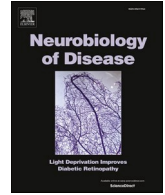




Listas de contenidos disponibles en ScienceDirect

## Neurobiología de la enfermedad

Página web de la revista: [www.elsevier.com/locate/ynbdi](http://www.elsevier.com/locate/ynbdi)

## *Shank3B*<sup>-/-</sup> Fisiopatología: el tratamiento temprano con metformina revierte los déficits conductuales y normaliza la traducción exacerbada del ARNm

Laura Marsal-García <sup>a,1</sup>, Jung-Hyun Choi <sup>a,b,1</sup>, Eve Peraldi <sup>a</sup>, Pei You Wu <sup>c</sup>, Cong Loc Dang <sup>c</sup>, R. Anne McKinney <sup>c</sup>, Ilse Gantois <sup>a,\*</sup>, Nahum Sonenberg <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Goodman contra el Cáncer, Universidad McGill, Montreal, Quebec H3A 1A3, Canadá

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional de Chungbuk, Cheongju 28644, República de Corea

<sup>c</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica, Universidad McGill, Montreal, Quebec H3G 0B1, Canadá

### INFORMACIÓN DE LA REVISIÓN

#### Palabras clave

Síndrome de Phelan-McDermid  
Modelo de ratón *Shank3* KO  
Metformina  
Trastorno del espectro autista  
Aprendizaje y memoria  
mTORC1  
MAPK/ERK

### RESUMEN

El síndrome de Phelan-McDermid (PMS), un trastorno neurológico del desarrollo poco frecuente asociado al trastorno del espectro autista y a la discapacidad intelectual, está causado por deleciones en el cromosoma humano 22q13 o por mutaciones en el gen SH3 y múltiples dominios de repetición de ankirina 3 (*SHANK3*). El PMS es muy debilitante y los tratamientos existentes son ineficaces. El SHANK3 interactúa con al menos tres receptores sinápticos a través de proteínas asociadas a la sinapsis, algunas de las cuales se encuentran aguas arriba de las vías de señalización del complejo 1 de la diana mecánica de la rapamicina en mamíferos (mTORC1) y de la proteína quinasa activada por mitógenos/quinasa regulada por señales extracelulares (MAPK/ERK). Se ha demostrado que la metformina, un inhibidor de las vías de señalización mTORC1 y MAPK/ERK, corrige los fenotipos centrales en un modelo de ratón con síndrome de X frágil, lo que ofrece un potencial terapéutico para el PMS. Los ratones machos *Shank3B*<sup>-/-</sup>, un modelo de ratón con PMS, y los ratones de tipo salvaje fueron tratados desde el nacimiento con metformina (5 mg/ml) o un vehículo. Los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> mostraron un aumento del acicalamiento, una disminución de la interacción social, una reducción de la duración y la frecuencia de las vocalizaciones ultrasónicas y un deterioro de la memoria dependiente del hipocampo. Se observó una actividad regulada al alza de mTORC1 en el hipocampo y la corteza prefrontal, junto con una disminución de la expresión de la proteína sináptica en el estriado de GluN2B (un N-metil-

Subunidad del receptor D-aspartato (NMDAR), Homer1 (una proteína asociada a la sinapsis) y GluA2 (una subunidad del receptor de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-droxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA)), todas las cuales interactúan con Shank3. El tratamiento con metformina desde el nacimiento corrigió el

El tratamiento con metformina desde el nacimiento corrigió las deficiencias conductuales fundamentales, la traducción exagerada del ARNm y la disminución de la expresión de la proteína sináptica estriatal. Teniendo en cuenta su excepcional perfil de seguridad, la metformina es una opción terapéutica prometedora para una rápida traducción clínica del tratamiento del SPM.

## 1. Introducción

El síndrome de Phelan-McDermid (PMS) es un trastorno neurológico del desarrollo poco frecuente que afecta aproximadamente a una de cada 10 000 personas (Fundación del Síndrome de Phelan-McDermid, 2025). Está causado por una deleción de la porción distal del cromosoma 22q13 o una mutación/deleción del gen SH3 y múltiples dominios de repetición de ankirina 3 (*SHANK3*) (Phelan et al., 2022). La enfermedad se manifiesta por retraso en el desarrollo, trastornos del habla e hipotonía neonatal (Cammarata-Scalisi et al., 2022). La mayoría de los niños (80 %) presentan un trastorno del espectro autista (TEA)

y el 77 % sufre discapacidad intelectual (DI) de moderada a grave (Cammarata-Scalisi et al., 2022).

