



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Estudio de circuitos neuronales visuales

en un modelo murino de autismo

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciado en Psicología

P R E S E N T A

Saúl Eduardo Gámez Martínez

DIRECTORA

Dra. Violeta Gisselle López Huerta

REVISOR DE TESIS

Dr. Mario Alberto Arias García



**Facultad
de Psicología**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi familia

y

A mis amistades

Тот, кто в пятнадцать лет убежал из дома,
Вряд ли поймет того, кто учился в спецшколе.

Тот, у кого есть хороший жизненный план,
Вряд ли будет думать о чем-то другом.

- Виктор Цой

Agradecimientos académicos

A la Dra. Violeta Gisselle López Huerta por el apoyo para poder realizar y finalizar el presente trabajo,

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

A mis sinodales

Dra. Laura Elisa Ramos Languren
Dr. Mario Alberto Arias García
Dr. Octavio César García González
Dr. Fructuoso Ayala Guerrero

Por sus comentarios y aportaciones para mejorar el presente trabajo

A mis compañeras

Regina Andrea Mejia Ortiz
Diana Laura Rodríguez Muñoz

Por su apoyo durante la realización de los experimentos de conducta

Al

Dr. Uri Nimrod Ramírez Jarquín por ayudar con la toma de las primeras fotografías en microscopio confocal

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular

Dra. Ruth Rincón Heredia
Dr. Abraham Rosas Arellano

Por apoyarme y enseñarme el uso del microscopio utilizado para la obtención de imágenes

A la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular

Francisco Pérez Eugenio

Por facilitarme las herramientas de software necesarias para la realización del presente trabajo

Agradecimientos personales

A mi padres

Daniel Gámez
Carmen Martínez

y

A mi hermano

Josué Gámez

Por el apoyo y enseñanzas que me han dado a lo largo de los años,

A mis amistades

Ariadna Sánchez,
Paulina Martínez,
Lizeth Perez,

Por seguir al tanto de los momentos importantes, por las pláticas y pequeñas reuniones que hemos compartido, y por enseñarme que en ocasiones es bueno alejarse un poco para fortalecer los vínculos.

Francisco Delhumeau,
Pablo Hernández,
Ariel Cerón,

Por aquellas pláticas poco convencionales que se dan cada que frecuentamos y por enseñarme que una buena amistad puede seguir cosechándose pese a no concurrir de la manera en que solíamos hacerlo.

Diana Ibarra,
Gabriela Terreros,

Por iluminar aquellos días grises de la carrera, por ser mis compañeras de estudio durante la época de exámenes, por enseñarme a tomar de la mejor forma los errores que he cometido y a celebrar los aciertos que he obtenido.

Leo Rodriguez,
Mario Olivera Toro,

Por cada fiesta, cerveza, conciertos y viajes compartidos que ayudaban a despejarme de la carga académica, y por enseñarme que también es bueno tomarse un tiempo para uno mismo.

Scarlet Ramírez,
Ileana Cabrera,

Por su apoyo incondicional, por recordarme de lo que soy capaz de realizar, y por enseñarme que en ocasiones basta con mirar atrás para observar lo que uno ha logrado.

Marcia Arroyo,
Guadalupe Acosta,
Pro Texcucano,
Diego Leonel,

Por su retroalimentación y palabras de aliento en cada una de las pláticas que hemos tenido en compañía de un buen café, por ampliar mi visión del mundo y enseñarme a ver la vida desde diferentes perspectivas.

Carlos Monter,

Por no dejarme caer en los momentos difíciles, por demostrarme lo fuerte que puedo llegar a ser [no sólo físicamente], por confiar en mí cuando ni yo mismo lo hacía, por enseñarme que la vida no es lineal y que en ocasiones es necesario caer para coger impulso, y por ampliar mi panorama mucho más allá de la Psicología.

The best sort of friends. The sort everyone hopes for but no one deserves, least of all me.

- Patrick Rothfuss

Contenido

Abreviaturas	VIII
Resumen	IX
Trastorno del Espectro Autista	1
Prevalencia e incidencia del Trastorno del Espectro Autista	1
Déficits sensoriales en el TEA	3
Déficits sensoriales visuales	6
Déficits visuales en modelos de autismo	7
Sistema visual	8
Núcleo geniculado lateral del tálamo	9
Organización del dLGN en un modelo de autismo	11
Shank3 y modelo genético de autismo	12
Planteamiento del problema	13
Objetivo general	14
Objetivos específicos	15
Hipótesis	16
Materiales y métodos	16
Animales	16
Genotipificación	17
Subunidad β de la toxina del cólera	18
Inyección intravítrea	18
Procesamiento del tejido	19
Obtención de imágenes	20
Visual Cliff	20

Contrast-Shaded Optomotor Drum Test	23
Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR)	25
Análisis de datos	27
Resultados	29
Pruebas conductuales	36
Discriminación de profundidad	36
Discriminación de contraste	38
Reconocimiento de objeto novedoso	39
Discusión	42
Conclusiones	46
Referencias	47

Abreviaturas

- **ADN** - Ácido Desoxirribonucleico
- **a.u** - arbitrary units (unidades arbitrarias)
- **CTB** - Cholera Toxin subunit B
- **dLGN** - dorsal Lateral Geniculate Nucleus
- **DPN** - Día Post Natal
- **EEG** - Electroencefalograma
- **fMRI** - functional Magnetic Resonance Imaging
- **FMR1** - Fragile Metal Retardation 1
- **KO** - Knock Out
- **NOR** - Novel Object Recognition
- **PBS** - Phosphate-Buffered Saline
- **PCR** - Polymerase Chain Reaction
- **PMS** - Phelan McDerimid Syndrome
- **RGB** - Red Green Blue
- **RGCs** - Retinal Ganglion Cells
- **TEA** - Trastorno del Espectro Autista
- **WT** - Wild Type

Resumen

El trastorno del espectro autista, es una condición del neurodesarrollo en la cual han reportado alteraciones en el procesamiento de la información sensorial entre los que destacan el de la información visual. Se ha sugerido que esto podría tener un impacto negativo en el individuo al afectar procesos cognitivos como el lenguaje y la socialización. El modelo murino de autismo *Shank3^{-/-}* es un modelo adecuado para el estudio de esta condición ya que presenta las características previamente descritas. Por otro lado, el núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo procesa la información visual organizándose en mapas topográficos de acuerdo al ojo del cual provienen, la posición topográfica de la retina y el tipo de célula; esta organización se refina con el tiempo a partir de la apertura palpebral (DPN 14) hasta llegar a un refinamiento similar al de un adulto (DPN 21). La presente tesis fue observar la segregación del dLGN en los periodos del desarrollo DPN 15 y DPN 21 en el modelo *Shank3^{-/-}* complementandolo con tareas de percepción a la profundidad, percepción al contraste y reconocimiento de objeto novedoso. Se observó que la organización topográfica de los axones retinales en el tálamo está alterada en el modelo *Shank3*, así como la presencia de déficits en la percepción al contraste, percepción a la profundidad y en tareas de reconocimiento de objeto novedoso. Los resultados indican que los mecanismos de guía y poda axonal probablemente estén modificados debido a la mutación del gen *Shank3* y por ende la percepción se vea alterada en etapas críticas, afectando la organización de circuitos bottom-up.

Palabras clave: autismo, *Shank3*, dLGN, percepción de profundidad, percepción de contraste, objeto novedoso

Trastorno del Espectro Autista

El trastorno del espectro autista (TEA), es una condición catalogada dentro de los trastornos del neurodesarrollo cuyo diagnóstico se realiza de manera clínica basándose principalmente en la presencia de los llamados síntomas centrales que consisten en déficits en la comunicación e interacción social en diversos contextos. Estos pueden variar desde una ausencia en la iniciación social hasta un exceso de incitación o incluso desinhibición de la misma; así como patrones repetitivos y restringidos en lo que respecta a conductas, actividades e intereses que se manifiestan de diversas maneras de acuerdo a factores como la edad, la capacidad de intervención y las ayudas con las que se cuenta (American Psychiatric Association, 2013).

Es importante destacar que las categorías trastorno autista, síndrome de Asperger, trastorno desintegrativo infantil, así como trastorno generalizado del desarrollo no especificado, antiguamente estipulados según el DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) como categorías independientes, hoy en día han desaparecido y se han unificado dentro del término espectro autista. Es por ello por lo que en el presente texto se usarán como equivalentes los términos autismo y espectro autista.

Prevalencia e incidencia del Trastorno del Espectro Autista

Actualmente no existe un consenso sobre la prevalencia del trastorno del espectro autista en el mundo. Por un lado, el Instituto Nacional de la Salud Mental (NIMH, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, toma como base un estudio realizado por Walensky et al., (2021), en donde se seleccionó una muestra en la que formaron parte niños con una edad de ocho años que habitaran en alguna de las once entidades en las que realizaron el estudio, planteando así una prevalencia de

cuando menos 23 niños con diagnóstico de espectro autista por cada 1000 siendo las poblaciones anglosajona y latina en donde se presenta con mayor frecuencia.

Por otro lado, Zeidan et al., (2022), realizaron una revisión de 71 textos publicados en Medline, en los cuales se describía la prevalencia del espectro autista en al menos 34 países. Es importante mencionar que esta revisión incluyó investigaciones realizadas con adultos, obteniendo como resultado una prevalencia de 65 personas con TEA por cada 10 000, en comparación con las 62 personas por cada 10 000 planteadas anteriormente por Elsabbagh et al., (2012). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que este ligero aumento podría ser explicado por los cambios en los criterios diagnósticos previamente explicados, así como un diagnóstico realizado a edades más tempranas (Hertz-Picciotto & Delwiche, 2009; Wazana et al., 2007).

Sumado a lo anterior, Oviedo et al., (2015), realizaron una estimación de la prevalencia del TEA en infantes mexicanos, concluyendo el estudio con una cifra de cuando al menos 115 000 niños con diagnóstico de espectro autista en el país, a los cuales se les sumarían 6 200 casos nuevos por año.

Así mismo, un estudio realizado en el estado de Guanajuato en una muestra infantil de más de 12 000 niños encontró una prevalencia del 0.8%, concluyendo que al menos 1 de cada 115 infantes cuenta con diagnóstico de TEA (Fombonne et al., 2016).

Con respecto a la incidencia, se estima que el autismo se diagnostica con mayor frecuencia en varones que en mujeres, teniendo una proporción de 3:1 (Loomes et al., 2017). Es importante mencionar que esta diferencia podría deberse tanto a una falta de diagnóstico, un diagnóstico tardío, un diagnóstico pasado por alto, así como a un sesgo de género al momento de realizar el mismo (Hodges et al., 2020)

Es debido a esto, que en los últimos años ha surgido el término Efecto de Protección Femenino, en el cual se plantea que las mujeres podrían requerir más factores genéticos y/o ambientales para poder expresar el mismo grado de severidad en las características base del TEA en comparación con los hombres y que por lo ende, haya una menor incidencia del espectro en este grupo (Robinson et al., 2013).

Si bien la etiología del autismo es desconocida, se tiene un consenso al considerarlo un déficit neurológico de espectro extenso que abarca casos asociados a factores genéticos y ambientales que, de manera similar a los síntomas centrales, varían en su manifestación (Oviedo et al., 2015).

Déficits sensoriales en el TEA

Además de la sintomatología previamente mencionada, se han reportado alteraciones en el procesamiento de la información sensorial desde periodos tempranos del desarrollo en al menos el 90% de la población con diagnóstico del espectro autista (Robertson & Baron-Cohen, 2017).

Estas alteraciones pueden observarse unimodalmente, es decir, afectando a una sola modalidad sensorial en específico (Casio, 2010; O'Connor, 2012; Posar & Visconti, 2018) o de manera multimodal afectando a dos o más modalidades sensoriales en el mismo individuo; siendo este tipo de alteración, la más observada en personas con TEA (Stevenson et al., 2014).

Debido a que la información percibida a través de las distintas modalidades sensoriales es fundamental para construir una correcta representación del entorno en el que uno se desenvuelve, se ha planteado que un procesamiento atípico, así como alteraciones en la integración de la información sensorial podrían tener un impacto negativo en el individuo al afectar procesos cognitivos superiores tales como el lenguaje y la socialización, mismos que se han visto alterados

en personas con diagnóstico de espectro autista; por lo que se sugiere que dichas alteraciones podrían ser la base de la sintomatología principal de este trastorno (Figura 1) (Baum et al., 2015).

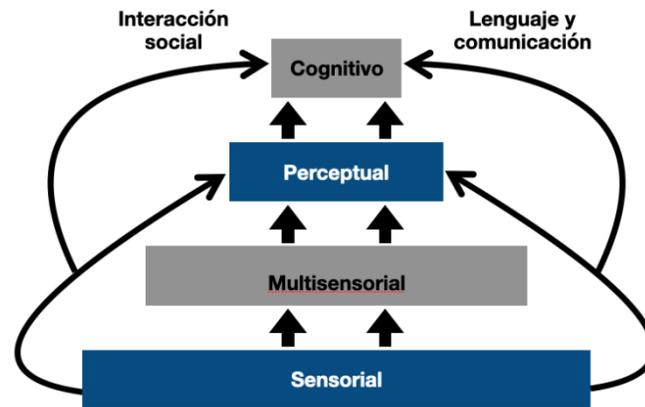


Figura 1. Representación conceptual de la relación entre el procesamiento sensorial y procesos cognitivos superiores. Modificado de Baum et al., (2015)

Además de la clasificación de las alteraciones sensoriales por modalidad sensorial, Baranek et al., (2006), proponen una clasificación de las alteraciones sensoriales en la cual toman como base la sensibilidad de la respuesta ante un estímulo en las personas con diagnóstico de espectro autista. Dicha clasificación la dividen en tres categorías principales, las cuales se citan a continuación:

1. Hipersensibilidad. Esta clasificación engloba a aquellas respuestas negativas ante una estimulación sensorial pobre y que por lo general no representa riesgo alguno para el individuo. Un ejemplo de ello se puede observar en la modalidad auditiva, en la cual, algunas personas con autismo suelen cubrirse los oídos al escuchar un ruido, así como el evitar ciertos sonidos o producir vocalmente algún sonido para bloquear algún otro. En el caso de la modalidad táctil puede haber dificultades para poder maniobrar objetos pequeños.

2. Hiposensibilidad. En esta categoría entran aquellas respuestas disminuidas o nulas ante un estímulo moderado o alto. Tal es el caso de azotar de manera brusca objetos, gusto por la vibración, así como a multitudes o embotellamientos. Del mismo modo, se ha planteado que las personas con TEA que presentan hiposensibilidad auditiva exhiben sonidos repetitivos. En el caso de la modalidad propioceptiva, se ha reportado la presencia de bajo tono muscular lo que explicaría las caídas frecuentes en dicha población. Siendo más específicos, en la modalidad táctil o somatosensorial, se ha reportado que algunos individuos con diagnóstico de TEA no son conscientes de las sensaciones a la que su cuerpo se ve expuesto, tal es el caso del dolor así como del calor.

3. Hiper- e hipo- sensibilidad. Al igual que la clasificación multimodal, esta categoría engloba una combinación de las dos categorías antes mencionadas; es decir, un patrón de respuestas mixtas ante la presencia de un estímulo sensorial.

Es importante mencionar que las alteraciones sensoriales observadas en personas dentro de esta población se presentan de manera más frecuente en periodos tempranos del desarrollo y que conforme existe un proceso de maduración, la presencia de estas alteraciones va siendo cada vez menor (Kern et al., 2006).

Del mismo modo, no existe un consenso en la frecuencia en que se presentan estas alteraciones en personas dentro del trastorno del espectro autista, sin embargo, hay quienes plantean que estos déficits pueden ser observados en cuando al menos un 65% de la población y que podrían extenderse hasta un 90% de la misma (Hazen et al., 2014).

