 949–960. <https://doi.org/10.1093/brain/awr364>
- Famitafreshi, H., & Karimian, M. (2018). Overview of the Recent Advances in Pathophysiology and Treatment for Autism. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17, 590–594.
<https://doi.org/10.2174/1871527317666180706141654>
- Fan, Y.-T., Decety, J., Yang, C.-Y., Liu, J.-L., & Cheng, Y. (2010). Unbroken mirror neurons in autism spectrum disorders. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 51(9), 981–988. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02269.x>
- Ferguson, B. R., & Huguenard, J. R. (2022). Prefrontal PV interneurons facilitate attention and are linked to attentional dysfunction in a mouse model of absence epilepsy. *BioRxiv*, 2022.03.17.484733.
<https://doi.org/10.1101/2022.03.17.484733>
- Ferri, S. L., Abel, T., & Brodtkin, E. S. (2018). Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. *Current Psychiatry Reports*, 20(2).
<https://doi.org/10.1007/s11920-018-0874-2>
- Filice, F., Janickova, L., Henzi, T., Bilella, A., & Schwaller, B. (2020). The Parvalbumin Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(December), 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577525>
- 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. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0192-8>
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders.

Pediatric Research, 65(6), 591–598.

<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>

- Fombonne, E., Marcin, C., Cecilia, A., Ruth, M., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., Nealy, B., & Diaz, C. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato , Mexico : The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669–1685. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Fombonne, E., Scolah, J., Ibrahim, A., & Shih, A. (2022). Global prevalence of autism : A systematic review update Search strategy. *Autism Research*, February, 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>
- Fu, Z., Tu, Y., Di, X., Du, Y., Sui, J., Biswal, B. B., Zhang, Z., de Lacy, N., & Calhoun, V. D. (2019). Transient increased thalamic-sensory connectivity and decreased whole-brain dynamism in autism. *NeuroImage*, 190(November 2017), 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.06.003>
- Fung, L. K., Flores, R. E., Gu, M., Sun, K. L., James, D., Schuck, R. K., Jo, B., Park, J. H., Lee, B. C., Jung, J. H., Kim, S. E., Saggar, M., Sacchet, M. D., Warnock, G., Khalighi, M. M., Spielman, D., Chin, F. T., & Hardan, A. Y. (2021). Thalamic and prefrontal GABA concentrations but not GABAA receptor densities are altered in high-functioning adults with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 26(5), 1634–1646. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0756-y>
- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(2), 172–181. <https://doi.org/10.1007/s11689-009-9023-x>
- Grier, M. D., Carson, R. P., & Lagrange, A. H. (2015). Toward a Broader View of Ube3a in a Mouse Model of Angelman Syndrome : Expression in Brain , Spinal Cord , Sciatic Nerve and Glial Cells. *PLoS ONE*, 10(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124649>
- Hamdan, F. F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.-T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.-R., Spiegelman, D., Dobrzyniecka, S., Piton, A., Tomitori, H., Daoud, H., Massicotte, C., Henrion, E., Diallo, O., Shekarabi, M., Marineau, C., Shevell,

- M., Maranda, B., ... Michaud, J. L. (2011). Excess of De Novo Deleterious Mutations in Genes Associated with Glutamatergic Systems in Nonsyndromic Intellectual Disability. *The American Journal of Human Genetics*, *88*(3), 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.001>
- Ingiosi, A. M., Schoch, H., Wintler, T., Singletary, K. G., Righelli, D., Roser, L. G., Medina, E., Risso, D., Frank, M. G., & Peixoto, L. (2019). Shank3 modulates sleep and expression of circadian transcription factors. *ELife*, *8*, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.42819>
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, Z., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Accrombessi, M. M. K., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, *392*(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)
- Joubert, R., Mariot, V., & Dumonceaux, J. (2020). One-hour universal protocol for mouse genotyping. *Muscle & Nerve*, *61*(6), 801–807. <https://doi.org/10.1002/mus.26841>
- Kaas, J. H. (1989). The evolution of complex sensory systems in mammals. *Journal of Experimental Biology*, *146*(1), 165–176. <http://jeb.biologists.org/content/146/1/165.abstract>
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, *2*(217), 50.
- Landisman, C. E., & Connors, B. W. (2007). VPM and PoM nuclei of the rat somatosensory thalamus: Intrinsic neuronal properties and corticothalamic feedback. *Cerebral Cortex*, *17*(12), 2853–2865. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm025>
- Lautz, J., Zhu, Z., Speed, H. E., Smith, S. E. P., & Welsh, J. P. (2021). Shank3 Mutations Impair Electrical Synapse Scaffolding and Transmission in Mouse

- Brain. *SSRN Electronic Journal*, 1–54. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3790900>
- Lee, C. C., & Sherman, S. M. (2008). Synaptic Properties of Thalamic and Intracortical Inputs to Layer 4 of the First- and Higher-Order Cortical Areas in the Auditory and Somatosensory Systems. *Journal of Neurophysiology*, *100*, 317–326. <https://doi.org/10.1152/jn.90391.2008>.
- Lee, E., Lee, J., & Kim, E. (2017). Excitation / Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*, *81*(10), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.05.011>
- Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E. J. H., Jones, R. M., Pickles, A., State, M. W., Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-vanderweele, J. (2018). Seminar Autism spectrum disorder. *The Lancet*, *392*(10146), 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
- Ma, P. M. (1991). The barrelettes?architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. Normal structural organization. *The Journal of Comparative Neurology*, *309*(2), 161–199. <https://doi.org/10.1002/cne.903090202>
- Mannion, A., & Leader, G. (2013). Comorbidity in autism spectrum disorder: A literature review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, *7*(12), 1595–1616. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2013.09.006>
- Marcheselli, F., Brodie, E., Yeoh, S. N., Pearce, N., McManus, S., Sadler, K., & Collinson, D. (2018). *Mental health of children and young people in England, 2017*. NHS.
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(2), 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
- Markram, K., Rinaldi, T., Mendola, D. La, Sandi, C., & Markram, H. (2008). Abnormal Fear Conditioning and Amygdala Processing in an Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, *33*(4), 901–912. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453>

- Mejía-Ortiz, R. A. (2022). *Circuitos neuronales implicados en déficits somatosensoriales en el modelo monogénético de autismo SHANK3B -/-* [Universidad Nacional Autónoma de México].
<http://132.248.9.195/ptd2022/agosto/0828296/Index.html> Texto completo
- Mo, C., Petrof, I., Viaene, A. N., & Sherman, S. M. (2017). Synaptic properties of the lemniscal and paralemniscal pathways to the mouse somatosensory thalamus. *PNAS*, *114*(30), E6212–E6221.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1703222114>
- Mo, X. C., & Sherman, S. M. (2019). A Sensorimotor Pathway via Higher-Order Thalamus. *Journal of Neuroscience*, *39*(4), 692–704.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1467-18.2018>
- Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins : roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(3), 147–157.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
- Moriuchi, J. M., Klin, A., Ph, D., Jones, W., & Ph, D. (2017). Mechanisms of Diminished Attention to Eyes in Autism. *The American Journal of Psychiatry*, *174*(1), 26–35. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.15091222>
- Morris-Rosendahl, D. J., & Crocq, M. A. (2020). Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *22*(1), 65–72. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.1/macrocq>
- Nair, A., Jalal, R., Liu, J., Tsang, T., McDonald, N. M., Jackson, L., Ponting, C., Jeste, S. S., Bookheimer, S. Y., & Dapretto, M. (2021). Altered Thalamocortical Connectivity in 6-Week-Old Infants at High Familial Risk for Autism Spectrum Disorder. *Cerebral Cortex*, *31*(9), 4191–4205.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhab078>
- Nair, A., Treiber, J. M., Shukla, D. K., Shih, P., & Müller, R. A. (2013). Impaired thalamocortical connectivity in autism spectrum disorder: A study of functional and anatomical connectivity. *Brain*, *136*(6), 1942–1955.
<https://doi.org/10.1093/brain/awt079>
- Nelson, S. B., & Valakh, V. (2015). Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron*, *87*(4), 684–698.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.033>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, *472*(7344), 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Perfitt, T. L., Wang, X., Dickerson, M. T., Stephenson, J. R., Nakagawa, T., Jacobson, D. A., & Colbran, R. J. (2020). Neuronal L-type calcium channel signaling to the nucleus requires a novel CaMKII α -SHANK3 interaction. *Journal of Neuroscience*, *40*(10), 2000–2014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-19.2020>
- Phelan, K. ., Rogers, R. C., & Boccuto, L. (2005). Phelan-McDermid Syndrome. May 11 [Updated 2018 Jun 7]. In M. P. Adam, D. B. Everman, & G. M. Mirzaa (Eds.), *GeneReviews® [Internet]*. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1198/>
- Phelan, M. C., Rogers, R. C., Saul, R. A., Stapleton, G. A., Sweet, K., McDermid, H., Shaw, S. R., Claytor, J., Willis, J., & Kelly, D. P. (2001). 22q13 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, *101*(2), 91–99. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20010615\)101:2<91::AID-AJMG1340>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20010615)101:2<91::AID-AJMG1340>3.0.CO;2-C)
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: Structure, function and concept. In *Brain Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
- Ramachandran, V. S., & Oberman, L. M. (2006). Broken mirrors. *Scientific American*, *295*(5), 62–69. <http://www.jstor.org/stable/26069040>
- Rao, V. R., & Finkbeiner, S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends in Neurosciences*, *30*(6), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.012>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1601-183X.2003.00037.x>
- Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Devlin, B., Roeder, K., State, M. W., Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Ercan-sencicek, A. G., & Samocha, K. E. (2015).

Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci Article Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, 87(6), 1215–1233.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.016>

- Sanders, S. J., Murtha, M. T., Gupta, A. R., Murdoch, J. D., Raubeson, M. J., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., DiLullo, N. M., Parikshak, N. N., Stein, J. L., Walker, M. F., Ober, G. T., Teran, N. A., Song, Y., El-Fishawy, P., Murtha, R. C., Choi, M., Overton, J. D., Bjornson, R. D., ... State, M. W. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, 485(7397), 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature10945>
- Satterstrom, F. K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., De Rubeis, S., An, J.-Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., ... Walters, R. K. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, 180(3), 568-584.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>
- Schlabrendorff, C.-L. von. (2004). *Spatio-temporal structure of thalamically evoked activity in the barrel cortex*. Freiburg (Breisgau), Univ.
- Schuetze, M., Park, M. T. M., Cho, I. Y. K., Macmaster, F. P., Chakravarty, M. M., & Bray, S. L. (2016). Morphological alterations in the thalamus, striatum, and pallidum in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 41(11), 2627–2637. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.64>
- Schultz, S. (2007). Signal-to-noise ratio in neuroscience. *Scholarpedia*, 2(6), 2046. <https://doi.org/10.4249/scholarpedia.2046>
- Sestan, N., & State, M. W. (2018). Perspective Lost in Translation : Traversing the Complex Path from Genomics to Therapeutics in Autism Spectrum Disorder. *Neuron*, 100(2), 406–423. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.015>
- Seymour, R. A., Rippon, G., Gooding-Williams, G., Schoffelen, J. M., & Kessler, K. (2019). Dysregulated oscillatory connectivity in the visual system in autism spectrum disorder. *Brain*, 142(10), 3294–3305. <https://doi.org/10.1093/brain/awz214>

- Shen, L., Li, P., Zheng, T., & Luo, M. (2021). Comparative analysis of the autism - related variants between different autistic children in a family pedigree. *Molecular Medicine Reports*, 24(4), 1–11.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12336>
- Sherman, S. (2006). Thalamus. *Scholarpedia*, 1(9), 1583.
<https://doi.org/10.4249/scholarpedia.1583>
- Simon, D. M., & Wallace, M. T. (2016). Dysfunction of sensory oscillations in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 68, 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.016>
- Simpson, K., Adams, D., Alston-Knox, C., Heussler, H. S., & Keen, D. (2019). Exploring the Sensory Profiles of Children on the Autism Spectrum Using the Short Sensory Profile-2 (SSP-2). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 49(5), 2069–2079. <https://doi.org/10.1007/s10803-019-03889-2>
- Snell, R. S. (2010). *Clinical neuroanatomy* (Seventh Ed). Lippincott Williams & Wilkins.
- Staiger, J. F., & Petersen, C. C. (2021). Neuronal circuits in barrel cortex for whisker sensory perception. *Physiological Reviews*, 101, 353–415.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2019>
- Susco, S. G., Arias-García, M. A., López-Huerta, V. G., Beccard, A., Bara, A. M., Moffitt, J., Korn, J., Fu, Z., & Barrett, L. E. (2020). FMR1 loss in a human stem cell model reveals early changes to intrinsic membrane excitability. *Developmental Biology*, 468(1–2), 93–100.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.09.012>
- Suter, K. J., Smith, B. N., & Dudek, F. E. (1999). Electrophysiological Recording from Brain Slices. *Methods*, 18(2), 86–90.
<https://doi.org/10.1006/meth.1999.0761>
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M. R., Hammer, R. E., Liu, X., Powell, C. M., & Südhof, T. C. (2007). A Neuroligin-3 Mutation Implicated in Autism Increases Inhibitory Synaptic Transmission in Mice. *Science*, 318(October).
<https://doi.org/10.1126/science.1146221>
- Tatavarty, V., Torrado Pacheco, A., Groves Kuhnle, C., Lin, H., Koundinya, P.,

- Miska, N. J., Hengen, K. B., Wagner, F. F., Van Hooser, S. D., & Turrigiano, G. G. (2020). Autism-Associated Shank3 Is Essential for Homeostatic Compensation in Rodent V1. *Neuron*, *106*(5), 769-777.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.033>
- Tseng, C.-E. J., McDougle, C. J., Hooker, J. M., & Zürcher, N. R. (2022). Epigenetics of Autism Spectrum Disorder: Histone Deacetylases. *Biological Psychiatry*, *91*(11), 922–933. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.11.021>
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(2), 97–107.
<https://doi.org/10.1038/nrn1327>
- Uchino, S., & Waga, C. (2013). SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain and Development*, *35*(2), 106–110.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.013>
- Vanleer, A. C., Blanco, J. A., Wagenaar, J. B., Viventi, J., Contreras, D., & Litt, B. (2016). Millimeter-scale epileptiform spike propagation patterns and their relationship to seizures. *Journal of Neural Engineering*, *13*(2), 026015.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/13/2/026015>
- Veinante, P., Jacquin, M. F., & Deschenes, M. (2000). Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *420*(2), 233–243.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000501\)420:2<233::AID-CNE6>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000501)420:2<233::AID-CNE6>3.0.CO;2-T)
- Verdejo-garcía, A., & Bechara, A. (2010). Neuropsicología de las funciones ejecutivas. *Psicothema*, *22*(2), 227–235.
<https://www.redalyc.org/pdf/727/72712496009.pdf>
- Vertes, R. P., Linley, S. B., Groenewegen, H. J., & Witter, M. P. (2015). Thalamus. In *The Rat Nervous System* (pp. 335–390). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00016-4>
- Volkmar, Fred R., Paul, R., Rogers, S. J., & Pelphrey, K. A. (2014). Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders, Fourth Edition. In F. R. Volkmar, S. J. Rogers, R. Paul, & K. A. Pelphrey (Eds.), *Handbook of autism*

and pervasive developmental disorders. *Diagnosis, development, and brain mechanisms* (4th ed.). John Wiley & Sons, Inc.

<https://doi.org/10.1002/9781118911389>

Whilden, C. M., Chevée, M., An, S. Y., & Comparative, H. (2021). The synaptic inputs and thalamic projections of two classes of layer 6 corticothalamic neurons in primary somatosensory cortex of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 529(17), 3751–3771.

<https://doi.org/10.1002/cne.25163>

Woodward, N. D., Giraldo-Chica, M., Rogers, B., & Cascio, C. J. (2017). Thalamocortical Dysconnectivity in Autism Spectrum Disorder: An Analysis of the Autism Brain Imaging Data Exchange. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 2(1), 76–84.