El TEA es un trastorno del desarrollo neurológico prevalente que se diagnostica en uno de cada 36 niños de 8 años en los Estados Unidos, según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, con una tasa de incidencia cuatro veces mayor en los varones que en las mujeres (Maenner et al., 2023). Las características principales del TEA son los déficits en la comunicación social y los comportamientos repetitivos (Asociación Americana de Psiquiatría, 2013). Las afecciones asociadas son trastornos del sueño y del estado de ánimo, ansiedad, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), convulsiones y discapacidad intelectual (Asociación Americana de Psiquiatría, 2013).

\* Autores correspondientes.

Direcciones de correo electrónico: [laura.marsalgarcia@mail.mcgill.ca](mailto:laura.marsalgarcia@mail.mcgill.ca) (L. Marsal-García), [junghyun@cbnu.ac.kr](mailto:junghyun@cbnu.ac.kr) (J.-H. Choi), [eve.peraldi@mail.mcgill.ca](mailto:eve.peraldi@mail.mcgill.ca) (E. Peraldi), [pei.y.wu@mail.mcgill.ca](mailto:pei.y.wu@mail.mcgill.ca) (P.-Y. Wu), [cong.l.dang@mail.mcgill.ca](mailto:cong.l.dang@mail.mcgill.ca) (C.L. Dang), [anne.mckinney@mcgill.ca](mailto:anne.mckinney@mcgill.ca) (R.A. McKinney), [ilse.gantois@mcgill.ca](mailto:ilse.gantois@mcgill.ca) (I. Gantois), [nahum\\_sonenberg@mcgill.ca](mailto:nahum_sonenberg@mcgill.ca) (N. Sonenberg).

<sup>1</sup> Estos autores contribuyeron por igual a este trabajo.

<sup>2</sup> Estos autores contribuyeron por igual a la supervisión de este trabajo.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2025.107217>

Recibido el 30 de octubre de 2025; recibido en su forma revisada el 28 de noviembre de 2025; aceptado el 3 de diciembre de 2025

Disponible en línea el 4 de diciembre de 2025

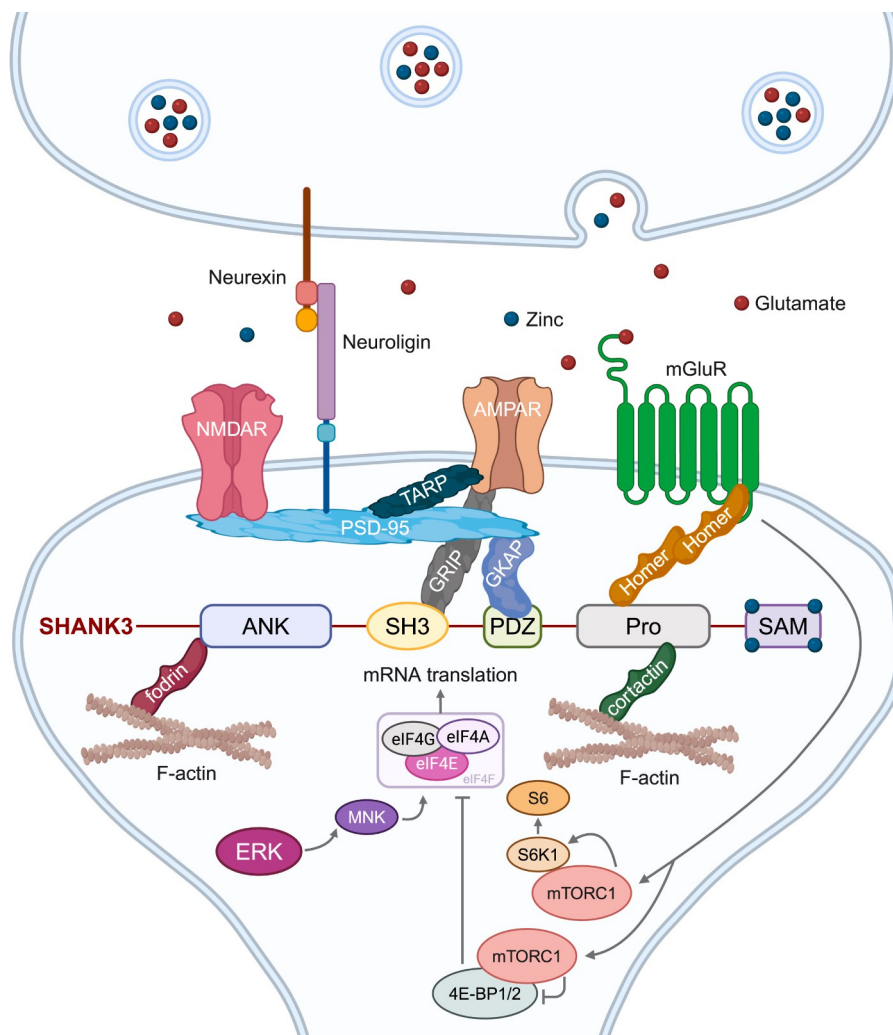
0969-9961/© 2025 Los autores. Publicado por Elsevier Inc. Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY-NC (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