Déficits sensoriales visuales

Se ha reportado de manera frecuente que las personas con diagnóstico de espectro autista presentan alteraciones o déficits sensoriales en la modalidad visual (Thye et al., 2018). Estas alteraciones han sido clasificadas de acuerdo con el grado de sensibilidad que presentan ante un estímulo (Baranek et al., 2006).

Algunos ejemplos de respuestas hipersensibles son el interés por partículas o estímulos diminutos en diversos contextos, aversión a luces brillantes o parpadeantes y una tendencia a dirigir la mirada hacia abajo (Bogdashina, 2003).

Por otro lado, en las respuestas hiposensibles, Bogdashina (2003) menciona que entre las más comunes se encuentran las tendencias de atracción y búsqueda de luces brillantes, así como el mantener la mirada fija durante un periodo prolongado de tiempo.

Algunos ejemplos de alteraciones sensoriales visuales en autismo son la sensibilidad al contraste (Behrmann et al., 2006), detección de contornos (Vandenbroucke et al., 2008) y percepción del color (Zachi et al., 2017).

En suma, existen estudios que reportan un procesamiento atípico de la información visual en personas con autismo al hacerse una comparación con una población sin diagnóstico, como el realizado por Wang et al., (2015), en el cual realizaron un seguimiento ocular al presentar diferentes imágenes con distintos componentes visuales a un grupo con diagnóstico de TEA y a un grupo control, reportando que las personas dentro del espectro autista tienen una preferencia hacia regiones con un nivel alto de contraste, color u orientación (saliencia de pixel), en comparación con regiones que involucraban cuestiones sociales como las caras o el contacto entre objetos y personas a nivel semántico.

Del mismo modo, en tareas de procesamiento del movimiento de objetos en diferente dirección, se observó que un grupo de infantes entre 7 y 11 años, así como de adultos con diagnóstico de espectro autista requerían una mayor cantidad de presentaciones del estímulo para poder determinar de manera correcta la dirección en la que estos se movían (Spencer et al., 2000).

Estudios que comparan de manera sistemática déficits sensoriales en pacientes con autismo síndromico como el síndrome Phelan-McDermid y autismo idiopático muestran que hay diferencias entre estas poblaciones. Mientras los individuos con diagnóstico de autismo idiopático presentan preferencialmente un fenotipo de hipersensibilidad a estímulos de todas las modalidades sensoriales incluyendo la visual, los pacientes con Phelan-McDermid muestran un fenotipo de hiposensibilidad (Tavassoli et al., 2021). Dejando de manifiesto la heterogeneidad en la presentación de síntomas dependiendo la etiología de la enfermedad.

Se ha propuesto que la presencia de estas alteraciones sensoriales podría ser explicada por déficits en la conectividad cerebral, en concreto, en la habilidad de integrar la información proveniente del exterior (Posar & Visconti, 2018).

Estudios con imagen de resonancia magnética funcional (fMRI) realizados en personas con diagnóstico de espectro autista parecen apoyar esta idea. Fu et al., (2019), realizaron un estudio en el cual encontraron alteraciones en las conexiones talamocorticales en el cerebro de personas con diagnóstico de espectro autista durante el estado de reposo; dichas regiones son importantes para el procesamiento de la información sensorial.

Déficits visuales en modelos de autismo

El establecimiento de modelos animales permite la exploración de los mecanismos neuronales que subyacen a las funciones alteradas presentes en los individuos. Estudios en

modelos de autismo idiopático, como el modelo BTBR, una cepa endogámica de roedores que presenta algunos de los síntomas centrales del autismo, muestran procesamiento visual atípico. Cuando se evalúa la respuesta al movimiento de líneas con distintos contrastes Cheng et al. (2017), observaron que hay una mejor detección de estímulos visuales finos en los sujetos experimentales comparados con roedores control. Por otro lado, en un estudio en ratones con la mutación en el gen FMR1, responsable del síndrome de X Frágil, se encontraron problemas en la percepción del contraste, y el movimiento, y un desempeño anormal en la percepción de la profundidad (Felgerolle et al, 2019). De manera interesante las observaciones en el modelo recapitulan los déficits observados en pacientes con este síndrome (Kogan et al., 2004).

Caracterizaciones de los déficits visuales presentes en otros modelos de autismo serán de gran ayuda para dilucidar los circuitos neuronales involucrados en la sintomatología.

Sistema visual

En condiciones normales, la entrada de información en la modalidad visual se da por medio de las células receptoras que se localizan en las retinas: los conos para el caso de la información del color (visión fotópica), mientras que los bastones responden en la oscuridad (visión escotópica) (Lamb, 2016).

Los axones de los conos y de los bastones se reúnen en la papila óptica que proyecta hacia el exterior del ojo para formar el nervio óptico, los cuales se cruzan en el quiasma óptico (Larsson, 2013), en donde las fibras de las retinas nasales son proyectadas de manera contralateral al núcleo geniculado lateral (dLGN) del tálamo, mientras que los axones de las retinas temporales lo hacen de manera ipsilateral. Es decir, la información de la porción nasal de la retina izquierda es proyectada hacia el dLGN derecho, mientras que la información de la porción nasal de la retina derecha es proyectada hacia el dLGN izquierdo; siendo este el primer relevo y procesamiento de

la información visual en el sistema nervioso central antes de llegar a corteza visual (Figura 2) (Liang & Chen, 2020).

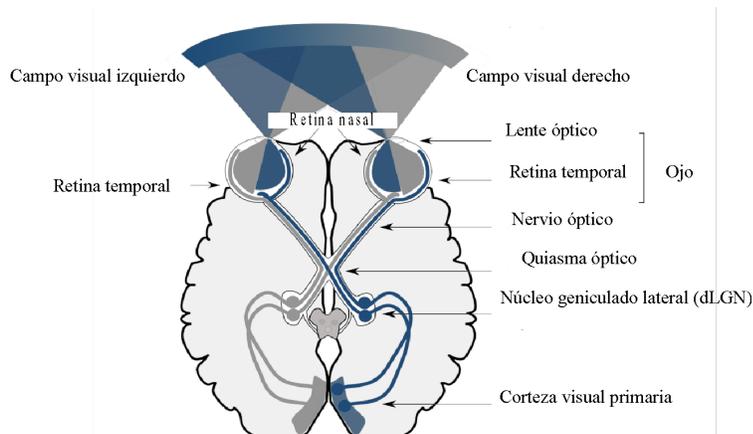


Figura 2. Sistema visual en humanos. Modificado de Seabrook et al., (2017)

Núcleo geniculado lateral del tálamo

Como se mencionó anteriormente, una de las diversas regiones a las cuales las células ganglionares de la retina (RGCs), proyectan su información es al núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo, en el cual las terminaciones se organizan en mapas topográficos de acuerdo con el ojo del cual provienen, la posición topográfica de la retina y el tipo de célula (Kerschensteiner & Guido, 2017).

Se ha reportado que, en el caso de animales como los primates, hurones y gatos, las neuronas del dLGN tienen una división compuesta por seis capas que reciben proyecciones de RGCs específicas (Seabrook et al., 2017). Es decir, las capas 1, 4 y 6 reciben información de la retina contralateral, mientras que las capas 2, 3 y 5 reciben información de la retina ipsilateral (Figura 3A).

Debido a que la organización del dLGN cambia entre especies, en el caso de los roedores no se presenta una organización por capas como sucede en primates; es decir, en los roedores se presenta una organización estereotipada, la cual es refinada de manera progresiva en periodos críticos del desarrollo postnatal (Figura 3B) (Guido, 2018).

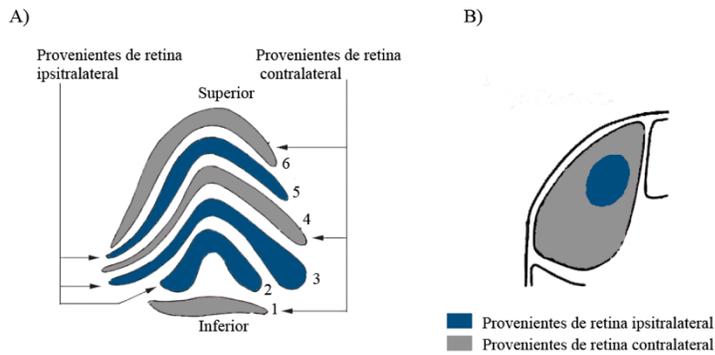


Figura 3. Organización del núcleo geniculado lateral (dLGN). **A)** En primates. **B)** En roedores

La inyección de marcadores anterógrados en la retina, es decir, aquellos que viajan del cuerpo celular hacia los axones como es el caso de la subunidad β de la toxina del cólera (CTB), han permitido estudiar el refinamiento de las conexiones del dLGN en roedores (Guido, 2008).

Se ha descrito que la maduración de las conexiones del dLGN en el roedor comienza a partir del día postnatal siete (DPN 7) en el que, pese a que la apertura de los ojos aún no se ha realizado, las regiones de innervación de la información ipsilateral ocupan alrededor de un 26% del área en el tálamo (Guido, 2008). Este porcentaje de las conexiones ipsilaterales se ve disminuido conforme se da la maduración del circuito visual, pues al momento de la apertura de ojos (DPN 12 – DPN 14), ocupan alrededor del 12% del área en el dLGN; siendo estos valores de segregación muy parecidos a los observados en roedores adultos, lo cual indica que la diferenciación de las conexiones está completa (Figura 4) (Jaubert-Miazza et al., 2005).

Es importante mencionar que en periodos tempranos del desarrollo (DPN 7), se observan conexiones que no están diferenciadas y que responden tanto a las regiones ipsilaterales como a las contralaterales, sin embargo, al igual que sucede con las conexiones ipsilaterales, estas disminuyen conforme se da el refinamiento al grado de llegar a ser nulas en periodos tardíos del desarrollo, como es el caso de los días DPN21 y DPN 28 (Figura 4) (Jaubert-Miazza et al., 2005).

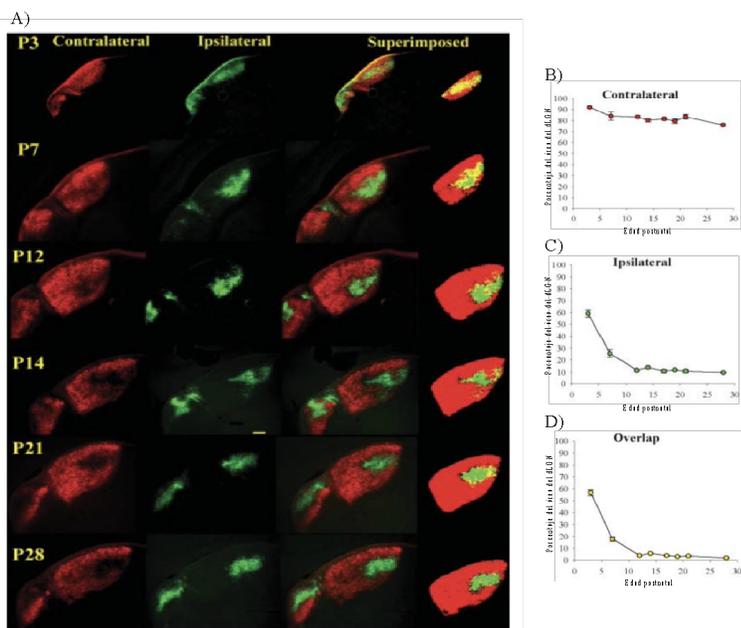


Figura 4. Desarrollo postnatal del dLGN en roedor. **A)** Diferenciación de las conexiones en el dLGN en diferentes periodos del desarrollo. **B)** Porcentaje de las conexiones de la región contralateral en el desarrollo. **C)** Porcentaje de las conexiones de la región ipsilateral en el desarrollo. **D)** Porcentaje de las conexiones no diferenciadas en el dLGN a lo largo del desarrollo. Tomado de Jaubert-Miazza et al., (2005).

Organización del dLGN en un modelo de autismo

Cheng et al., (2017) por medio de inyecciones intravitreales realizaron marcados anterógrados con CTB en el modelo idiopático de autismo BTBR en edades DPN 8 y DPN 30.

En sus resultados reportaron que los dLGN pertenecientes al grupo experimental presentaban un área menor en comparación con los roedores B6 de su grupo control. Del mismo modo, encontraron que el porcentaje del área ocupada en el dLGN de las conexiones ipsilaterales son mayores en el grupo BTBR en comparación con los roedores B6. Finalmente, realizaron un análisis del porcentaje de las conexiones no diferenciadas en ambos grupos y reportaron un mayor número de estas en el grupo del modelo idiopático de TEA tanto en la edad DPN 8 como en la

edad DPN 30 en diferentes umbrales (1.5%, 2%, 2.5%, 3%), establecidos a partir de la intensidad media de la imagen (Figura 5) (Cheng et al., 2017).

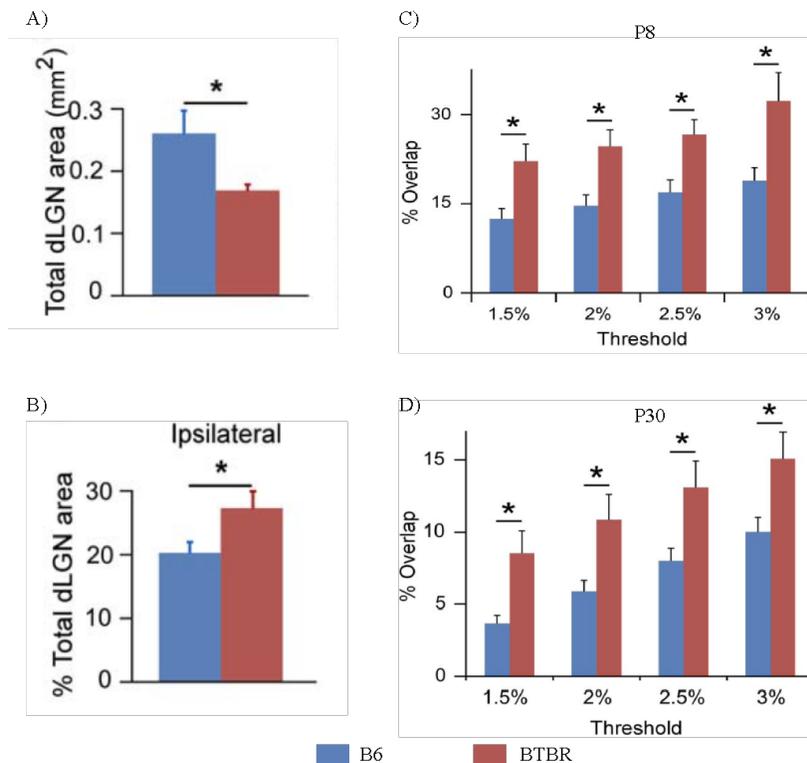


Figura 5. Maduración de las conexiones del dLGN en un modelo idiopático de autismo. **A)** Área del dLGN. **B)** Porcentaje de las conexiones ipsilaterales. **C)** Porcentaje de las conexiones no diferenciadas en el dLGN en el DPN 8. **D)** Porcentaje de las conexiones no diferenciadas en el dLGN en el DPN 30- Tomado de Cheng et al., (2017).

Es importante mencionar que no existen reportes de otros estudios en donde se explore la maduración del circuito retino-genicular en modelos de autismo tales como los modelos genéticos, entre los que destaca el modelo Shank3.