<https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2016.09.002>

Yenkoyan, K., Grigoryan, A., Fereshetyan, K., & Yepremyan, D. (2017). Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, 331(April), 92–101.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.038>

Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., Ogshea, D. J., Sohal, V. S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J. T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J. R., Hegemann, P., & Deisseroth, K. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363), 171–178. <https://doi.org/10.1038/nature10360>

Zhang, W., & Bruno, R. M. (2019). High-order thalamic inputs to primary somatosensory cortex are stronger and longer lasting than cortical inputs. *eLife*, 8(e44158). <https://doi.org/10.7554/eLife.44158>

Zhou, Y., Kaiser, T., Monteiro, P., Zhang, X., Van der Goes, M. S., Wang, D., Barak, B., Zeng, M., Li, C., Lu, C., Wells, M., Amaya, A., Nguyen, S., Lewis, M., Sanjana, N., Zhou, Y., Zhang, M., Zhang, F., Fu, Z., & Feng, G. (2016). Mice with Shank3 Mutations Associated with ASD and Schizophrenia Display Both Shared and Distinct Defects. *Neuron*, 89(1), 147–162.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.023>

Figuras suplementarias

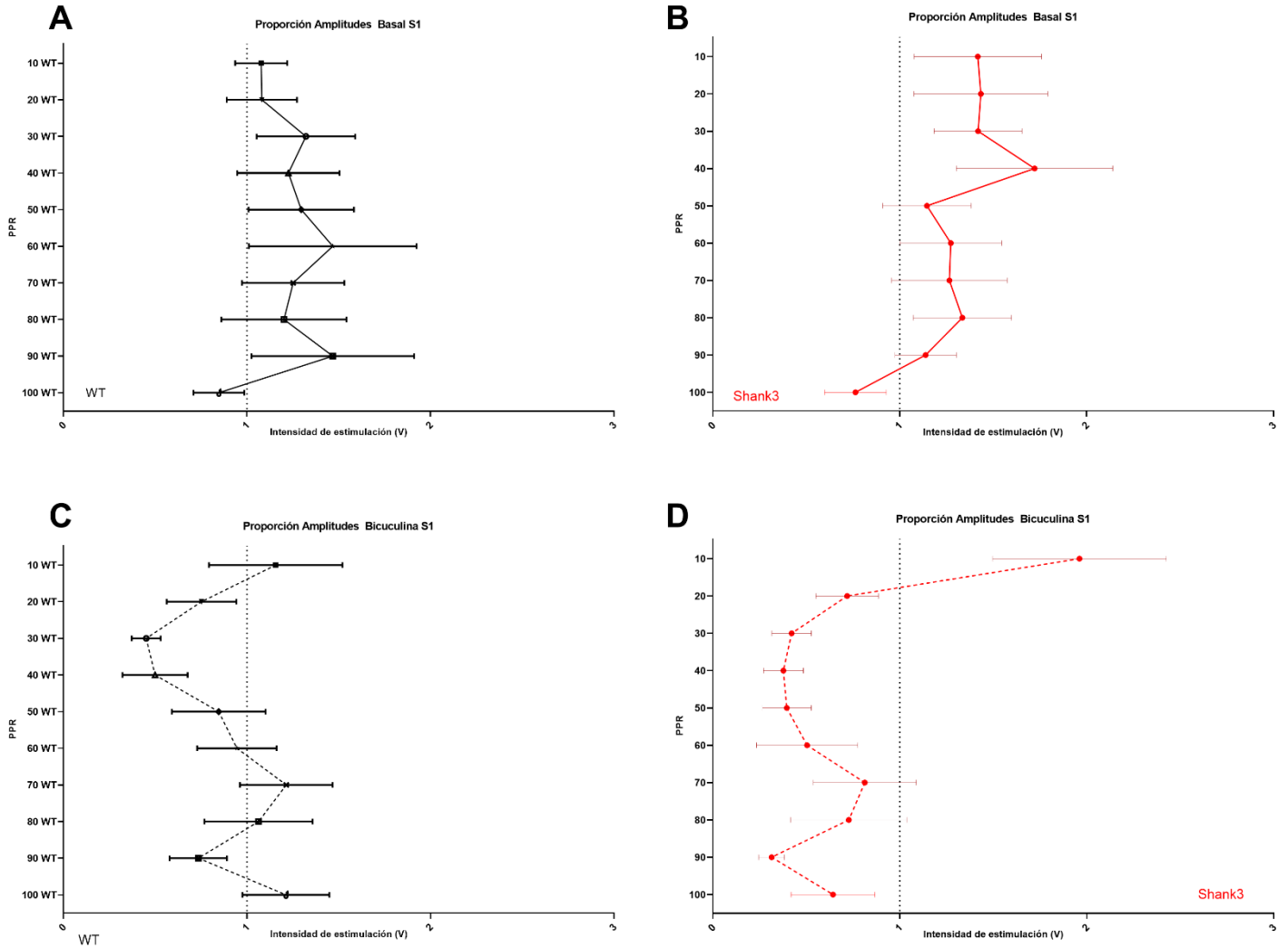


Figura suplementaria 1.1

PPR para cada una de las amplitudes S1.

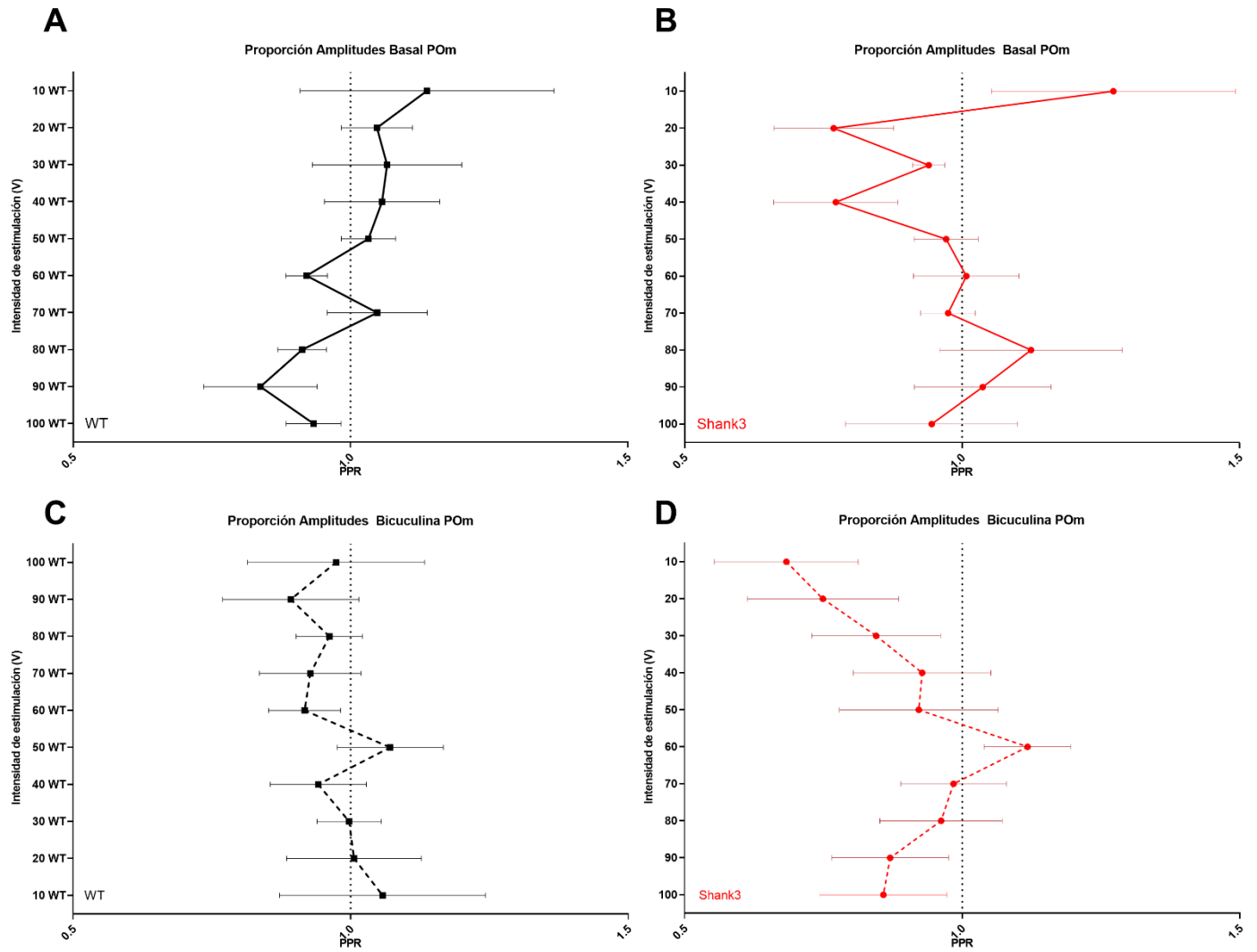


Figura suplementaria 1.2
PPR para cada una de las amplitudes POM.