La memoria desempeña un papel crucial en la formación de relaciones sociales, ya que enriquece el material conversacional con recuerdos personales, lo que hace que las interacciones sean fiables y empáticas (Bluck, 2003). Las deficiencias en la memoria exacerbaban los síntomas del síndrome premenstrual (SPM) y del trastorno del espectro autista (TEA) (Desaunay et al., 2020). Se han descrito deterioros de la memoria en pacientes con PMS en comparación con controles y personas con TEA idiopático durante la presentación posterior al cambio de una tarea de comparación visual (Guillory et al., 2021).

SHANK3 es un miembro de la familia de proteínas de andamiaje sináptico SHANK, que también incluye SHANK1 y 2 (Sheng y Kim, 2000). Reside en las sinapsis excitatorias y contiene cinco dominios conservados (fig. 1): repetición de ankirina (ANK), homología Src-3 (SH3), densidad postsináptica 95/Discs large/Zonula occludens-1 (PDZ), rico en prolina (Pro) y el motivo alfa estéril (SAM) (Delling y Boeckers, 2021; Sheng y Kim, 2000). Los dominios interactúan con los filamentos de actina a través de la  $\alpha$ -fodrina y la cortactina, y con diversos receptores a través de la sinapsis asociada. proteínas: Homer, proteína asociada a la guanilato quinasa (GKAP), proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) y proteína interactora del receptor de glutamato (GRIP), para mantener la función y la estructura de la sinapsis (Sheng y Kim, 2000; Urrutia-Ruiz et al., 2022). Algunos de los

receptores son receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) aguas arriba de las vías de señalización del complejo 1 de la diana mecánica de la rapamicina en mamíferos (mTORC1) y de la proteína quinasa activada por mitógenos/quinasa regulada por señales extracelulares (MAPK/ERK) (Gallagher et al., 2004; Krapivinsky et al., 2003; Santini y Klann, 2014).

SHANK3 desempeña un papel clave en la transmisión sináptica, la maduración de las espinas dendríticas, la organización del citoesqueleto y el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo (Durand et al., 2012; Kouser et al., 2013; Wang et al., 2014). Más allá de su función postsináptica bien establecida, SHANK3 también influye en la función presináptica a través de la señalización transsináptica Neurexina-Neuroigina (Arons et al., 2012), lo que subraya su importancia en la comunicación sináptica bidireccional. Además de su función principal en las sinapsis excitatorias, pruebas recientes destacan su importante contribución a las interacciones entre neuronas y oligodendrocitos. SHANK3 se expresa en los oligodendrocitos y contribuye a su maduración y mielinización (Ma et al., 2025), procesos que dependen del glutamato liberado por las neuronas. La mielinización adecuada es esencial para la función neuronal y la conductividad axonal, y la deficiencia de SHANK3 se ha asociado con la sustancia blanca.