Shank3 y modelo genético de autismo

El gen Shank3 toma su nombre de la proteína homóloga que lo codifica y que pertenece a la familia SHANK que se localiza en la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas y que tiene un papel importante para el correcto desarrollo y funcionamiento de esta (Monteiro & Feng, 2017). Del mismo modo, se ha planteado que la expresión de Shank3 es más frecuente en regiones como la corteza, el estriado, las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, el giro dentado, las regiones granulares y el tálamo (Monteiro & Feng, 2017).

En humanos, el gen Shank3 se localiza en el cromosoma 22q13.13, mientras que en ratones se localiza en el gen 15E3 (Delling & Boeckers, 2021). La delección de la región 13.13 en el brazo largo (q) del cromosoma 22 lleva a una pérdida total o parcial del gen Shank3 dando como origen el síndrome de Phelan-McDermid (PMS) (Phelan et al., 2005),

El síndrome de Phelan-McDermid es un trastorno del neurodesarrollo que comparte la sintomatología previamente mencionada, con el trastorno del espectro autista (Oberman et al., 2015; Phelan et al., 2005). Peça et al., (2011), tomaron como base las mutaciones en el gen Shank3 para desarrollar un modelo murino de esta condición mediante la delección total del gen.

En dicho modelo se han observado déficits en la interacción social en tareas como *three chamber test*, así como comportamientos repetitivos y estereotipados en el *marble burying test*; a los cuales se le suman los comportamientos de acicalamiento que podrían ser un indicador de las estereotipias observadas en pacientes con TEA (Peça et al., 2011). Es debido a esto, el modelo *Shank3^{-/-}* es considerado un modelo adecuado para el estudio de los circuitos del sistema visual y los posibles mecanismos fisiológicos que subyacen a las alteraciones del TEA.

Cabe mencionar que a la fecha no se han realizado evaluaciones que permitan explorar las posibles alteraciones en la modalidad sensorial visual en este modelo.

Planteamiento del problema

Entre los déficits que presentan las personas con diagnóstico de TEA destacan las alteraciones en respuesta a estímulos sensoriales desde periodos tempranos del desarrollo.

Pese a que la modalidad visual es una de las más estudiadas a un nivel conductual en pacientes con TEA (Butchart et al., 2017; Little, 2018; Simmons et al., 2009; Tavassoli et al.,

2020), los circuitos y mecanismos neuronales involucrados en déficits visuales en el autismo son desconocidos.

Estudios de asociación de genoma completo han revelado varias mutaciones monogénicas altamente penetrantes causantes del autismo como la mutación del gen Shank3 en el síndrome de Phelan-McDermid (SPM) (Phelan & McDermid, 2012). El modelo murino de autismo Shank3^{-/-} muestra déficits en la interacción social en tareas como *three chamber test*, así como comportamientos repetitivos y estereotipados en el *marble burying test*; a los cuales se le suman los comportamientos de acicalamiento que podrían ser un indicador de las estereotipias observadas en pacientes con TEA, haciendo al ratón Shank3^{-/-} un modelo genético óptimo para estudiar los circuitos y mecanismos fisiológicos del cerebro autista.

En el caso de la modalidad visual, la información viaja de la retina hacia el núcleo geniculado lateral del tálamo, la distribución de las terminales axónicas de la retina en el dLGN presenta una organización estereotipada tanto en roedores como en humanos y representa el primer lugar en el sistema nervioso central en donde la información visual puede ser procesada y por lo tanto modulada e integrada (Li & Gu, 2020). Sin embargo, no se conoce si existen alteraciones en la conectividad de la retina hacia el dLGN en modelos monogénicos de autismo, como Shank3^{-/-}. Además de que no existen caracterizaciones conductuales con tareas específicas para evaluar la percepción de parámetros visuales.

Objetivo general

Estudiar la distribución de las conexiones de la retina en el núcleo geniculado lateral dorsal (dLGN) del tálamo, en distintos periodos de desarrollo postnatal (DPN15 y DPN22) en el modelo murino de autismo Shank3^{-/-}.

Realizar una caracterización conductual de la percepción visual en el modelo murino de autismo Shank3b^{-/-} a través de las tareas de percepción al contraste (Contrast- Shaded Optomotor Drum Test), a la profundidad (Visual Cliff), y reconocimiento de objeto novedoso (Novel Object Recognition).

Objetivos específicos

- Realizar trazados anterógrafos de las proyecciones axónicas de las retinas hacia el núcleo geniculado lateral dorsal (dLGN) del tálamo, en ratones Shank3b^{-/-} y silvestres C57BL/6J de la misma camada en los periodos postnatales DPN 15 y DPN 22.
- Observar la organización de las proyecciones axónicas de las retinas hacia el tálamo visual en ratones Shank3b^{-/-} y silvestres C57BL/6J de la misma camada en los periodos postnatales DPN 15 y DPN 22.
- Analizar la segregación del tálamo visual a partir de áreas de fluorescencia en el modelo murino de autismo Shank3b^{-/-} y el roedor silvestre C57BL/6J.
- Analizar las diferencias conductuales visuales en una prueba de *Visual Cliff* con profundidad de 80 centímetros en un modelo murino de autismo Shank3b^{-/-} y el roedor silvestre C57BL/6J.
- Analizar las diferencias conductuales visuales en una prueba modificada de *Contrast-Shaded Optomotor Drum Test* con tres variantes de contraste (-0, 31; 1; 0, 1; respectivamente) en un modelo murino Shank3b^{-/-} y el roedor silvestre C57BL/6J.

- Analizar las diferencias conductuales visuales en una prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) a partir del número de interacciones con los objetos, en un modelo murino de autismo Shank3b^{-/-} y el roedor silvestre C57BL/6J.

Hipótesis

El modelo murino de autismo Shank3b^{-/-} presentará una organización alterada de las terminales axónicas provenientes de la retina y que proyectan al núcleo geniculado lateral (dLGN) del tálamo, en comparación con roedores silvestres C57BL/6J de la misma edad y camada.

El modelo murino de autismo Shank3b^{-/-} presentará déficits en la percepción de contraste, profundidad, y reconocimiento de objetos en comparación con roedores silvestres C57BL/6J de la misma edad y camada.

Materiales y métodos

Todos los procedimientos utilizados durante el presente trabajo fueron previamente aprobados por la comisión de cuidado animal del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo CICUAL Número VLH151-19).

Animales

Se utilizaron ratones macho Shank3b^{-/-} (n=6) y ratones silvestres C57BL/6J (n=6) de la misma camada. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico para alojamiento de roedores en un ciclo estable de luz/oscuridad 12:12 a temperatura ambiente (22°C), con libre acceso a agua y alimento.

Para realizar los marcajes anterógrados, se dividió a los animales en dos grupos con base en el periodo de desarrollo postnatal en el que se encontraban DPN 15 y DPN 22, un con total de tres ratones pertenecientes a cada cepa, en cada grupo.

Para los experimentos de conducta se utilizaron ratones macho a los cuales durante el DPN 22 se les realizaron las tareas de profundidad a 80 cm, así como la tarea de reconocimiento de objeto novedoso (*Novel Object Recognition-NOR*). Debido a la longitud en tiempo de ambas tareas, y el espacio disponible para la elaboración de estas, las tres variantes de la tarea de Contrast-Shaded Optomotor Drum Test se realizó al día siguiente, es decir, cuando los ratones se encontraban en un DPN 23. Todos los experimentos fueron realizados a doble ciego.

Genotipificación

Se realizó una genotipificación convencional utilizando la técnica de PCR (polymerase chain reaction), para la cual se utilizó el protocolo *Hot Shot* para extraer el ADN a partir de una muestra de la oreja del roedor. La muestra se colocó en un tubo Eppendorf con 75µl de buffer alcalino (10ml de agua MiliQ estéril, 30µl 50% NaOH, 14µl 0.5M EDTA, pH 8.0), dejándose en incubación a 95°C por 30 minutos en el caso de los animales DPN 15 y por 60 minutos en el caso de los animales DPN 22. Una vez desintegrada la muestra, se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos y se añadió 75µl de buffer de neutralización (100ml 40mM Tris-HCl filtrado y esterilizado). Posteriormente, la muestra fue vortexeada y dejada en refrigeración por un día.

La amplificación se realizó con una solución con un volumen total de 20µl, consistiendo en 14µl de agua, 2µl de buffer, 0.5µl de dNTPs Mix, 0.5µl de oligo GCT ATA CGA AGT TAT GRC GAC TAG G (mutante reverso), 1µl de oligo GAG ACT GAT CAG CGC AGR TG (común),

0.5µl de oligo TGA CAT AAT CGC TGG CAA AG (silvestre reverso), 0.5µl de Titanium Taq 50x y 1µl de DNA.

Los tubos que contuvieron las soluciones fueron colocados en un termociclador (Applied Biosystems 2720), configurado para una desnaturalización inicial a 94°C, ocho segundos de templado a 60°C, y ocho segundos a 72°C para una extensión, posteriormente se hizo una extensión final a 77°C por un minuto.

Las muestras se colocaron en un gel de agarosa al 1% y se empleó electroforesis en gel a 120V por 30 minutos para posteriormente visualizar las bandas de interés mediante luz ultravioleta (UV).

Subunidad β de la toxina del cólera

Se utilizó la subunidad β de la toxina cólera (CTB) (Molecular Probes) como marcador anterógrado. Se disolvió la CTB en 0.5ml de PBS para una concentración final de 0.2% y se prepararon alícuotas de 5µl, las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta el día de la inyección.

Inyección intravítrea

El procedimiento para inyectar el marcador anterógrado se realizó de acuerdo con lo descrito en estudios previos (Cheng et al., 2017; Hammer et al., 2014; Jaubert-Miazza et al., 2005; Kerschensteiner & Guido, 2017). Los animales se anestesiaron con isoflurano (VetOne; en inducción 4%, 1.5% en mantenimiento; 2LPM de O₂ al 100% como facilitador). En los roedores en los cuales la apertura de los ojos no se había llevado a cabo completamente, se realizó un corte con una navaja (Gillette) en la línea divisoria de los párpados para separarlos.

Previo a que la inyección fuera realizada, se colocó una gota de Fenilefrina/Tropicamida en cada ojo con la finalidad de dilatar la pupila y se realizó una perforación en el ojo con ayuda de una aguja hipodérmica. Las inyecciones se realizaron con una aguja de 6mm conectada por medio de una manguera a una jeringa Hamilton de 5 μ l. La inyección se realizó por debajo del cristalino.

Una vez realizada la inyección se dejó la aguja por cinco minutos dentro del ojo con la finalidad de evitar que la CTB saliera del mismo. A todos los animales se les inyectó CTB conjugado con Alexa Fluor 488 en el ojo derecho y CTB conjugado con Alexa Fluor 555 en el ojo izquierdo. Es importante destacar que los procedimientos fueron realizados un día previo a la extracción del cerebro, por lo que los animales usados fueron DPN 14 y DPN 21. En el caso de los animales DPN 14 se inyectaron 2 μ l en cada ojo, mientras que en los animales DPN 21 se inyectaron 3 μ l.

Posterior a la realización de las inyecciones, se colocó una gota de manzanilla en cada ojo seguida de una capa de vaselina con la finalidad de evitar resequedad e irritación. Finalmente, los animales fueron colocados dentro de una caja sobre un cojín térmico hasta que los efectos de la anestesia pasaran, una vez ocurrido, se devolvían a sus respectivas cajas.

El día subsecuente a la inyección, es decir DPN 15 y DPN 22, los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilazina (0.35ml de solución salina, 0.1ml Ketamina, 0.5ml Xilazina; 0.1ml/20g) y perfundidos con PBS y Paraformaldehído al 4% con la finalidad de fijar el tejido. Una vez extraído el cerebro, se dejó en un periodo de post-fijación en PFA al 4% por un día (Figura 6).

Procesamiento del tejido

Una vez cumplido el periodo de post-fijación, los cerebros fueron lavados en diez baños de diez minutos en PBS para posteriormente ser seccionados en un vibratomo (Vibratome 3000).

Las rebanadas se realizaron en un plano coronal a $60\mu\text{m}$. Una vez obtenidas las rebanadas, se procedió a montarlas en un portaobjetos con medio de montaje Vectashield con DAPI para posteriormente ser analizadas.

A)



B)



Figura 6. Línea del tiempo de los experimentos de histología. **A)** Correspondiente a ratones de 14 DPN. **B)** Correspondiente a ratones 21 DPN.

Obtención de imágenes

Las imágenes se obtuvieron con ayuda de un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con un filtro de emisión de 488 para el caso de Alexa-488 y un filtro de emisión de 561 para el caso de Alexa-555.

Visual Cliff

Las pruebas de profundidad se realizaron de acuerdo con lo realizado en estudios previos (Felgerolle et al., 2019; Fox, 1965), incluyendo ligeras modificaciones. La arena para medir la

reacción a una altura de 80 cm sobre el nivel del suelo consistió en tres cajas de acrílico (largo 40 cm, ancho 40 cm, alto 40 cm) que fueron montadas unas sobre la otra (Figura 7A). La caja en la parte inferior contenía la parte cerrada mirando hacia el suelo, en la cual le fue colocada un patrón de tablero de ajedrez con cuadrados blancos y negros (2 cm x 2 cm). La segunda caja, contenía el lado abierto en la parte superior, al igual que la caja anteriormente mencionada.

Se utilizó una tercera caja que fue colocada en la parte superior, y a la cual se le colocó un patrón de cuadros de ajedrez en la cara inferior de la misma.

Al interior de las dos cajas inferiores, se colocó un unisel que dividió el área por la mitad; esto con la finalidad de que solo el área con el patrón de ajedrez fuera visible desde la parte superior. La cara del unisel que miraba hacia el área anteriormente mencionada fue forrada de igual manera con el papel con patrón de tablero de ajedrez.

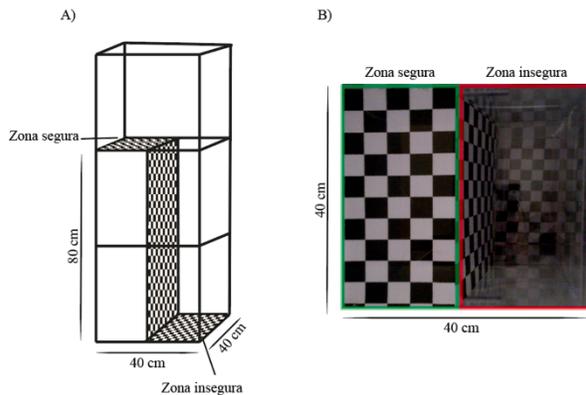


Figura 7. Tarea de Visual Cliff. **A)** Diagrama del setup. **B)** Diferenciación de zona segura e insegura desde una vista superior.

Como resultado de lo mencionando en los párrafos anteriores, visualmente se podían diferenciar dos secciones. A la primera sección se le nombró zona segura, es decir aquella zona en la caja superior que contenía el patrón de ajedrez; a la segunda sección se le nombró zona insegura y consistió en la sección en la caja inferior con el patrón de ajedrez (Figura 7B).

Durante la prueba, el roedor fue colocado en el borde de la zona segura con la vista a una de las caras de la caja. El ratón podía moverse libremente en el campo por 300 segundos. Su actividad fue grabada con una cámara de video mediante la aplicación 'cámara' incluida en la versión de Windows 11. El campo de la caja superior se limpió con etanol al 70% entre sujetos.

Contrast-Shaded Optomotor Drum Test

Las pruebas de sensibilidad al movimiento y al contraste fueron realizadas de acuerdo con lo descrito en estudios previos (Felgerolle et al., 2019; Kretschmer et al., 2013, 2015), con ligeras modificaciones descritas a continuación.