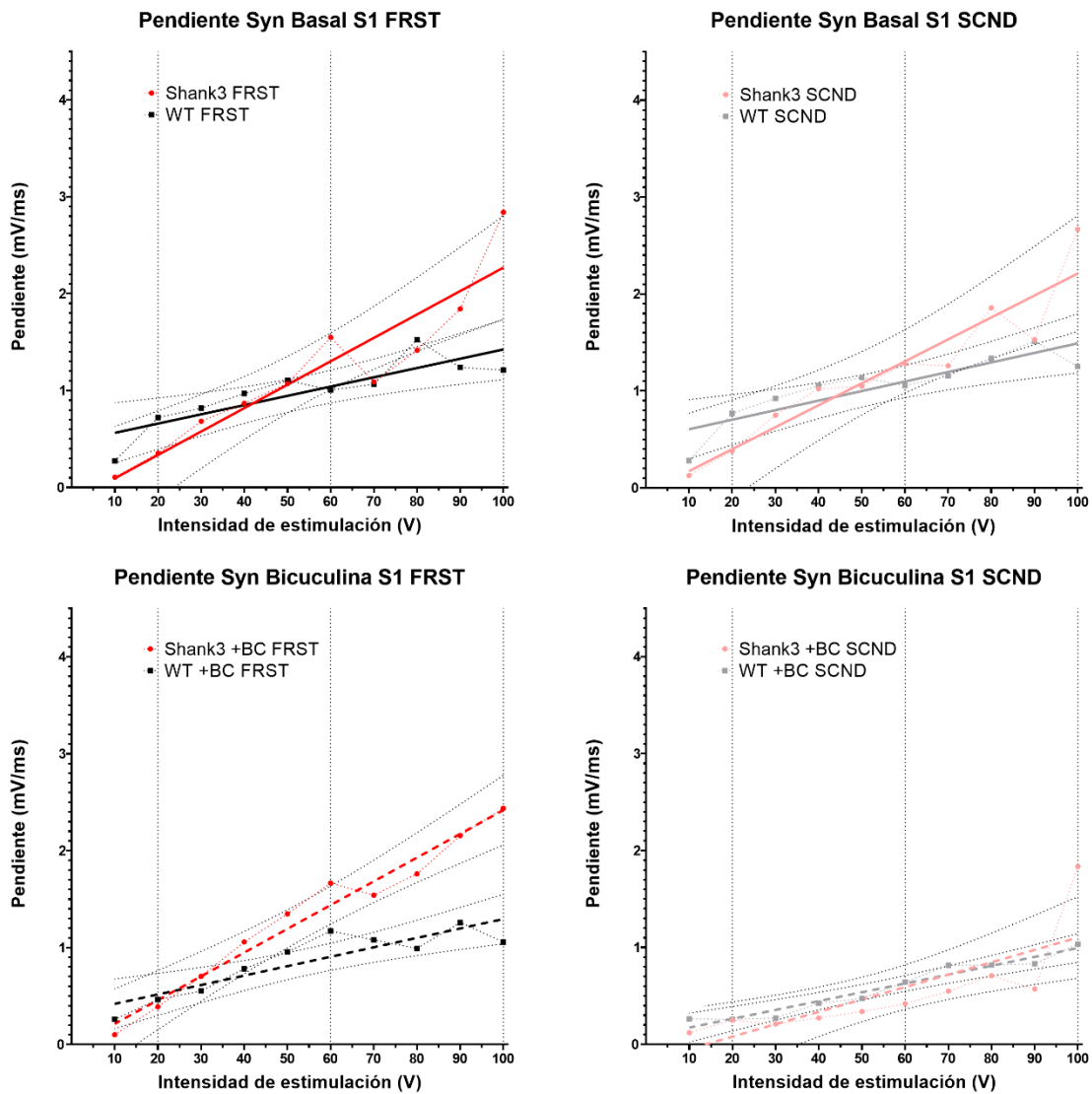


Figura suplementaria 2

Ajustes lineales sobre las curvas de pendientes para las condiciones basal y bicuculina, primer y segundo pulso S1.

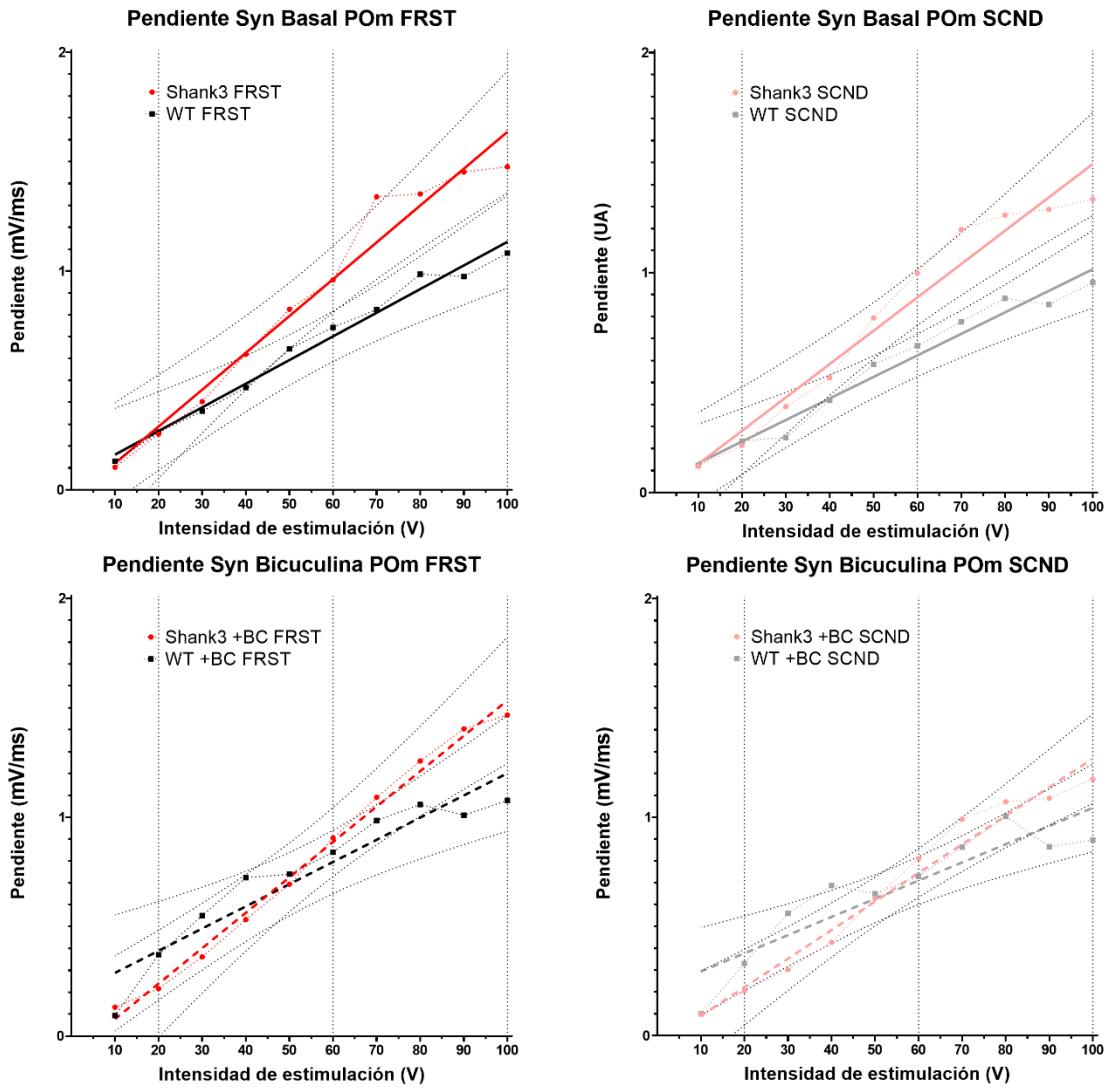


Figura suplementaria 3

Ajustes lineales sobre las curvas de pendientes para las condiciones basal y bicuculina, primer y segundo pulso POM.