**Fig. 1.** Representación esquemática de la conexión hipotética entre SHANK3 y la traducción del ARNm. SHANK3 desempeña un papel fundamental en el desarrollo sináptico y la función cerebral y contiene cinco dominios conservados para interactuar con proteínas asociadas a las sinapsis. Los dominios desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal son un dominio ANK , que interactúa con los filamentos de actina a través de la  $\alpha$ -fodrina. Un dominio SH3 media la unión al AMPAR a través de GRIP. Un dominio PDZ se une a GKAP, que interactúa con PSD-95 y, en consecuencia, con NMDAR, neuroligina y AMPAR. Un dominio Pro une mGluR con filamentos de actina a través de Homer y cortactina. proteínas. Un dominio SAM participa en la polimerización de las moléculas Shank de forma dependiente del zinc. SHANK3 afecta a los receptores situados aguas arriba de las vías de señalización mTORC1 y MAPK/ERK, como los mGluR y los NMDAR.

Anomalías en la materia tanto en pacientes con PMS como en modelos murinos (Fischer et al., 2024; Jesse et al., 2020; Malara et al., 2022). Estos hallazgos muestran que SHANK3 contribuye al funcionamiento de los circuitos neuronales no solo a través de mecanismos sinápticos, sino también al favorecer la comunicación axón-glial y la integridad de la mielina.

Según Ensembl, SHANK3 existe en 12 variantes de transcripción en humanos y 10 en ratones, debido al uso alternativo de promotores y al empalme (Ensembl, 2025). SHANK3 muestra patrones de expresión dispares en las regiones cerebrales y los tipos de células de los ratones, y se regula de forma diferente en las etapas de desarrollo y la actividad neuronal (Wang et al., 2014). Las isoformas difieren en su localización subcelular y en su impacto en la densidad y la longitud de las espinas dendríticas. Las mutaciones y delecciones en SHANK3 provocan anomalías en la señalización sináptica y la plasticidad, que subyacen a los déficits de comportamiento en el PMS (Cammarata-Scalisi et al., 2022).

Las aberraciones de SHANK3 se encuentran en el 1-2 % de los pacientes con TEA y hasta en

El 2 % de los pacientes con DI, lo que la convierte en una de las causas monogénicas comunes

del TEA y la DI (Cammarata-Scalisi et al., 2022; Leblond et al., 2014).

Cinco modelos establecidos de ratones knockout (KO) *Shank3* recapitulan las características clínicas observadas en el PMS y el TEA: deficiencias en la interacción social, comportamiento repetitivo, ansiedad, epilepsia y deficiencias en la memoria (Delling y Boeckers, 2021; Peça et al., 2011). Se ha estudiado la memoria a corto y largo plazo en estos modelos, obteniéndose resultados contradictorios por varias razones: diferentes antecedentes genéticos, edad de los ratones y protocolos de comportamiento variables (Cope et al., 2023; Dhamne et al., 2017; Jaramillo et al., 2016). En este estudio, utilizamos el modelo de ratón *Shank3B*<sup>-/-</sup> (Peça et al., 2011), en el que se han eliminado los exones 13 a 16 del gen *Shank3*, lo que ha provocado la pérdida del dominio PDZ y la alteración de las isoformas de Shank3 que contienen este dominio. Estos ratones muestran un aumento del acicalamiento, déficits en la interacción social, hipomovilidad, disminución de la frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas (USV) y alteraciones en las neuronas espinosas medianas (MSN) y en la composición de la densidad postsináptica en el estriado (Dhamne et al., 2017; Pagani et al., 2019; Peça et al., 2011).

Se investigaron el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) y la insulina como posibles tratamientos para el PMS (Kolevzon et al., 2022; Zwanenburg et al., 2016). La administración de IGF-1 corrigió la señalización AMPA, la potenciación a largo plazo y el rendimiento motor en un modelo de ratón con PMS, y restauró la transmisión sináptica excitatoria en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas de pacientes con PMS (Bozdagi et al., 2013; Shcheglovitov et al., 2013). En consecuencia, la inyección subcutánea de IGF-1 mejoró el comportamiento repetitivo y la hiperactividad en niños de 5 a 15 años, mientras que la insulina intranasal generó mejoras en las habilidades sociales y la cognición solo en niños mayores de tres años (Kolevzon et al., 2022; Zwanenburg et al., 2016). El alto coste, la accesibilidad limitada y la necesidad de inyectar IGF-1, junto con el efecto secundario de la hipoglucemia relacionado con la insulina, limitan su utilidad, lo que pone de relieve la necesidad de alternativas más accesibles (Amiel, 2021; Cammarata-Scalisi et al., 2022; Kolevzon et al., 2022).