El aparato consistió en una base circular giratoria sobre la cual se colocó un cilindro cóncavo dentro del cual eran colocados los diferentes estímulos, los cuales tenían una circunferencia de 30cm y una altura de 50cm. La rotación de la base era constante ($12^\circ/\text{s}$) y era controlada de manera manual mediante un botón incluido en la misma, el mismo botón permitía controlar la dirección del giro. Dentro del cilindro, se colocó una placa de acrílico colgante, la cual era sujeta desde el techo con la finalidad de que quedara a unos 20cm sobre la base del cilindro; esta base fue usada para colocar al roedor al momento de realizar las pruebas (Figura 8A, B).

Como se mencionó con anterioridad, dentro del cilindro se colocaron los estímulos, impresos en papel cartulina. Estos estímulos eran fácilmente intercambiables. La iluminación fue homogénea en todos los roedores, así como en los diferentes estímulos utilizados.

Se utilizaron tres diferentes estímulos de acuerdo con lo establecido previamente por Felgerolle et al., (2019). Dichos estímulos consistían en un patrón de líneas verticales de 2 cm de ancho, los cuales variaban en sus valores de contraste (Figura 8C). El primer estímulo denominado lambda y con un valor de contraste 1, consistía de líneas con valores RGB (0, 0, 0)/(255, 255, 255). El segundo estímulo, denominado omega y con valores de contraste -0,31, consistía en líneas con valores RGB (0, 0, 0)/(79, 79, 79). Finalmente el estímulo beta con valores de contraste 0,31, consistía en líneas con valores RGB (175, 175, 175)/(255, 255, 255) (Figura 8C, D).

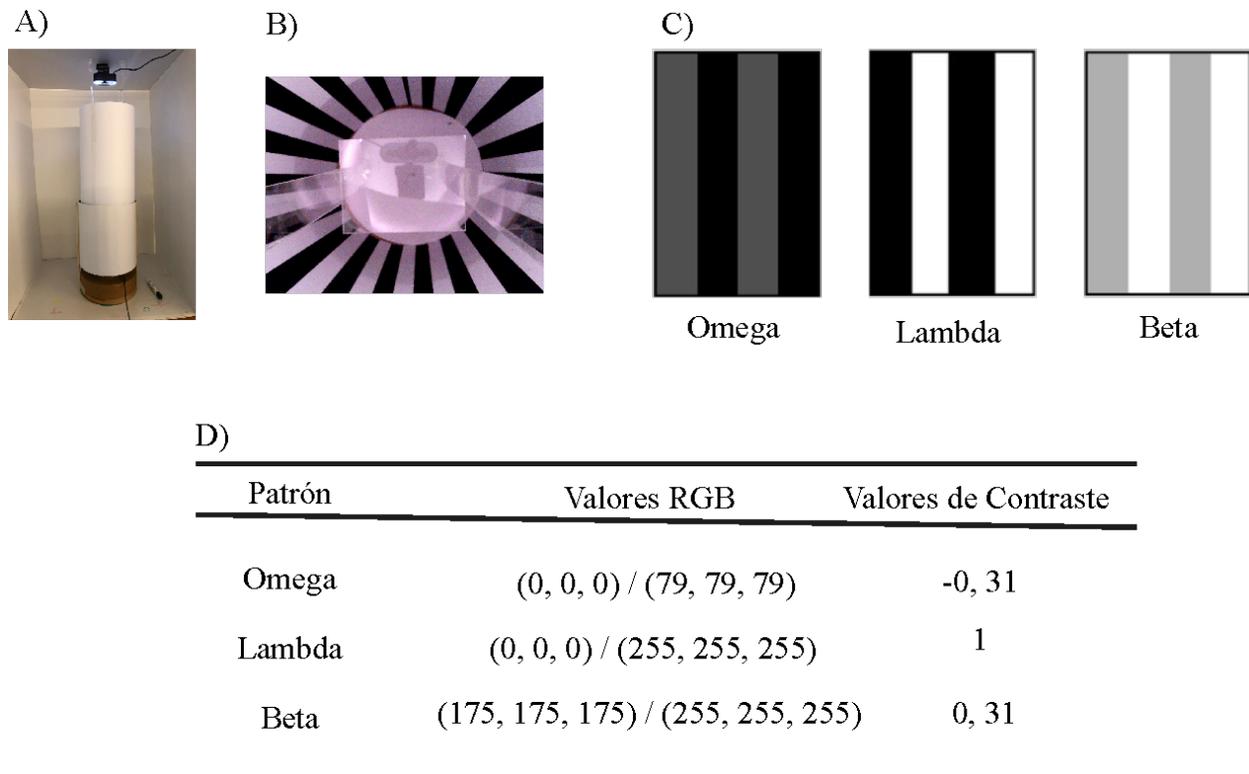


Figura 8. Contrast Shaded Optomotor Drum Test. **A)** Base giratoria. **B)** Plataforma elevada en donde el roedor era colocado. **C)** Estímulos utilizados. **D)** Valores RGB y de contraste de los estímulos.

Al momento de realizar las pruebas, los redores fueron colocados en la plataforma elevada y el cilindro permaneció estático durante los primeros 2 minutos; pasado el tiempo, la base estacionaria comenzaba a girar de manera aleatoria en sentido o en contra de las manecillas del reloj por 2 minutos. Una vez pasados los 2 minutos, se giraba la base en sentido contrario por otros 2 minutos. El cambio de dirección del giro se hacía de manera inmediata para prevenir que el roedor se habituara al movimiento de los estímulos.

La grabación incluyó los primeros 2 minutos en donde la base permaneció estática con la finalidad de observar que el roedor no mostrara movimientos de cabeza espontáneos.

Un día antes de la realización de la prueba, se realizó una habituación de 2 min al aparato, en el cual se colocó una cartulina blanca en lugar de los estímulos. La base de acrílico en la que se

colocaba al roedor era limpiada con etanol al 70% entre cada roedor; del mismo modo al finalizar una serie de estímulos, la base del cilindro era limpiada. Los videos fueron grabados con la aplicación ‘cámara’ incluida en la versión de Windows 11.

Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR)

La tarea de reconocimiento de objeto novedoso (NOR1) se realizó de acuerdo con lo planteado por Felgerolle et al., (2019), consistiendo en tres fases principales: habituación, familiarización y elección (Figura 9A).

Los roedores fueron habituados a una caja de acrílico vacía de 40cm x 40cm x 40cm por 10 minutos, 24 horas previo a la realización de la prueba con la finalidad de reducir la ansiedad del roedor al encontrarse en un ambiente nuevo.

El día de la prueba, el roedor se re-habituó en la caja vacía por 3 minutos y fue devuelto a su caja. Posteriormente, se colocó un par de objetos idénticos (cubos negros de fomi moldeable de 2.5cm x 2.5cm x 2.5 cm) de manera diagonal en esquinas opuestas de la caja, aproximadamente a 5 cm de las paredes de esta (Figura 9C). Para evitar que el roedor identificara y reconociera los objetos mediante el tacto, estos eran cubiertos con un recipiente de cristal que permitía de manera clara observar los objetos a través de este (Figura 9B).

El roedor era colocado nuevamente en la caja de acrílico, en una esquina vacía y mirando hacia las paredes de la caja; se le permitió explorar libremente los objetos por 5 minutos (Fase de familiarización).

En la fase de elección, uno de los cubos era sustituido por un objeto diferente en color y en forma (esfera de color blanco; hecha de fomi moldeable, 2.5 cm de alto) (Figura 9D). Al igual que la fase anterior, el roedor podía explorar libremente los objetos por 5 minutos. Una vez transcurrido

el tiempo, el roedor era devuelto a su caja por 3 minutos. Durante este tiempo, la caja de acrílico era limpiada con etanol al 70% y se colocaban los estímulos de la siguiente versión de la prueba.

Para investigar el impacto del color y la forma en el reconocimiento de objetos se generó una segunda (NOR2) versión de la prueba, la cual variaba en color; y una tercera (NOR3) versión de la prueba, la cual variaba en forma.

La diferencia principal entre estas versiones de la prueba consistía en los objetos novedosos que se presentaban. En la NOR2 se utilizó un cubo de las mismas dimensiones y del mismo material que el presentado en la NOR1, pero realizado en fomi de color blanco. Finalmente, en la NOR3 se utilizó una esfera de color negro realizada en fomi moldeable con 2.5cm de altura.

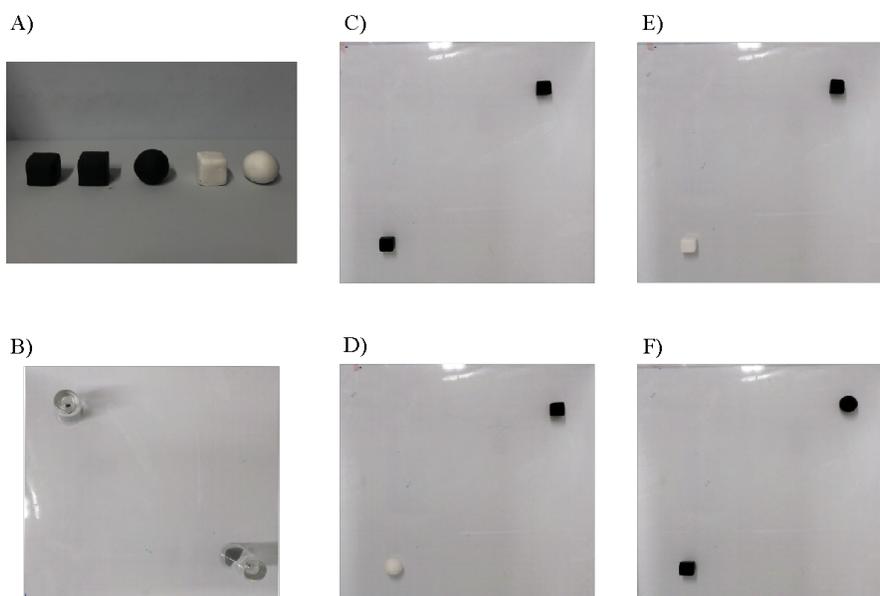


Figura 9. Versiones de tarea de objeto novedoso. **A)** Estímulos utilizados. **B)** Los estímulos fueron cubiertos con un recipiente de cristal al momento de la prueba. **C)** Objetos empleados en la fase de familiarización. **D)** En NOR1. **E)** En NOR2. **F)** En NOR3.

La elección de los colores de los objetos se realizó para que coincidieran con los estímulos presentados en la tarea de Contrast-Shaded Optomotor Drum Test.

Los videos fueron grabados con la aplicación ‘cámara’ incluida en la versión de Windows 11.

Análisis de datos

Debido a que las imágenes de las inyecciones intravítreas se obtuvieron en mosaicos de rebanadas completas, se utilizó el software Zen Blue (Zeiss) para cortar únicamente los geniculados contenidos en las mismas. Del mismo modo, se rotaron los geniculados a manera que la parte anterior del dLGN que contenía la porción Ipsilateral Roja se encontrara visualmente girada hacia la derecha mientras que en aquellos que contenían la porción Ipsilateral Verde, la parte anterior del dLGN se encontrara visualmente girada hacia la izquierda.

Se utilizó el software abierto FIJI (Schindelin et al., 2012) para determinar la intensidad de la fluorescencia para ambos fluoroforos, así como para determinar el área total del núcleo geniculado lateral (dLGN) del tálamo, determinar el porcentaje en el que se expresaban ambas intensidades y determinar el patrón de distribución de las conexiones provenientes de la retina. Con la finalidad de que los valores obtenidos fueran homogeneizados, se procedió a borrar la escala y los resultados se obtuvieron en unidades arbitrarias y las imágenes que contenían la porción del núcleo geniculado se convirtieron a un tamaño de 187 pixeles x 100 pixeles mediante el software FIJI, con estos valores se realizaron todos los análisis que se describirán a continuación.

Para analizar el patrón de distribución de las conexiones provenientes de la retina en el núcleo geniculado lateral (dLGN) del tálamo, se dividieron las imágenes en 36 secciones rectangulares iguales, comenzando la numeración en la parte superior izquierda y terminando en la parte inferior derecha (Figura 10A). Una vez dividido el núcleo geniculado lateral en 36 secciones iguales, se procedió a separar los canales RGB con la finalidad de que se obtuviera una imagen por canal. Finalmente, se procedió a obtener los valores de Densidad Integrada (IntDen)

para cada uno de los recuadros de las imágenes con valores RyG. Este procedimiento se realizó con todos los núcleos geniculados laterales (dLGNs) analizados.

Para analizar el área total, así como la intensidad total del núcleo geniculado lateral (dLGN) del tálamo, se seleccionó de manera manual la periferia de este con ayuda de la herramienta Trazo Libre incluida en el programa FIJI (Figura 10B). Una vez seleccionada la región de interés, se procedió a obtener los valores de área y de Densidad Integrada.

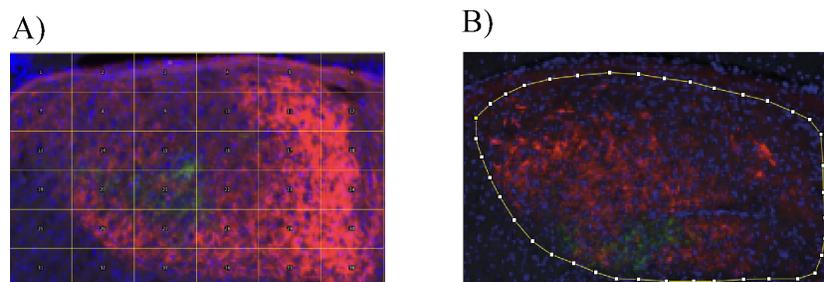


Figura 10. *Análisis de las muestras histológicas del dLGN. A) Análisis del patrón de distribución dividiendo el dLGN en 36 secciones iguales. B) Análisis de área e intensidad seleccionando el dLGN.*

Todos los datos obtenidos a partir de las imágenes de inyecciones intravítreas se analizaron con el software GraphPad Prism versión 9.0.1. Se realizó un análisis de datos no pareados.

En cuanto a las pruebas conductuales todos los videos fueron analizados de manera manual y observados en la aplicación QuickTime incluida en el sistema operativo MacOs versión 12.3.

En cuanto a la tarea de Visual Cliff, el tiempo de permanencia en cada zona fue contabilizado, para considerar que el ratón se encontraba en la zona, se incluyó el tiempo en el cual las cuatro patas de este se encontraban dentro de las zonas segura o no segura. Del mismo modo, se contabilizó la cantidad de cruces entre zonas que hubo a lo largo de la tarea.

En los videos obtenidos en las pruebas de Contrast-Shaded Opto Drum Test se contabilizaron las veces en las que el roedor giraba la cabeza siguiendo la dirección que giraban

los estímulos, es importante mencionar que solo se incluyeron los movimientos realizados mientras el roedor se encontraba estático.

En los videos de las tareas de Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR) se estableció como criterio para considerar que había una interacción y exploración directa con el objeto y se contabilizó únicamente el tiempo en el cual la nariz o las patas delanteras entraban en contacto con el recipiente que cubría las figuras. Para los datos obtenidos en las pruebas conductuales se realizó un análisis de datos no pareados.

Resultados

Los ratones Shank3b^{-/-} presentan una organización alterada de las conexiones provenientes de la retina en el DPN 15 (día de apertura palpebral)

La segregación específica de las aferentes de la retina en el núcleo geniculado lateral-dLGN (tálamo visual de orden primario), se da gracias a procesos de refinamiento de los patrones de conectividad en el desarrollo postnatal. Durante el desarrollo típico los axones retino-geniculados de los dos ojos se superponen antes de segregarse en regiones específicas para cada ojo, las proyecciones ipsilaterales convergen en la zona medial central del dLGN mientras que los axones de la retina contralateral los rodean con un traslape menor al 3% en el geniculado maduro (Jaubert-Miazza et al., 2005). Para estudiar este proceso en el modelo de autismo Shank3b^{-/-} se marcaron las aferentes retinales de cada ojo inyectando trazadores anterógrados conjugados a diferentes reporteros fluorescentes (CTB-Alexa 488 y CTB Alexa-555) en ratones de 14 y 21 días de edad. En ratones inyectados a los 14 días y analizados a los 15 días postnatales los axones provenientes

del ojo contralateral se distribuyen de manera dispersa por todo el dLGN, similar al adulto, con poca distribución en la zona medial-central en ambos grupos (Figura 11).