Disección farmacológica y restas digitales

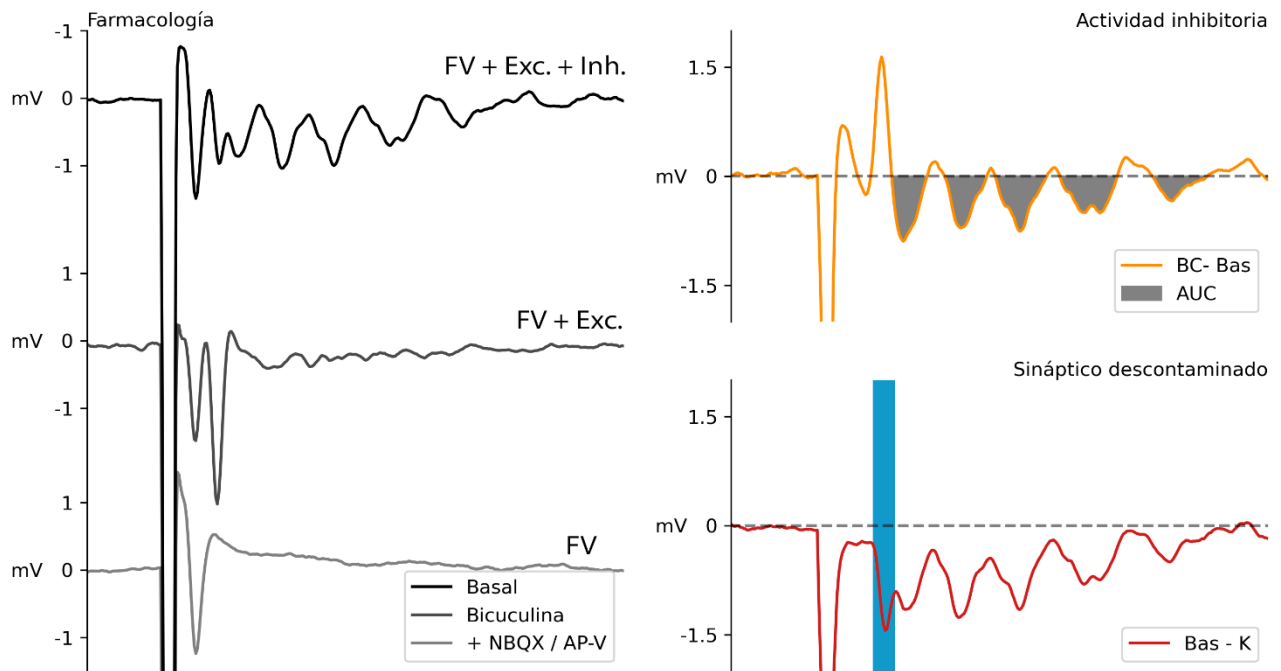
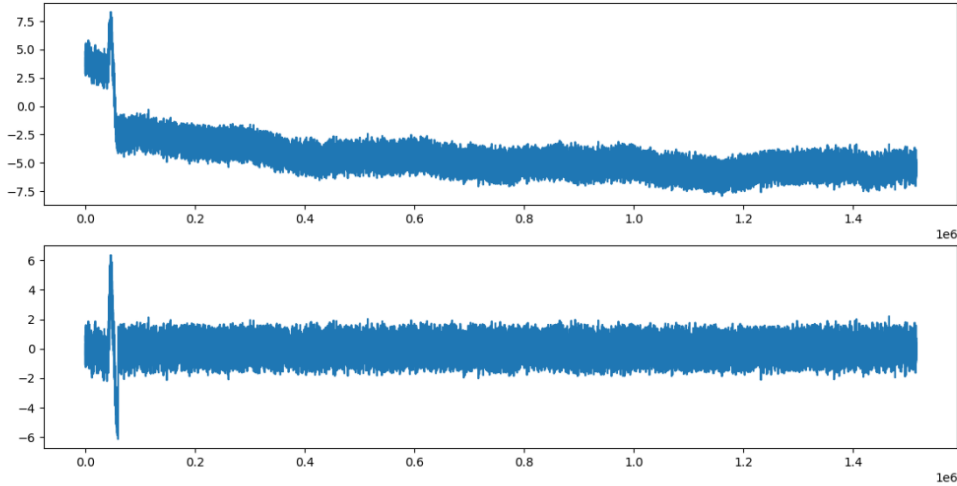


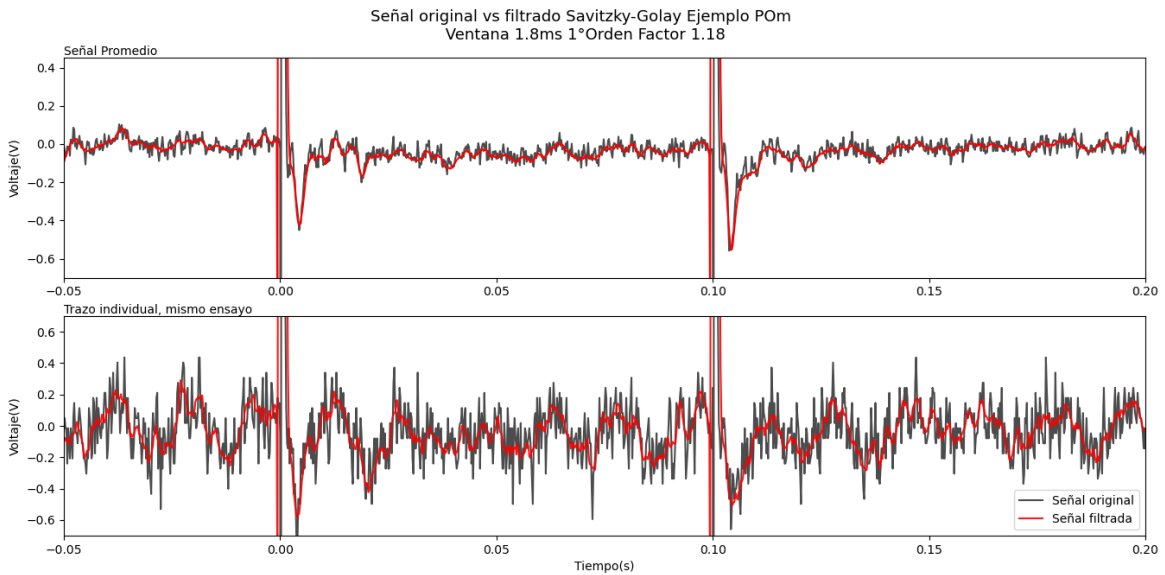
Figura suplementaria 4

Panel izquierdo (Farmacología): Disección farmacológica de corrientes excitatorias, inhibitorias y salva aferente. Panel derecho superior (Actividad inhibitoria): Resta digital condición Bicuculina-Basal e integración para calcular área bajo la curva (AUC). Panel izquierdo inferior (sináptico descontaminado): Resta digital condición basal-cocktail para remover salva aferente.

Anexos

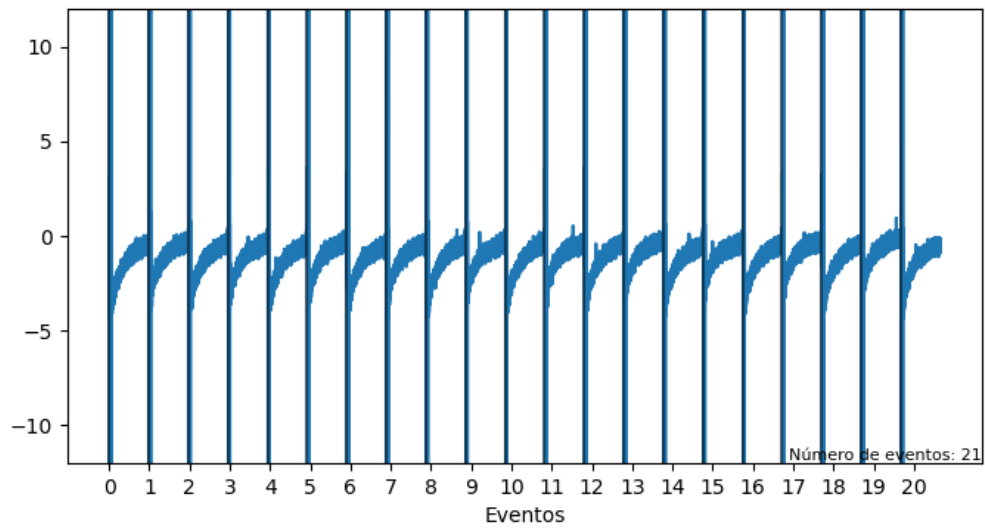


Anexo 1: Corrección de offset en los datos. Superior: Pre corrección. Inferior: Post corrección.

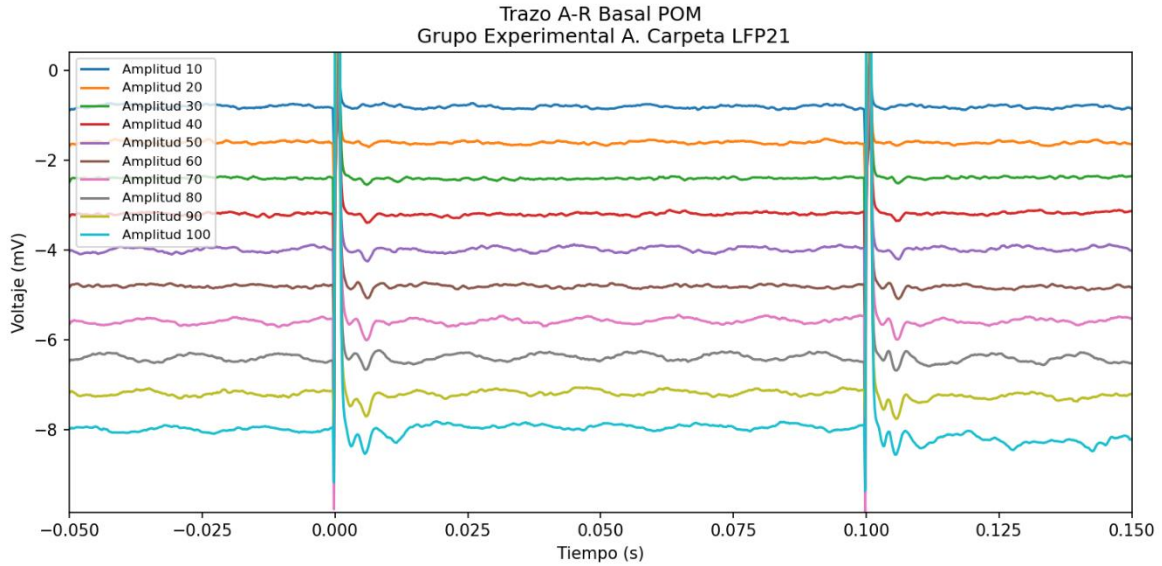


Anexo 2: Filtro Savitzky-Golay. Negro: Pre filtrado. Rojo: Post filtrado. Superior: Señal promedio para 20 ensayos. Inferior: Señal de un solo ensayo.