La eficacia demostrada de la señalización de la insulina para tratar el síndrome premenstrual nos llevó a examinar la metformina, un fármaco aprobado por la FDA para la diabetes tipo 2, como fármaco terapéutico. La metformina suprime las vías mTORC1 y MAPK/ERK, que a menudo se hiperactivan en trastornos con una alta incidencia de TEA (Gantois et al., 2019). Gantois et al. informaron de que la administración crónica de metformina disminuía la fosforilación de MAPK/ERK y del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E), y corregía los fenotipos centrales en el modelo murino del síndrome de X frágil (FXS), como el comportamiento repetitivo y la interacción social (Gantois et al., 2017). El momento de la administración de la metformina desempeña un papel fundamental en la modulación de las vías de señalización. Concretamente, el tratamiento con metformina iniciado al nacer en el modelo murino de FXS, pero no en la edad adulta, rescató la señalización mTORC1 (Choi et al., 2024; Gantois et al., 2017). En cuanto al modelo murino de FXS, los estudios en modelos murinos *Shank3* KO informaron de un aumento de la síntesis de proteínas cerebrales y de la actividad mTORC1 (Mencer et al., 2021; Torossian et al., 2021). Dados los prometedores resultados, la metformina se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del FXS (Biag et al., 2019; Dy et al., 2018; EE. UU.

Biblioteca Nacional de Medicina, 2025).

Este estudio describe comportamientos similares al autismo, deterioro de la memoria y aumento de la señalización mTORC1 en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>. La administración de metformina desde el nacimiento corrigió los trastornos del comportamiento y normalizó la vía mTORC1 y las proteínas sinaptosomales estriatales. En conjunto, estos hallazgos deberían impulsar el desarrollo de tratamientos eficaces y accesibles para el PMS.

## 2. Métodos

### 2.1. Ratones y tratamiento

Se utilizaron ratones machos WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> con fondo C57BL/6J (Jackson Laboratories, *Shank3*<sup>m2G<sup>fling</sup></sup>, catálogo n.º 017688) (Peça et al., 2011). Los ratones homocigotos WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> se criaron por separado, y la descendencia se generó a partir de parejas reproductoras del mismo genotipo. Por lo tanto, los ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> utilizados en este estudio no eran de la misma camada. Los ratones se alojaron en grupos de hasta cinco por jaula (jaula de plexiglás de 19,1 cm × 29,2 cm × 12,7 cm, Allentown) con lecho de mazorca de maíz Teklad (Envigo) y un cuadrado de material para nidos (Nestlets, Ancare), sin enriquecimiento ambiental adicional. Los animales tenían acceso ad libitum a la comida (Teklad irradiada sin proteína de soja global) y agua, y se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura (20-21 °C) y humedad (55 %) y ciclos de 12 h:12 h de luz-oscuridad (7:00-19:00 h, periodo de luz) en una instalación específica instalación libre de patógenos (SPF).

Se administró metformina (5 mg/ml, Sigma-Aldrich, 317240) o vehículo (agua) diariamente a partir de un día después del nacimiento. Antes del destete, los ratones recibieron metformina a través de la leche materna de sus respectivas madres, que recibieron metformina a través del agua potable (Hale et al., 2002). Aunque esto da lugar a una menor exposición durante el periodo de lactancia, en consonancia con la relación leche-plasma de 0,35 en los seres humanos, este enfoque garantiza que el tratamiento comience en una fase temprana del desarrollo. Después del destete, los ratones fueron tratados con metformina o vehículo directamente a través del agua potable. Esta dosificación se eligió basándose en Memmott et al., quienes informaron de que los ratones que recibían 5 mg/ml alcanzaban una concentración plasmática de 1,70 µg/mL, lo que corresponde a las concentraciones en estado estacionario en humanos (0,5-2 µg/mL) (Memmott et al., 2010). Los ratones se asignaron a grupos de vehículo o metformina al nacer, con asignaciones equilibradas para obtener grupos de tamaño similar.