En este día postnatal correspondiente a la apertura palpebral el área que abarcan los axones de la retina en el dLGN es similar para ambos grupos no existiendo diferencias significativas (WT $2832 \pm 70.6 \mu\text{m}^2$ y KO $2778 \pm 60.7 \mu\text{m}^2$) (Figura 13A). Así mismo el análisis de la fluorescencia total muestra niveles semejantes de densidad integrada o intensidad (WT 754783 ± 146930 a.u. KO 776823 ± 118474 a.u.) (Figura 13B), indicando que un número similar de terminales axónicas está inervando al dLGN en este estadio postnatal en ambos grupos.

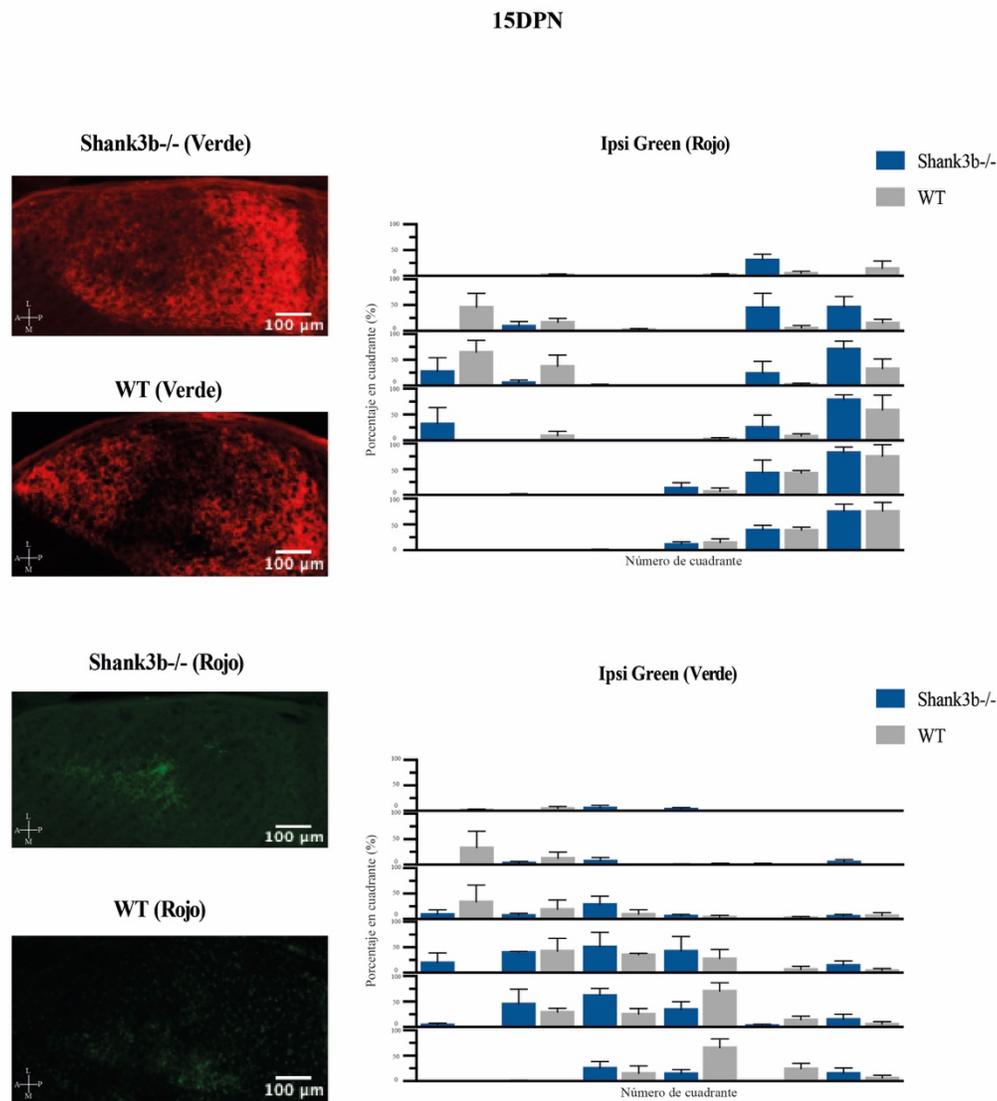


Figura 11. Análisis de la distribución de fluorescencia de las conexiones en el dLGN derecho del ratón 15DPN. Se realizó un análisis de datos agrupados del porcentaje de fluorescencia de Alexa488 (superior) y Alexa595 (inferior) por cada una de las 36 cuadrículas en las que se dividió el dLGN WT (n=3) y Shank3b^{-/-} (n=3). Nota para una mejor visualización de los datos, cada par de gráficas fue acomodado de acuerdo con su cuadrícula correspondiente.

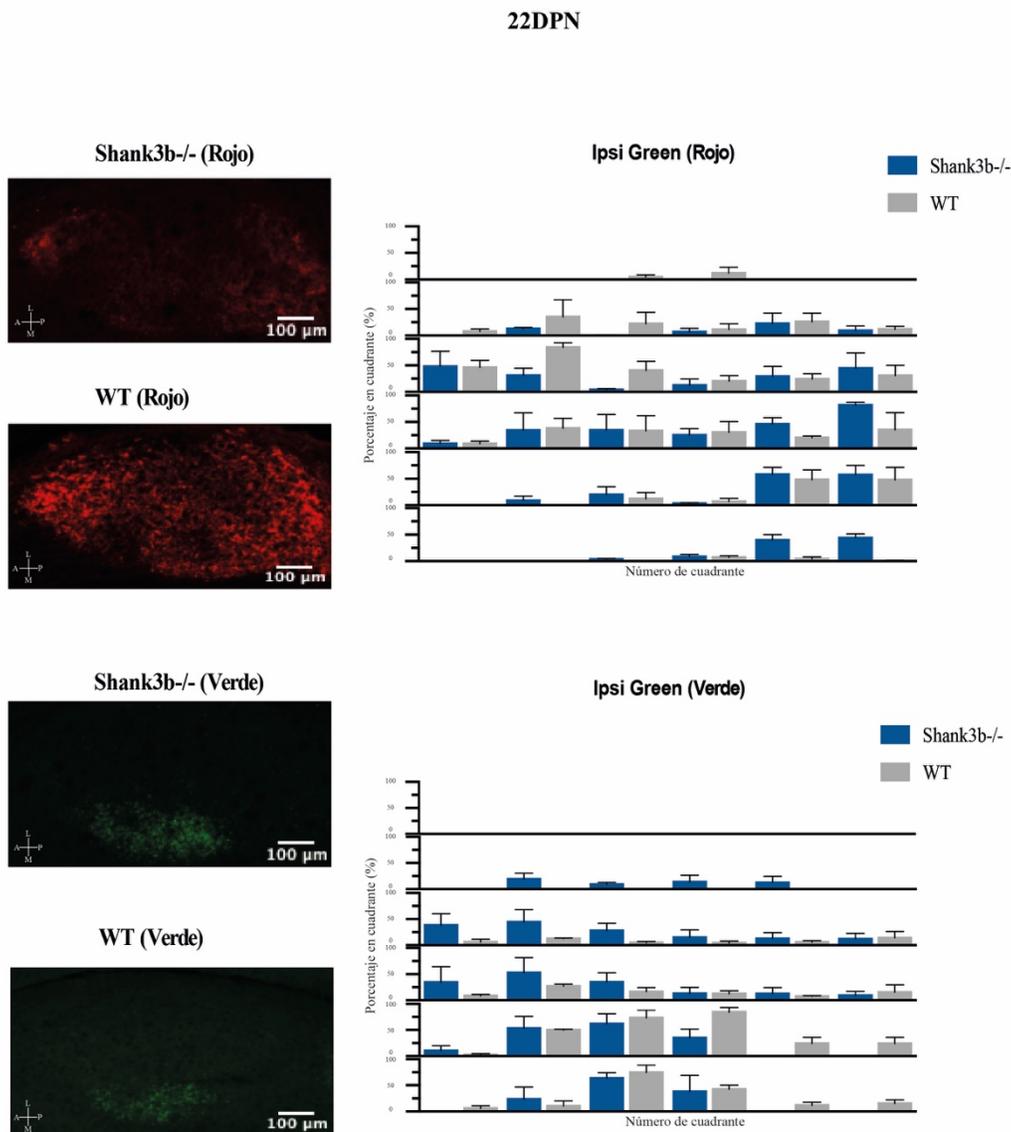


Figura 12. Análisis de la distribución de fluorescencia de las conexiones en el dLGN izquierdo del ratón 22DPN. Se realizó un análisis de datos agrupados del porcentaje de fluorescencia de Alexa488 (superior) y Alexa595 (inferior) por cada una de las 36 cuadrículas en las que se dividió el dLGN WT (n=3) y Shank3b^{-/-} (n=3). Nota para una mejor visualización de los datos, cada par de gráficas fue acomodado de acuerdo con su cuadrícula correspondiente.

Sin embargo, cuando se analizan por separado los axones contra e ipsilaterales se observa un aumento significativo en la intensidad de los axones ipsilaterales en ratones *Shank3b^{-/-}* con respecto al grupo WT (WT 22205 ± 7611 a.u., KO 84611 ± 15610 a.u., prueba t no pareada $p=0.0085$, $F=5.048$) (Figura 14A). Por su parte la densidad integrada en la zona contralateral no mostró diferencias significativas entre los grupos (WT 432570 ± 117835 a.u., KO 719200 ± 207214 , prueba t no pareada $p=0.2639$, $F=3.092$) (Figura 14B).

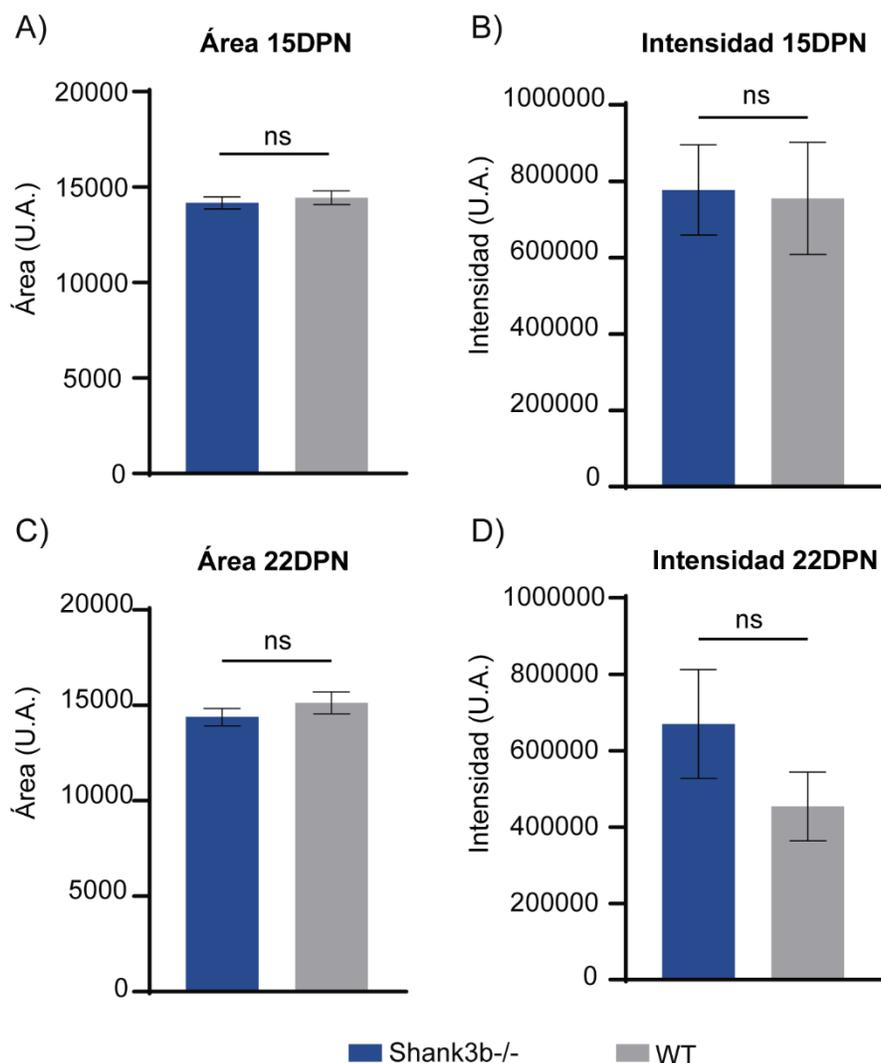


Figura 13 Análisis de área e intensidad total. **A)** Área de los dLGN de los roedores al 15DPN WT ($n=3$) y *Shank3b^{-/-}* ($n=3$). **B)** Intensidad de la fluorescencia de los dLGN 15 DPN. **C)** Área de los dLGN de los roedores 22DPN **D)** Intensidad de fluorescencia de los dLGN de los roedores 22DPN. Se graficó la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y *Shank3b^{-/-}* se muestran con $*p<0.05$. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

Al analizar el traslape del área ipsilateral con el área contralateral se encontró que es significativamente mayor en los roedores *Shank3^{-/-}* con respecto a las crías WT (WT $2.38 \pm 0.3 \%$, KO $5.35 \pm 1.04 \%$, prueba t no pareada $p=0.04$, $F=11.81$) (Figura 15E). En su conjunto estos datos nos indican que los mecanismos de refinamiento y poda axonal pueden estar alterados en el modelo de autismo *Shank3^{-/-}* durante el periodo de apertura palpebral.