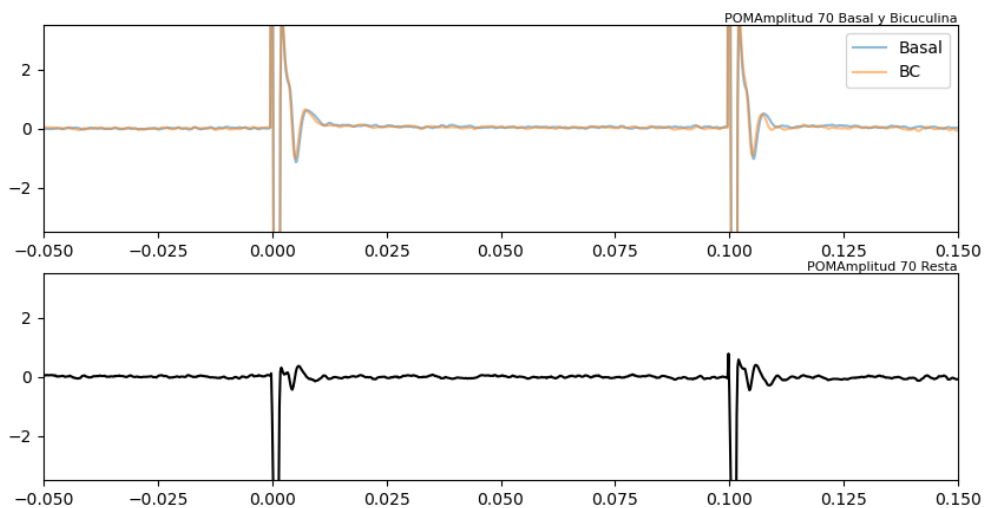
Archivo CLEAN O PP50 BC S1-V.csv
concatenado



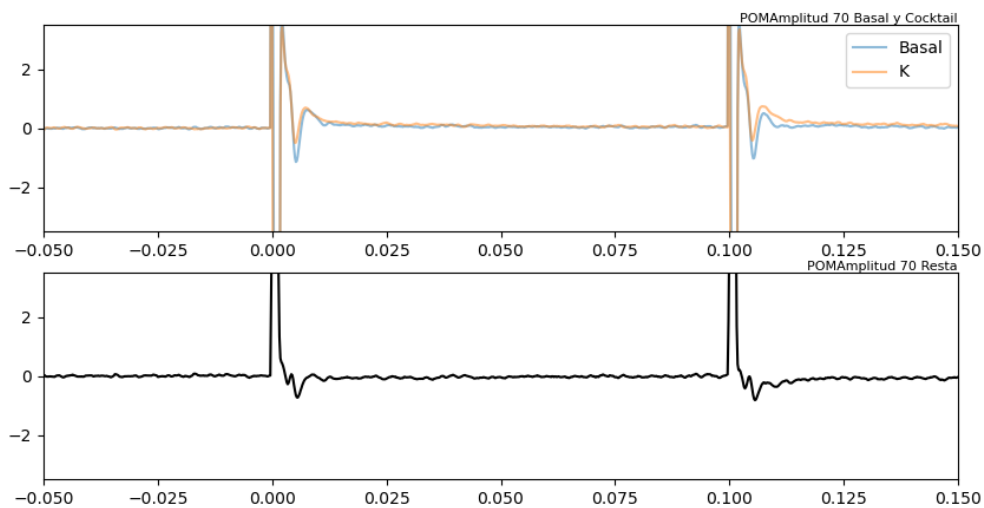
Anexo 3: Display de los 20 eventos concatenados para la exploración y búsqueda de artefactos en la señal.



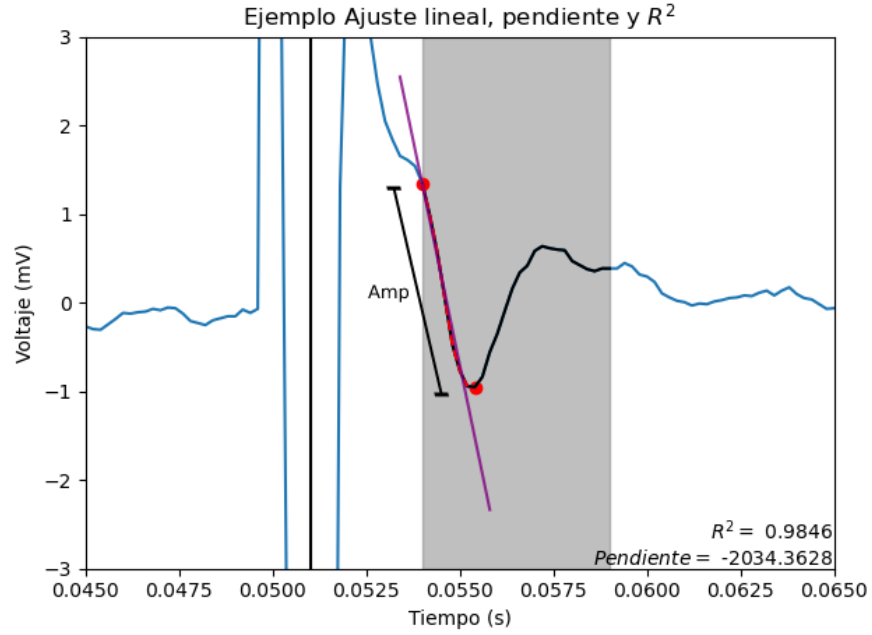
Amplitud 70 vs Resta Condición Bicuculina menos Basal



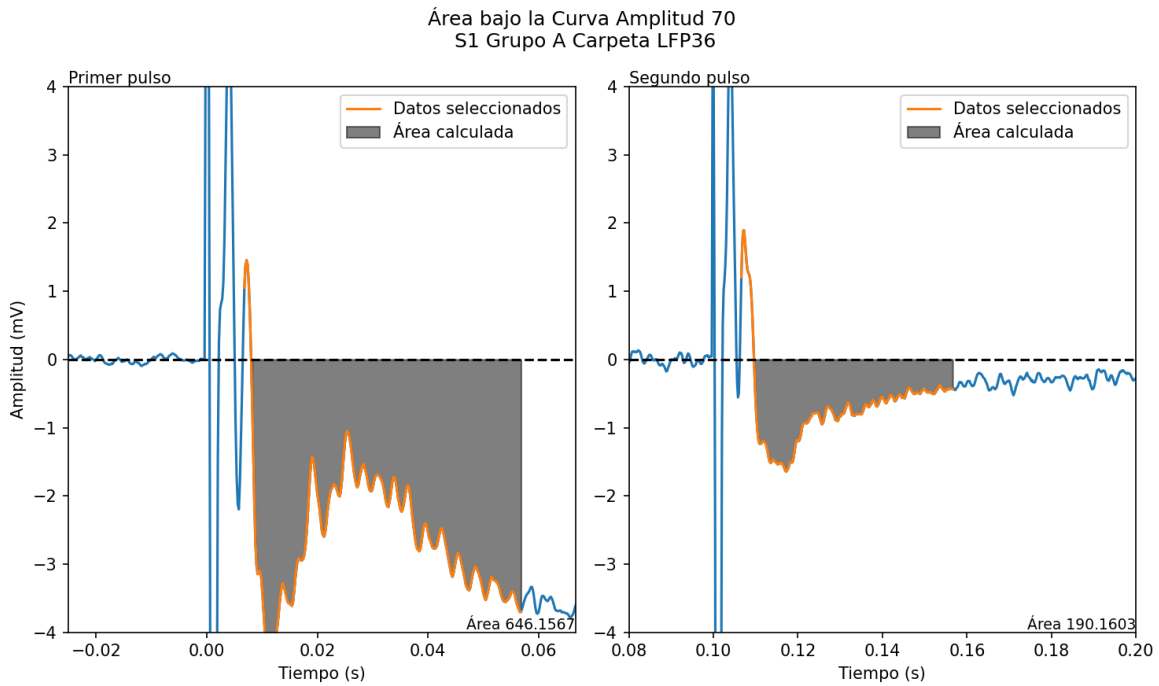
Amplitud 70 vs Resta Condición Basal menos NBQX



Anexo 4: Curvas generales y restas. Gráfica superior: Trazo promedio de los 20 ensayos para cada una de las 10 amplitudes. Gráfica media: Resta de condición Bicuculina – Basal. Gráfica inferior: Resta de condición Basal – Cocktail NBQX/AP-V. Nótese que en ambas restas (trazo negro) se logran apreciar mucho mejor los componentes del Pop spike que en los trazos individuales (azul y naranja)



Anexo 5: Ejemplo de medición de amplitud y ajuste lineal en la deflexión sináptica, calculado entre SP y SV



Anexo 6: Ejemplo de cálculo de Área Bajo la Curva. Derecha: Primer pulso. Izquierda: segundo pulso. Azul: Señal Base. Naranja: Datos comprendidos en la ventana. Gris: área calculada.