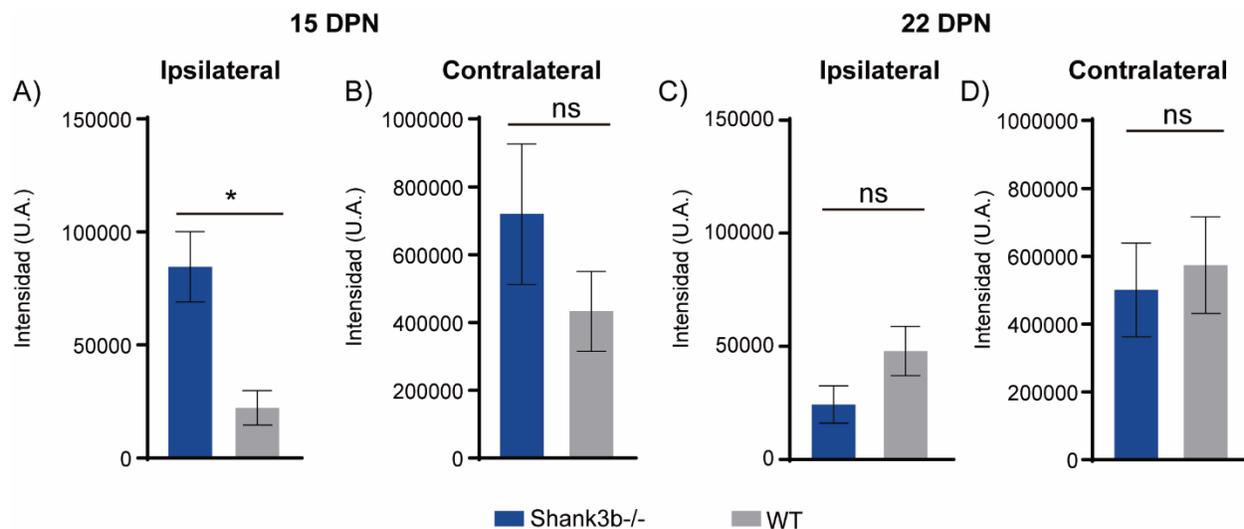


Figura 14. Análisis de intensidad por región. **A)** Intensidad de fluorescencia de las proyecciones de la retina ipsilateral al dLGN de los roedores al 15DPN **B)** Intensidad de fluorescencia de las proyecciones de la retina contralateral al dLGN de los roedores al 15DPN WT ($n=3$) y *Shank3b^{-/-}* ($n=3$) **C)** Intensidad de fluorescencia de las proyecciones de la retina ipsilateral al dLGN de los roedores al 22DPN **D)** Intensidad de fluorescencia de las proyecciones de la retina contralateral al dLGN de los roedores al 22DPN WT ($n=3$) y *Shank3b^{-/-}* ($n=3$). Se graficó la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y *Shank3b^{-/-}* se muestran con $*p<0.05$. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

De manera interesante el análisis de ratones inyectados a los 21 días no reveló diferencias en la mayoría de los parámetros. La distribución de los axones retinales contralaterales recapitula lo reportado en trabajos anteriores tanto para axones provenientes del ojo contralateral como ipsilateral (Figura 12) (Guido, 2008, 2018; Jaubert-Miazza et al., 2005). El área total del dLGN es similar en los roedores *Shank3^{-/-}* ($2820 \pm 90.05 \mu\text{m}^2$) y WT ($2966 \pm 113.2 \mu\text{m}^2$) (Figura 13C). La densidad integrada tampoco mostró diferencias significativas, aunque sí una fuerte tendencia a ser

mayor en el grupo KO (WT 453459 ± 90105 vs. KO 669629 ± 142186 a.u.) (Figura 13D). En contraste con los hallazgos en ratones de 15 días postnatales, las mediciones de la segregación de las zonas ipsi y contralaterales demostró que la densidad integrada para cada zona es similar en ambos grupos (WT_{contra} 573748 ± 142709 a.u., KO_{contra} 500669 ± 138329 a.u., prueba t no pareada $p=0.72$, $F=1.06$; WT_{ipsi} 47989 ± 10880 , KO_{ipsi} 24301 ± 8209 a.u. prueba t no pareada $p=0.11$, $F=1.756$) (Figura 14C y D), aunque se observa una tendencia a una menor intensidad de la zona ipsilateral en los ratones Shank3^{-/-} sugiriendo una sobrecompensación de la segregación en el desarrollo. Por su parte el porcentaje de traslape de las zonas contra e ipsilateral tampoco mostró diferencias significativas y presento valores similares a los reportados en este estadio postnatal en animales control (WT $3.68 \pm 1.3\%$, KO $2.72 \pm 1.09\%$, prueba de t no pareada $p=0.59$, $F=1.223$) (Figura 15F) (Jaubert-Miazza et al., 2005).

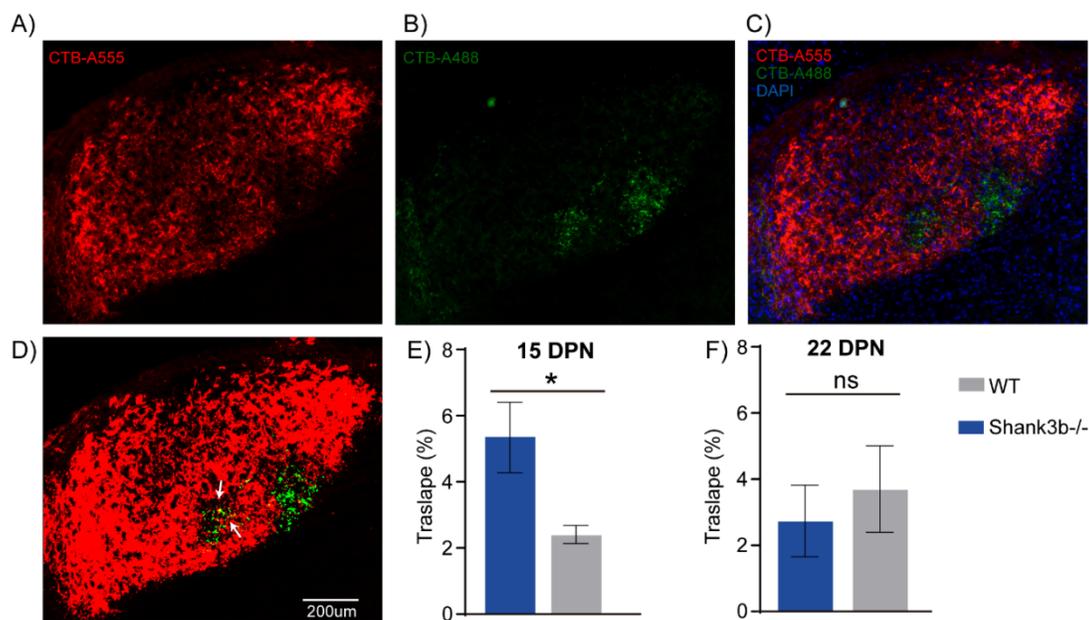


Figura 15. Análisis del traslape de regiones ojo-específicas en el dLGN. A) Vista coronal de las proyecciones retino-talámicas del ojo contralateral con CTB A-555. **B)** Vista coronal de las proyecciones retino-talámicas del ojo ipsilateral. **C)** Imágenes sobrepuestas. **D)** Máscara sobre las regiones ipsi y contralaterales para cuantificar el porcentaje de traslape (flechas blancas). **E)** Cuantificación del porcentaje de traslape al 15DPN. **F)** Cuantificación del porcentaje de traslape al 22DPN. WT (n=3) y Shank3b^{-/-} (n=3). Media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y Shank3b^{-/-} se muestran con * $p<0.05$. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

Pruebas conductuales

Las variaciones en los patrones de distribución de los axones retino fúgales en el desarrollo postnatal sugiere alteraciones en vías post-retinales y por lo tanto afectaciones en procesamientos visuales de diferentes tipos. Para observar si existen déficits visuales en etapas tempranas del desarrollo aplicamos una batería de pruebas conductuales a los 22 días postnatales.

Discriminación de profundidad

Para evaluar diferencias en la percepción de la profundidad se aplicó la prueba de visual cliff (ver métodos) (Figura 16A). Se contabilizó el número de cambios de zona durante la tarea, el grupo Shank3^{-/-} presenta un menor número de cambios (10.6 ± 1.8) comparado con el grupo WT (16.5 ± 1.9) (prueba t no pareada $p=0.03$, $F=1.3$) (Figura 16B). A pesar de ello los ratones WT tienen una diferencia significativa en el tiempo promedio que pasan en la zona segura en comparación con la zona no segura, pasando más tiempo en la zona no segura (segura 126.3 ± 9.8 s, no segura 169.9 ± 10.1 s, prueba t no pareada, $p=0.0052$, $F=1.066$) (Figura 16C). En contraste no hay diferencias en el tiempo promedio que pasa el grupo Shank3^{-/-} en ambas zonas (segura 146 ± 20.8 s, no segura 152.6 ± 17.57 s, prueba t no pareada, $p=0.052$ $F=1.405$) (Figura 16D).

Visual Cliff

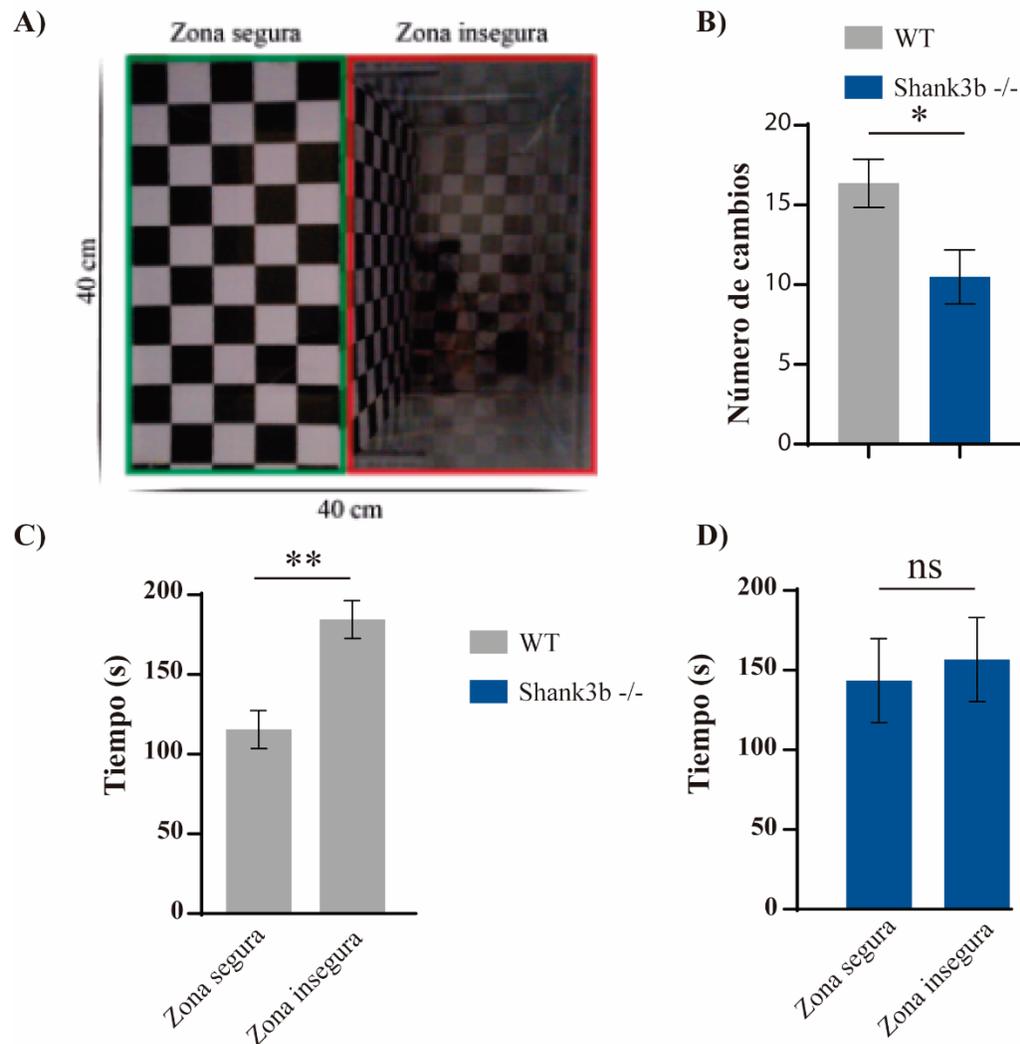


Figura 16. Análisis de datos de la tarea Visual Cliff. **A)** Se delimitó el área de la caja de acrílico en zona segura (verde) y zona insegura (rojo) **B)** Se analizó el número de cambios realizados por los roedores de ambos grupos WT ($n=12$) y $Shank3b^{-/-}$ ($n=10$) mediante una prueba t de muestras no pareadas. **C)** Se analizó el tiempo en segundos que los roedores WT ($n=12$) en la zona segura vs. la zona insegura mediante una prueba t de muestras no pareadas. **D)** Se analizó el tiempo en segundos que los roedores $Shank3b^{-/-}$ ($n=10$) pasaban en la zona segura vs. la zona insegura mediante una prueba t de muestras no pareadas. Se graficó la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y $Shank3b^{-/-}$ se muestran con $*p<0.05$, $**p<0.01$. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

Discriminación de contraste

Los ratones fueron sometidos a la discriminación de 3 contrastes y se evaluó el número de movimientos reflejos de cabeza en respuesta al paso de franjas o reflejo opto-motor (ver métodos) (Figura 17A). Ambos grupos respondieron a todos los contrastes ya que no se buscaba encontrar el umbral en el cual los animales ya no percibieran el estímulo. En las condiciones de máximo contraste, Lambda, no hubo cambios en el reflejo opto-motor entre ambos grupos (WT 12.42 ± 1.5 reflejos, KO 14.7 ± 2.4 reflejos, prueba t no pareada $p=0.43$, $F=1.97$) (Figura 17C).

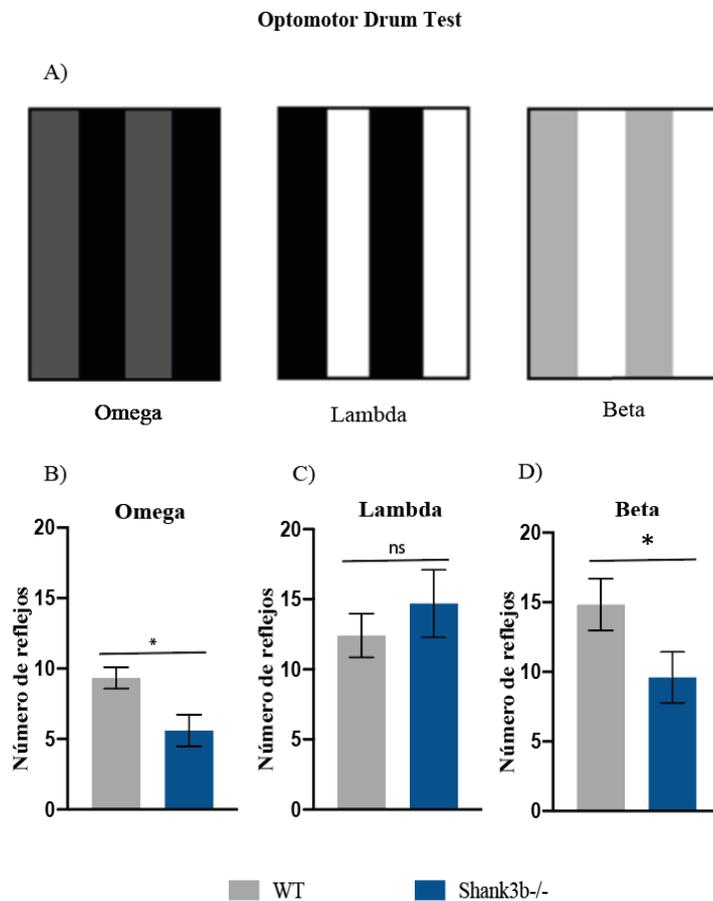


Figura 17. Resultados de la tarea Optomotor Drum Test. Se muestra el número de reflejos realizados por los roedores de ambos grupos WT ($n=12$) y $Shank3b^{-/-}$ ($n=10$) para cada uno de los estímulos **A)** Se utilizaron tres patrones de estímulos que variaban en contraste y se les asignó un nombre a cada uno. **B)** Número de reflejos en la condición Omega. **C)** Número de reflejos en la condición Lambda **D)** Número de reflejos en la condición Beta. En los tres casos se analizaron los datos mediante una prueba t de muestras no pareadas. Se graficó la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y $Shank3b^{-/-}$ se muestran con $*p<0.05$. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

Sin embargo, en los contrastes medios, Omega y Beta, se observó un número de reflejos significativamente menor en ratones KO comparado a ratones WT. En el contraste Beta los ratones WT presentaron 15.9 ± 1.6 reflejos y los ratones Shank3^{-/-} 9.6 ± 1.8 reflejos (prueba t no pareada, $p=0.02$, $F=1.109$) (Figura 17D). De manera similar en el contraste Omega el grupo WT tuvo 9.3 ± 2.6 y el grupo Shank3^{-/-} presentó 5.6 ± 1.18 reflejos (prueba t no pareada, $p=0.013$, $F=1.79$) (Figura 17B). Sugiriendo que existe un déficit en la percepción del contraste en el mutante Shank3b.