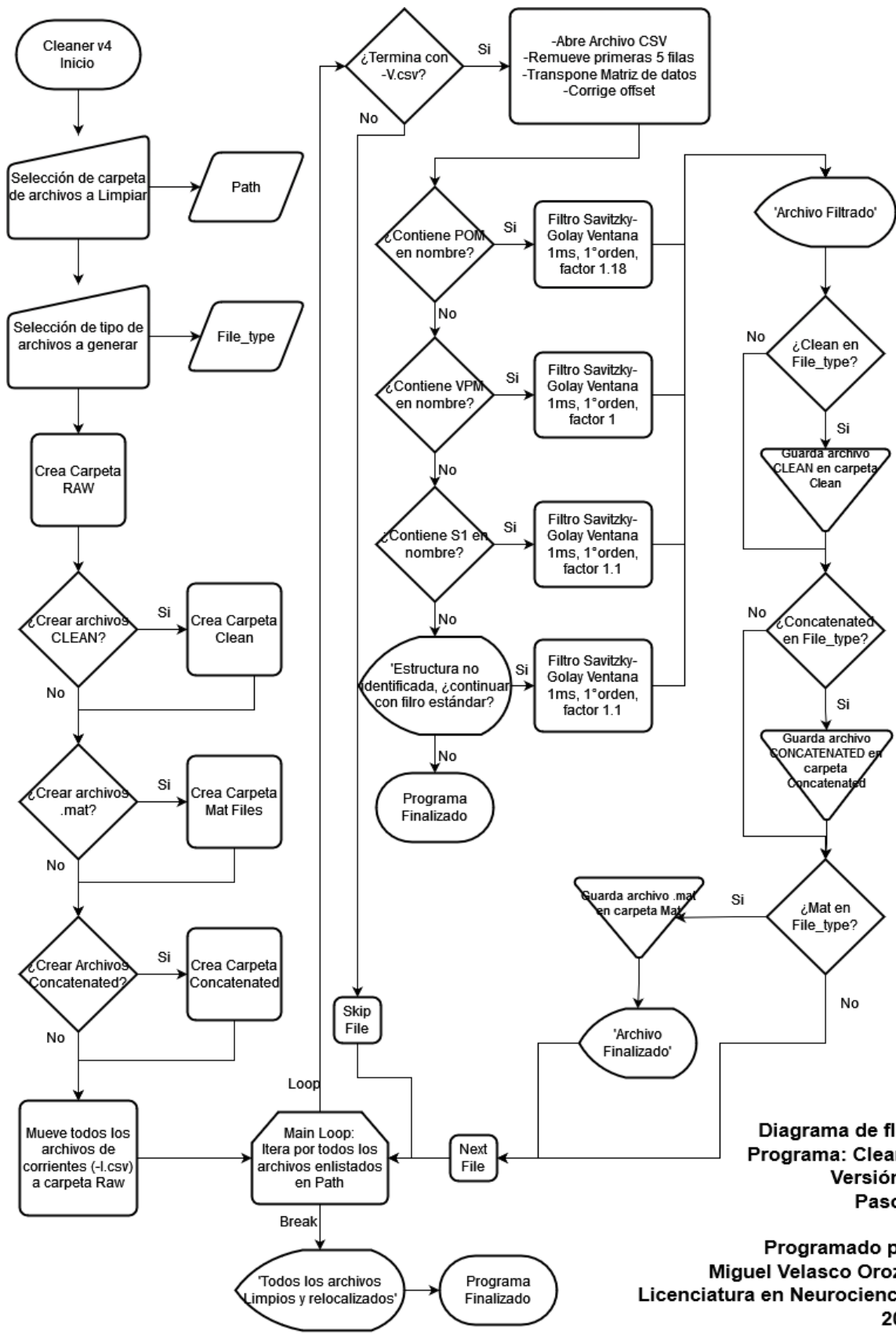


Diagrama de flujo
Programa: Cleaner
Versión: 4
Paso: 1

Programado por:
Miguel Velasco Orozco
Licenciatura en Neurociencias
2022

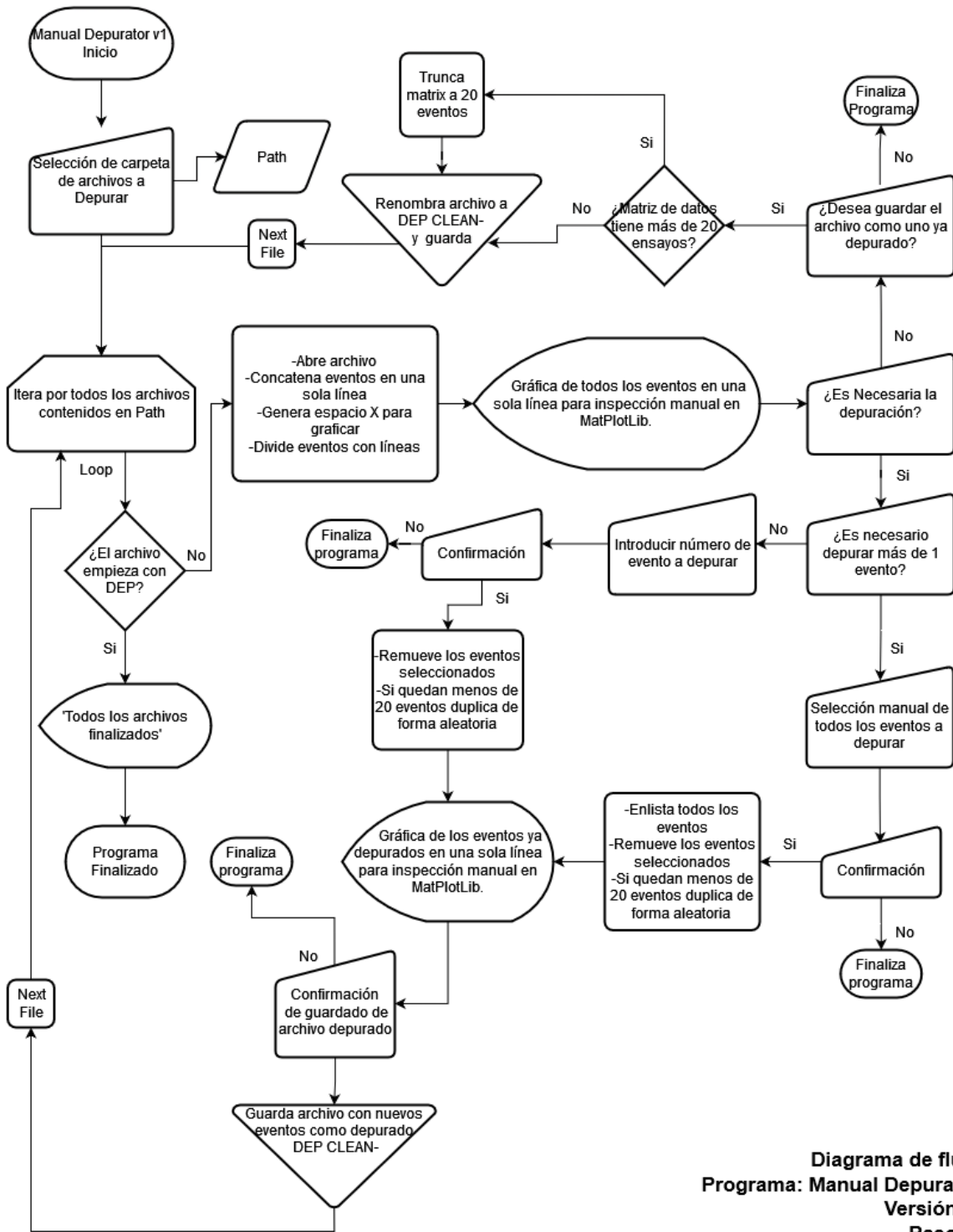


Diagrama de flujo
Programa: Manual Depurator
Versión: 1
Paso: 2

Programado por:
Miguel Velasco Orozco
Licenciatura en Neurociencias
2022