Reconocimiento de objeto novedoso

Se aplicó una versión modificada de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. Se realizaron tres fases: familiarización, NOR 1 y NOR 2. En la fase de familiarización se expuso a los sujetos a la arena donde se colocaron dos objetos con la misma forma y color, hubo una tendencia en el grupo KO a explorar menos los objetos sin ser significativo (Figura 18A). En la fase NOR 1 se introdujo un objeto de diferente color y forma y no se observaron diferencias en la exploración de WT y el grupo KO mantuvo la tendencia a explorar menor número de veces ambos objetos (Figura 18B). Las diferencias se observaron en la etapa tres (NOR 2), donde se introdujo un objeto del mismo color, pero diferente forma, en este caso los animales WT exploraron más el objeto novedoso (objeto familiar 2.75 ± 0.6 visitas, objeto novedoso 5.6 ± 1.2 visitas, prueba t no pareada, $p=0.04$, $F=3.43$), mientras que el grupo KO no tuvo diferencias significativas en el número de visitas a ambos objetos (objeto familiar 1.5 ± 0.6 , objeto novedoso 2 ± 0.7 , prueba t no pareada, $p=0.59$, $F=1.68$). Esto significó que los ratones Shank3^{-/-} tuvieron significativamente menos visitas al objeto novedoso (prueba t no pareada, $p=0.02$, $F=3.09$) y en general mostraron menor interés en explorar los objetos, aunque la distancia recorrida durante las pruebas fue similar al grupo WT (prueba t no pareada, $p=0.2052$, $F=1.91$) (Figura 18C). La distancia recorrida por los

ratones en las diferentes fases fue similar para ambos grupos no existiendo diferencias significativas (Figura 19). Estos datos muestran que en una tarea cognitiva que requiere procesamiento visual el modelo de autismo *Shank3*^{-/-} tiene un desempeño deficiente.

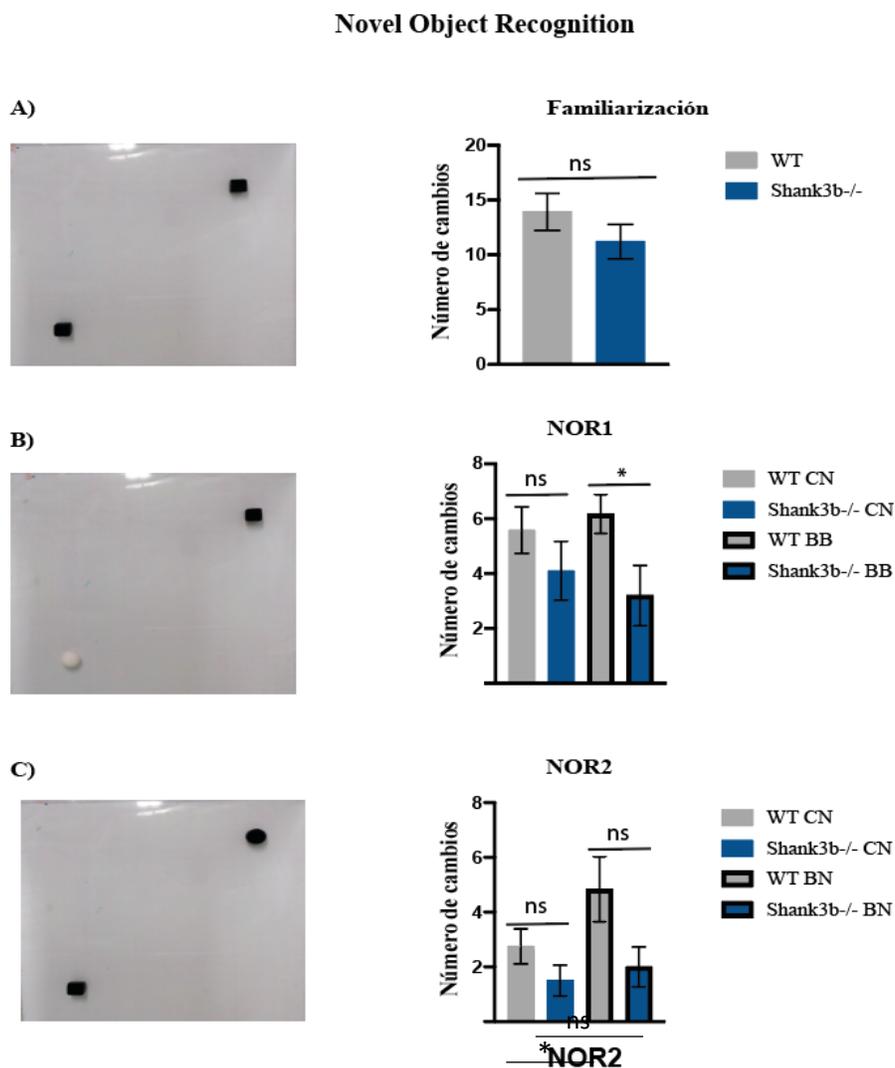


Figura 18. Número de cambios realizados en la tarea de Novel Object Recognition. Se muestra el número de acercamientos a los estímulos de fomi moldeable, realizados por los roedores de ambos grupos WT ($n=12$) y *Shank3b*^{-/-} ($n=10$) en **A)** Fase de familiarización en donde los dos objetos eran cubos negros. **B)** NOR1 en donde se usó un cubo negro (CN) y una esfera blanca (BB) colocados en extremos opuestos de la caja de acrílico. **C)** NOR2 en donde se usaron un cubo negro (CN) y una esfera negra (BN) colocados en extremos opuestos de la caja. En los tres casos se analizaron los datos mediante una prueba t de muestras no pareadas. Se graficó la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y *Shank3b*^{-/-} se muestran con $*p<0.05$. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

Novel Object Recognition

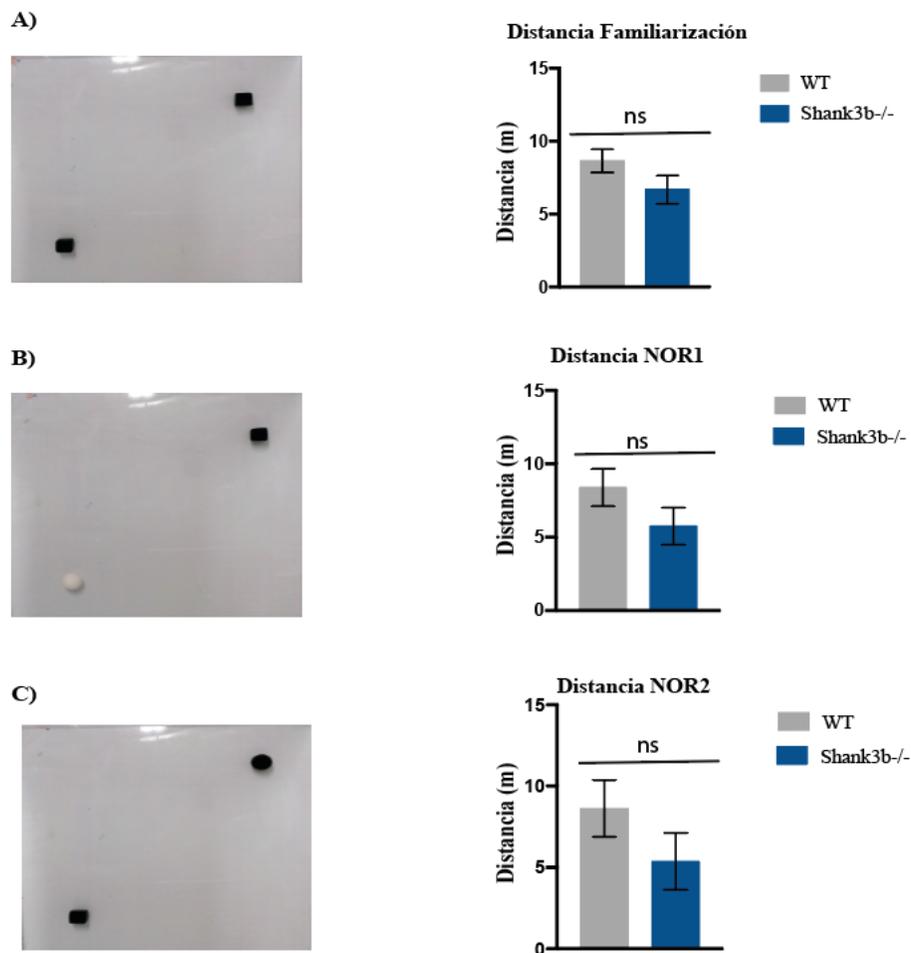


Figura 19. Distancia recorrida en la tarea de Novel Object Recognition. Se muestra la distancia recorrida por los roedores de ambos grupos WT ($n=12$) y Shank3b^{-/-} ($n=10$) en **A)** Fase de familiarización. **B)** NOR1. Y **C)** NOR2. En los tres casos se analizaron los datos mediante una prueba t de muestras no pareadas. Se graficó la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre WT y Shank3b^{-/-}. La ausencia de significancia entre los grupos se muestra como ns.

Discusión

Los trastornos del espectro autista son desordenes con síntomas variados que incluyen una alta prevalencia de déficits sensoriales en las modalidades visual, somatosensorial y auditiva (Cascio, 2010; O'Connor, 2012; Posar & Visconti, 2018). Dichos déficits aparecen desde etapas tempranas, incluso antes de la aparición de las alteraciones conductuales y déficits sociales (Marco et al., 2011; Ouhtit et al., 2014). El establecimiento apropiado de los circuitos neuronales es esencial para las distintas funciones que dependen del sistema nervioso y la retroalimentación sensorial es fundamental para la formación y refinamiento de las vías de procesamiento neuronal. Problemas en el procesamiento temprano de la información podrían contribuir a cambios mal adaptativos en la conectividad de circuitos visuales y asociativos y tener repercusiones a nivel conductual.

El estudio de la vía retinogeniculada en roedores ha cobrado relevancia para entender el establecimiento de la organización topográfica de circuitos neuronales y el refinamiento de conexiones sinápticas específicas en el desarrollo. Las células ganglionares de la retina conectan de manera altamente organizada con neuronas del dLGN ya que las proyecciones de cada ojo se segregan en distintos sectores (Coleman et al., 2009; Reese, 1988). En días postnatales tempranos la conectividad es difusa, hacia la segunda semana de nacimiento cuando el ratón se aproxima a la apertura palpebral los axones del ojo ipsilateral comienzan a concentrarse en la zona central del geniculado mientras que los axones del ojo contralateral se distribuyen alrededor y ocupan una mayor área del núcleo. Dicha segregación es anatómica y funcional y permite la visión monocular y posterior integración de la información (Bauer et al., 2021). En este estudio se analizó la segregación de las aferentes retinales al dLGN, esta es una de las primeras paradas de la información visual en el SNC y en este núcleo se integra y procesan las señales antes de ser enviadas a la corteza. Por primera vez se estudió el refinamiento de las entradas retino-talámicas

en el modelo Shank3 KO, de manera interesante se observaron diferencias durante estadios de la apertura palpebral con un mayor traslape de los axones ipsilaterales y contralaterales. Estos cambios indican que los mecanismos de guía y poda axonal probablemente estén modificados debido a la mutación del gen *Shank3*. Los problemas en el cableado en edades tempranas del desarrollo pueden llevar a una percepción alterada en etapas críticas que afectará la organización de circuitos bottom-up (Gogolla et al., 2014). Alteraciones similares se han observado en el modelo de autismo idiopático BTBR, donde se reporta una disrupción del refinamiento del circuito retino-talámico que empieza en el desarrollo postnatal temprano y continua hasta etapas adultas (Cheng et al., 2017).

La percepción adecuada de estímulos visuales depende de la correcta conexión de los circuitos neuronales involucrados, los cambios anatómicos observados apuntan a déficits a nivel conductual, sin embargo, hasta ahora no existía una caracterización de conductas visuales en el modelo Shank3 KO. Se aplicó una batería de pruebas para evaluar el desempeño de los ratones en tareas guiadas visualmente, observamos que existen déficits en la percepción del contraste, profundidad y en el reconocimiento visual de objetos.

La correcta sensibilidad al contraste es crucial para navegar el mundo y crear perceptos visuales precisos. Una sensibilidad al contraste disminuida sugiere problemas a diferentes niveles del circuito visual ya que el contraste es codificado a nivel talámico y cortical (Crowder et al., 2015; Saalman & Kastner, 2011; Wunderlich et al., 2005). En corteza visual primaria existen neuronas que cambian su actividad eléctrica en función del contraste del estímulo (Crowder et al., 2015). Así mismo, el tálamo responde cuando se presentan franjas de diferentes contrastes (Wunderlich et al., 2005). Cambios en la agudeza visual y percepción al contraste se han observado en otros modelos de autismo incluyendo ratones BTBR y *Fmr1* KO. A diferencia de nuestro

modelo los ratones BTBR presentan mayor agudeza visual y sensibilidad al contraste (Cheng et al., 2017). De igual manera, el modelo de síndrome del X frágil-Fmr1 KO muestra problemas en el procesamiento retinal y percepción de contraste y luminancia (Felgerolle et al., 2019). Los ratones Fmr1 también presentan un desempeño deficiente en la prueba de reflejo opto-motor (Felgerolle et al., 2019). Estos resultados concuerdan con la variabilidad de síntomas que se pueden encontrar en pacientes dependiendo la etiología del TEA. Pacientes con TEA idiopático presentan perfiles de hipersensibilidad visual más frecuentemente mientras que pacientes con Síndrome Phelan-McDermid muestran perfiles de hiporreactividad visual (Tavassoli et al., 2019).

La prueba de profundidad muestra resultados contradictorios, en otros estudios y como parte del comportamiento normal del ratón, los individuos tienden a pasar más tiempo en la zona segura. Sin embargo, los datos de esta tesis muestran que ambos grupos pasaron más tiempo en la zona insegura o más profunda, es probable que haya que ajustar la iluminación del setup conductual para replicar lo encontrado en estudios previos (Felgerolle et al., 2019). Aún con este problema se observaron diferencias significativas en el grupo Shank3-/- presentando un mayor número de cambios de una zona a otra, esto puede deberse a un problema en la percepción de la profundidad o de la luminancia. Los datos indican que los roedores KO no percibían las diferencias entre ambas zonas.

Finalmente, la tarea de reconocimiento de objeto novedoso requiere un procesamiento cognitivo más complejo que incluye memoria y exploración dependiente de la información visual. En esta tarea nos aseguramos de que la información visual fuera la más relevante al poner los diferentes objetos dentro de recipientes transparentes de la misma forma, de esta manera la información somatosensorial no interfirió. Los datos muestran que existe una menor exploración de los objetos similar a lo reportado en el ratón Fmr1-/- (Felgerolle et al., 2019). Cuando se

presenta un objeto novedoso de diferente forma y color los ratones Shank3^{-/-} exploran en menor medida el objeto nuevo. La exploración de un objeto del mismo color y diferente forma fue menor y pareciera que los ratones Shank3^{-/-} pierden interés general en los objetos. Es de notarse que los sujetos experimentales son muy jóvenes (recién destetados) y el procesamiento visual sigue madurando hacia los 30 días postnatales y etapas posteriores (Guido, 2008, 2018; Kerschensteiner & Guido, 2017). Es muy probable que el desempeño observado se derive de problemas visuales y se conjuguen con déficits en aprendizaje y memoria que han sido reportados en este modelo (Jaramillo et al., 2017).

En conjunto nuestros datos son un primer abordaje para entender el papel del sistema visual dentro de la sintomatología del PMS. Este estudio es el primero en caracterizar el desempeño en tareas guiadas visualmente en animales Shank3 KO jóvenes, en el futuro se requiere incrementar el número de experimentos en los distintos paradigmas y mejorar las condiciones de registro. Esta tesis remarca la importancia de estudiar las alteraciones sensoriales a niveles tempranos en el circuito visual ya que muchas veces se da más peso al procesamiento cortical, nuestros datos muestran que los circuitos están afectados desde el primer relevo en el SNC y desde etapas tempranas del desarrollo. De manera interesante los resultados presentados recapitulan algunas de las observaciones en individuos con PMS, donde se ha visto que los pacientes presentan hipofunción de la percepción visual (Tavassoli et al., 2019) y además una amplitud disminuida en el potencial evocado en corteza visual medido a través de EEG que puede deberse a cambios en la conectividad tálamo cortical y a un desbalance excitación/inhibición en el microcircuito (Siper et al., 2022).

Conclusiones

- La organización topográfica de los axones retinales en el tálamo está alterada en el modelo Shank3 KO.
- Existe mayor inervación de la retina en el tálamo visual de ratones Shank3 KO a los 15 y 22 días postnatales.
- El modelo Shank3 KO presenta déficits en la percepción al contraste.
- El modelo Shank3 KO muestra alteraciones en la percepción a la profundidad.
- El modelo Shank3 KO presenta baja exploración de objetos.
- El modelo Shank3 KO presenta déficits en la memoria visual.

Referencias

American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*

(4th ed.). Washington, DC: Author.

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*

(5th ed.). Washington, DC: Author.

Baranek, G. T., David, F. J., Poe, M. D., Stone, W. L., & Watson, L. R. (2006). Sensory Experiences

Questionnaire: Discriminating sensory features in young children with autism, developmental

delays, and typical development. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied*

Disciplines, 47(6), 591–601. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2005.01546.x>

Bauer, J., Weiler, S., Fernholz, M. H. P., Laubender, D., Scheuss, V., Hübener, M., Bonhoeffer, T., &

Rose, T. (2021). Limited functional convergence of eye-specific inputs in the retinogeniculate

pathway of the mouse. *Neuron*, 109(15), 2457-2468.e12.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.036>

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

(Vol. 134, pp. 140–160). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.007>

Behrmann, M., Thomas, C., & Humphreys, K. (2006). Seeing it differently: visual processing in autism.

In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 10, Issue 6, pp. 258–264).

<https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.05.001>

Bogdashina, Olga. (2003). *Sensory Perceptual Issues in Autism and Asperger Syndrome*. Jessica

Kingsley Publishers.

Butchart, M., Long, J. J., Brown, M., McMillan, A., Bain, J., & Karatzias, T. (2017). Autism and Visual

Impairment: a Review of the Literature. *Review Journal of Autism and Developmental Disorders*,

4(2), 118–131. <https://doi.org/10.1007/s40489-016-0101-1>

Cascio, C. J. (2010). Somatosensory processing in neurodevelopmental disorders. *Journal of*

Neurodevelopmental Disorders, 2(2), 62–69. <https://doi.org/10.1007/s11689-010-9046-3>

Cheng, N., Khanbabaei, M., Murari, K., & Rho, J. M. (2017). Disruption of visual circuit formation and refinement in a mouse model of autism. *Autism Research, 10*(2), 212–223.

<https://doi.org/10.1002/aur.1687>

Coleman, J. E., Law, K., & Bear, M. F. (2009). Anatomical origins of ocular dominance in mouse primary visual cortex. *Neuroscience, 161*(2), 561–571.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.045>

Crowder, N. A., van Kleef, J., Dreher, B., Ibbotson, M. ; M. R., van Kleef, J. P., Cloherty, S. L., &

Ibbotson, M. R. (2015). Spatial phase sensitivity of complex cells in primary visual cortex depends on stimulus contrast. *J Neurophysiol, 114*, 3457–3470.

<https://doi.org/10.1152/jn.00431.2015.-Neurons>

Delling, J. P., & Boeckers, T. M. (2021). Comparison of SHANK3 deficiency in animal models:

phenotypes, treatment strategies, and translational implications. In *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. Vol. 13, Issue 1. BioMed Central Ltd.

<https://doi.org/10.1186/s11689-021-09397-8>

Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V.,

Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., & Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research, 5*(3), 160–179.

<https://doi.org/10.1002/aur.239>

Felgerolle, C., Hébert, B., Ardourel, M., Meyer-Dilhet, G., Menuet, A., Pinto-Morais, K., Bizot, J. C.,

Pichon, J., Briault, S., & Perche, O. (2019). Visual Behavior Impairments as an Aberrant Sensory Processing in the Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Frontiers in Behavioral Neuroscience, 13*.

<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00228>

Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., & Nealy, B.

(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>

Fox, M. W. (1965). *The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse.*

[https://doi.org/doi:10.1016/0003-3472\(65\)90040-0](https://doi.org/doi:10.1016/0003-3472(65)90040-0)

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*. Vol. 190, pp. 191–204. Academic Press Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.06.003>

Guido, W. (2008). Refinement of the retinogeniculate pathway. *Journal of Physiology*, 586(18),

4357–4362. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.157115>

Guido, W. (2018). The Mouse Visual System Development, form, and function of the mouse visual

thalamus. *J Neurophysiol*, 120, 211–225. <https://doi.org/10.1152/jn.00651.2017>.-The

Hammer, S., Carrillo, G. L., Govindaiah, G., Monavarfeshani, A., Bircher, J. S., Su, J., Guido, W., & Fox,

M. A. (2014). Nuclei-specific differences in nerve terminal distribution, morphology, and development in mouse visual thalamus. *Neural Development*, 9(1).

<https://doi.org/10.1186/1749-8104-9-16>

Hazen, E. P., Stornelli, J. L., O'Rourke, J. A., Koesterer, K., & McDougle, C. J. (2014). Sensory

symptoms in autism spectrum disorders. In *Harvard Review of Psychiatry* (Vol. 22, Issue 2, pp.

112–124). Lippincott Williams and Wilkins.

<https://doi.org/10.1097/01.HRP.0000445143.08773.58>

Hertz-Picciotto, I., & Delwiche, L. (2009). The rise in autism and the role of age at diagnosis.

Epidemiology, *20*(1), 84–90. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181902d15>

Hodges, H., Fealko, C., & Soares, N. (2020). Autism spectrum disorder: Definition, epidemiology,

causes, and clinical evaluation. In *Translational Pediatrics* (Vol. 9, pp. S55–S65). AME Publishing

Company. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09>

Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Escamilla, C. O., Weaver, T. P., Liu, S., Filonova,

I., & Powell, C. M. (2017). Novel Shank3 mutant exhibits behaviors with face validity for autism

and altered striatal and hippocampal function. *Autism Research*, *10*(1), 42–65.

<https://doi.org/10.1002/aur.1664>

Jaubert-Miazza, L., Green, E., Lo, F. S., Bui, K., Mills, J., & Guido, W. (2005). Structural and functional

composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Visual Neuroscience*,

22(5), 661–676. <https://doi.org/10.1017/S0952523805225154>

Kern, J. K., Trivedi, M. H., Garver, C. R., Grannemann, B. D., Andrews, A. A., Savla, J. S., Johnson, D.

G., Mehta, J. A., & Schroeder, J. L. (2006). The pattern of sensory processing abnormalities in autism. *Autism, 10*(5), 480–494. <https://doi.org/10.1177/1362361306066564>

Kerschensteiner, D., & Guido, W. (2017). Organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. In *Visual neuroscience* (Vol. 34, p. E008). <https://doi.org/10.1017/S0952523817000062>

Kretschmer, F., Kretschmer, V., Kunze, V. P., & Kretzberg, J. (2013). OMR-arena: Automated measurement and stimulation system to determine mouse visual thresholds based on optomotor responses. *PLoS ONE, 8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078058>

Kretschmer, F., Sajgo, S., Kretschmer, V., & Badea, T. C. (2015). A system to measure the Optokinetic and Optomotor response in mice. *Journal of Neuroscience Methods, 256*, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.08.007>

Lamb, T. D. (2016). Why rods and cones? *Eye (Basingstoke), 30*(2), 179–185. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.236>

Larsson, M. (2013). The optic chiasm: A turning point in the evolution of eye/hand coordination. In *Frontiers in Zoology* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-41>

Li, N., & Gu, Y. (2020). The Visual Pathway for Binocular Integration. *Neuroscience Bulletin*, 36(9), 1089–1091. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00506-6>

Liang, L., & Chen, C. (2020). *Annual Review of Vision Science Organization, Function, and Development of the Mouse Retinogeniculate Synapse*. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-121219>

Little, J. A. (2018). Vision in children with autism spectrum disorder: a critical review. In *Clinical and Experimental Optometry* (Vol. 101, Issue 4, pp. 504–513). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cxo.12651>

Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* (Vol. 56, Issue 6, pp. 466–474). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>

Marco, E. J., Hinkley, L. B. N., Hill, S. S., & Nagarajan, S. S. (2011). Sensory processing in autism: A review of neurophysiologic findings. *Pediatric Research*, 69(5 PART 2). <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182130c54>

- Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: Roles at the synapse and in autism spectrum disorder. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 3, pp. 147–157). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
- Oberman, L. M., Boccuto, L., Cascio, L., Sarasua, S., & Kaufmann, W. E. (2015). Autism spectrum disorder in Phelan-McDermid syndrome: Initial characterization and genotype-phenotype correlations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0323-9>
- O'Connor, K. (2012). Auditory processing in autism spectrum disorder: A review. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 36, Issue 2, pp. 836–854). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.11.008>
- Ouhtit, A., Al-Farsi, Y., Al-Sharbati, M., Waly, M., Gupta, I., Al-Farsi, O., Al-Khaduri, M., Al-Shafae, M., & Al-Adawi, S. (2014). Underlying Factors Behind the Low Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Oman Sociocultural perspective. *Sultan Qaboos Univ Med J*, *15*(2), 213–217.
- Oviedo, N., Manuel-Apolinar, L., de la Chesnaye, E., & Guerra-Araiza, C. (2015). Aspectos genéticos y neuroendocrinos en el trastorno del espectro autista. In *Boletín Médico del Hospital Infantil de*

Mexico (Vol. 72, Issue 1, pp. 5–14). Masson-Doyma Mexico, S.A.

<https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2015.01.010>

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>

Phelan, K., Curtis Rogers, R., & Boccutto, L. (2005). *Phelan-McDermid Syndrome Deletion 22q13*

Syndrome.

Phelan, K., & McDermid, H. E. (2012). The 22q13.3 deletion syndrome (Phelan-McDermid

syndrome). *Molecular Syndromology*, 2(3–5), 186–201. <https://doi.org/10.1159/000334260>

Posar, A., & Visconti, P. (2018). Sensory abnormalities in children with autism spectrum disorder. In

Jornal de Pediatria (Vol. 94, Issue 4, pp. 342–350). Elsevier Editora Ltda.

<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.08.008>

Reese, B. E. (1988). 'Hidden lamination' in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional

organization of this thalamic region in the rat. *Brain Research Reviews*, 13(2), 119–137.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0173\(88\)90017-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-0173(88)90017-3)

Robertson, C., & Baron-Cohen, S. (2017). Sensory perception in autism. *Nature Reviews*

Neuroscience, 18, 671–684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrn.2017.112>

Robinson, E. B., Lichtenstein, P., Anckarsäter, H., Happé, F., & Ronald, A. (2013). Examining and

interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 110(13), 5258–5262.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1211070110>

Saalmann, Y. B., & Kastner, S. (2011). Cognitive and Perceptual Functions of the Visual Thalamus.

Neuron (Vol. 71, Issue 2, pp. 209–223). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.027>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S.,

Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K.,

Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis.

In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Seabrook, T. A., Burbridge, T. J., Crair, M. C., & Huberman, A. D. (2017). *Architecture, Function, and*

Assembly of the Mouse Visual System. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714>

Simmons, D. R., Robertson, A. E., McKay, L. S., Toal, E., McAleer, P., & Pollick, F. E. (2009). Vision in autism spectrum disorders. *Vision Research* (Vol. 49, Issue 22, pp. 2705–2739).

<https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.08.005>

Siper, P. M., Rowe, M. A., Guillory, S. B., Rouhandeh, A. A., George-Jones, J. L., Tavassoli, T., Lurie, S., Zweifach, J., Weissman, J., Foss-Feig, J., Halpern, D., Pilar Trelles, M., Mulhern, M. S.,

Brittenham, C., Gordon, J., Zemon, V., Buxbaum, J. D., & Kolevzon, A. (2022). *Visual Evoked Potential Abnormalities in Phelan-McDermid Syndrome*.

<https://doi.org/10.1016/j.jaac.2021.07.006>

Spencer, J., O'Brien Justin, Riggs, K., Braddick, O., Atkinson, J., & Wattam-Bell, J. (2000). *Motion processing in autism: evidence for a dorsal stream deficiency* (Vol. 11).

<http://journals.lww.com/neuroreport>

Stevenson, R. A., Segers, M., Ferber, S., Barense, M. D., & Wallace, M. T. (2014). The impact of multisensory integration deficits on speech perception in children with autism spectrum disorders. *Frontiers in Psychology*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00379>

Tavassoli, T., Brandes-Aitken, A., Chu, R., Porter, L., Schoen, S., Miller, L. J., Gerdes, M. R., Owen, J.,

Mukherjee, P., & Marco, E. J. (2019). Sensory over-responsivity: Parent report, direct

assessment measures, and neural architecture. *Molecular Autism*, *10*(1).

<https://doi.org/10.1186/s13229-019-0255-7>

Thye, M. D., Bednarz, H. M., Herringshaw, A. J., Sartin, E. B., & Kana, R. K. (2018). The impact of

atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. In

Developmental Cognitive Neuroscience (Vol. 29, pp. 151–167). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2017.04.010>

Vandenbroucke, M. W. G., Scholte, H. S., van Engeland, H., Lamme, V. A. F., & Kemner, C. (2008). A

neural substrate for atypical low-level visual processing in autism spectrum disorder. *Brain*,

131(4), 1013–1024. <https://doi.org/10.1093/brain/awm321>

Walensky, R. P., Bunnell, R., Layden, J., Kent, C. K., Gottardy, A. J., Leahy, M. A., Martinroe, J. C.,

Spriggs, S. R., Yang, T., Doan, Q. M., King, P. H., Starr, T. M., Yang, M., Jones, T. F., Timothy

Jones, C. F., Matthew Boulton, C. L., Carolyn Brooks, M., Jay Butler, M. C., Caine, V. A., ... Yang,

W. (2021). *Morbidity and Mortality Weekly Report Prevalence and Characteristics of Autism*

Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years-Autism and Developmental Disabilities

Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018 Surveillance Summaries Centers for Disease

Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff (Serials) MMWR Editorial Board.

Wang, S., Jiang, M., Duchesne, X. M., Laugeson, E. A., Kennedy, D. P., Adolphs, R., & Zhao, Q. (2015).

Atypical Visual Saliency in Autism Spectrum Disorder Quantified through Model-Based Eye

Tracking. *Neuron*, 88(3), 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.042>

Wazana, A., Bresnahan, M., & Kline, J. (2007). The autism epidemic: Fact or artifact? *Journal of the*

American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 46(6), 721–730.

<https://doi.org/10.1097/chi.0b013e31804a7f3b>

Wunderlich, K., Schneider, K. A., & Kastner, S. (2005). *Neural Correlates of Binocular Rivalry in the*

Human Lateral Geniculate Nucleus NIH Public Access.

Zachi, E. C., Costa, T. L., Barboni, M. T. S., Costa, M. F., Bonci, D. M. O., & Ventura, D. F. (2017). Color

vision losses in autism spectrum disorders. *Frontiers in Psychology*, 8(JUN).

<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.01127>

Zeidan, J., Fombonne, E., Scolah, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., &

Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism*

Research : Official Journal of the International Society for Autism Research.

<https://doi.org/10.1002/aur.26>