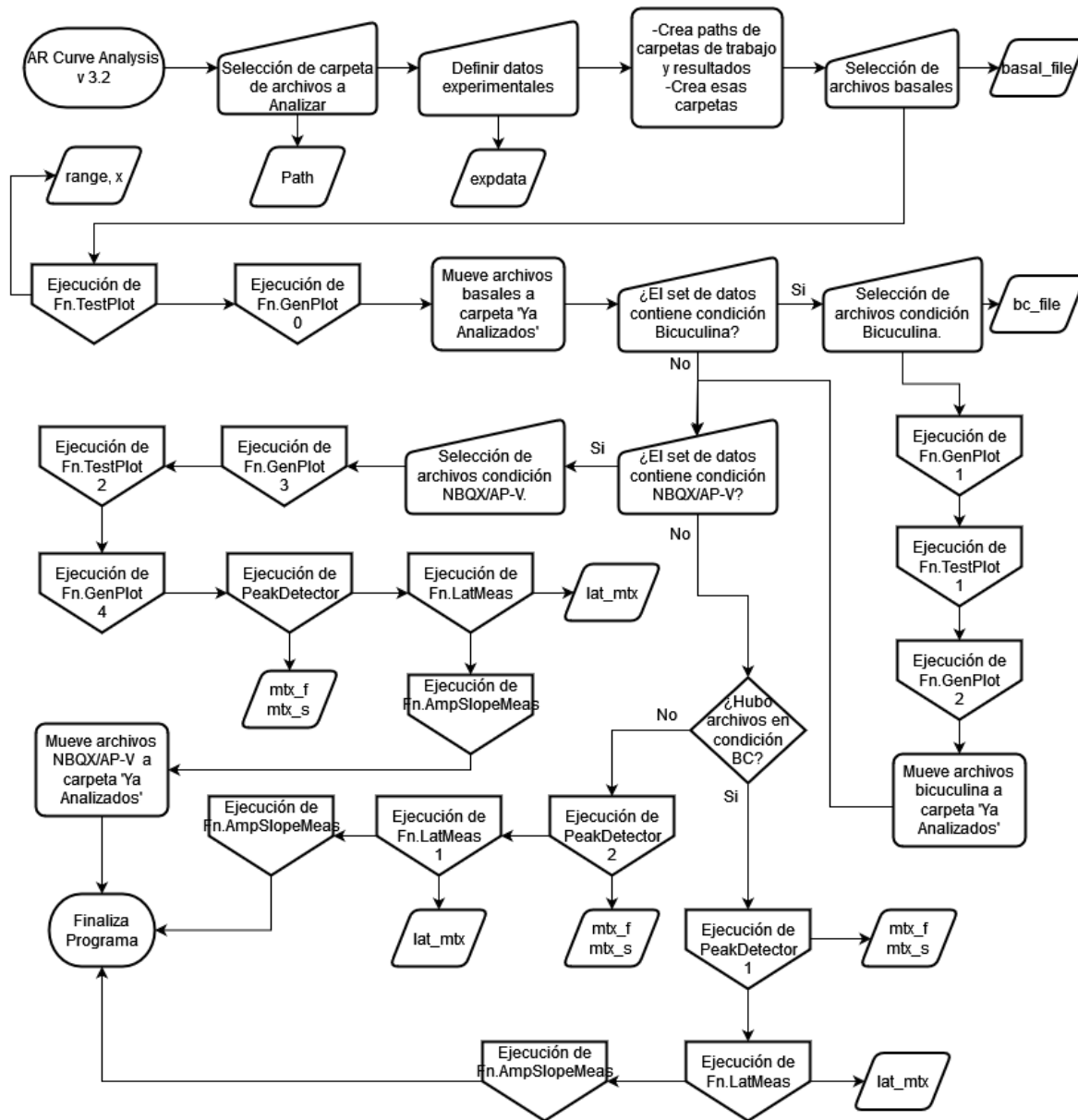
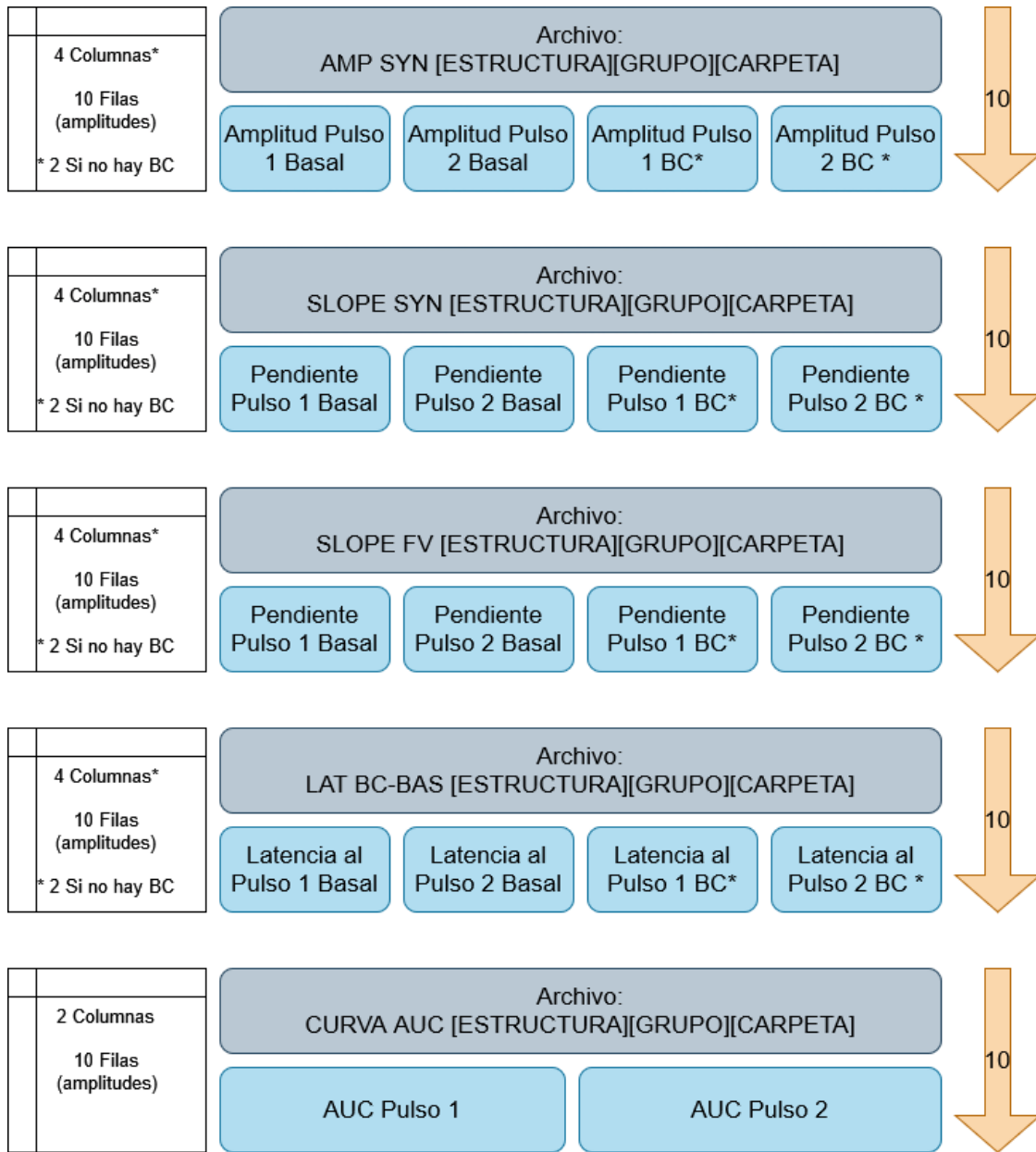


Diagrama de flujo
Programa: AR Curve Analysis
Versión: 3.2
Paso: 3

Programado por:
Miguel Velasco Orozco
Licenciatura en Neurociencias
2022



Estructura de Archivos de Resultados
Todos los Scripts

Programado por:
Miguel Velasco Orozco
 Licenciatura en Neurociencias
 2022