El personal cualificado supervisó a los ratones al menos una vez por semana para evaluar su salud general y su bienestar antes, durante y después de los experimentos. Los procedimientos siguieron las directrices del Consejo Canadiense para el Cuidado de los Animales y fueron aprobados por la Universidad McGill.

### 2.2. Pruebas de comportamiento

Antes de comenzar las pruebas de comportamiento, los ratones fueron trasladados a una instalación convencional para animales y se les permitió aclimatarse durante al menos una semana para minimizar el estrés ambiental. Para reducir aún más el estrés relacionado con la manipulación, los ratones fueron manipulados durante tres días consecutivos durante un minuto cada día. Las pruebas se llevaron a cabo por la mañana durante el ciclo de luz, salvo que se indique lo contrario. Los ratones se aclimataron a la sala de pruebas de comportamiento durante al menos 30 minutos antes de cada prueba, y durante un mínimo de 1 hora para el ensayo de tres cámaras. Durante las pruebas de comportamiento, el orden de los ratones se intercaló entre los grupos de genotipos y tratamientos para minimizar los efectos del orden. Entre cada ratón, cada objeto o aparato de prueba se limpió con Versa-Clean (Fisher Scientific). Las pruebas y la puntuación se realizaron de forma ciega. Se utilizaron las mismas cohortes de ratones para las pruebas de campo abierto, NOL y NOR, que se realizaron de forma secuencial y luego se combinaron para su análisis. Todas las demás pruebas de comportamiento se realizaron en grupos separados de ratones, con una cohorte por prueba, excepto la prueba de tres cámaras, que se evaluó en dos cohortes independientes.

### 2.2.1. Prueba de acicalamiento

Se llenó una jaula de plexiglás (19,1 cm × 29,2 cm × 12,7 cm) sin válvula, similar a la jaula doméstica, con aproximadamente 1 cm de material de cama fresco (Teklad CornCob Bedding, Envigo), pero sin material para construir nidos, como se ha descrito anteriormente (Huang et al., 2024). Todas las pruebas se grabaron con una cámara situada frente a la jaula. Los ratones (machos de entre 8 y 10 semanas) se colocaron en la jaula de plexiglás durante 20 minutos. Los primeros 10 minutos se consideraron la fase de habituación, mientras que el tiempo restante se utilizó para los datos de acicalamiento. El comportamiento de acicalamiento se analizó como el tiempo dedicado al acicalamiento y el número de sesiones de acicalamiento. Se considera episodio de acicalamiento cualquier instancia de actividad de acicalamiento, independientemente de si el ratón completa algunas o las cuatro etapas del acicalamiento (desde el lamido inicial de las patas alrededor de la nariz y los bigotes hasta el acicalamiento del cuerpo y la cola) (Kalueff et al., 2015). La puntuación se realizó manualmente utilizando un cronómetro. Los datos se analizaron con un ANOVA bidireccional seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

### 2.2.2. Prueba de sociabilidad en tres cámaras y preferencia por la novedad social

Se utilizó un aparato de plexiglás de tres cámaras compuesto por una cámara central (36 cm × 28 cm × 30 cm) separada de dos cámaras laterales (cada una de 29 cm × 28 cm × 30 cm) por paredes de plexiglás (Stoelting Co.), tal y como se ha descrito anteriormente (Rein et al., 2020). Las cámaras estaban interconectadas a través de puertas, cada una de ellas equipada con una puerta corredera extraíble. Además, se colocó una jaula de alambre en cada cámara lateral para albergar un estímulo. Todas las pruebas se grabaron con una cámara cenital para su posterior análisis. En cada fase del experimento, el ratón de prueba (macho de 9 a 11 semanas) se colocó en la cámara central y, al abrir las puertas, se le permitió al ratón explorar libremente durante 10 minutos. La prueba El ratón fue devuelto a su jaula durante un descanso de 5 minutos entre cada fase. Durante la fase de habituación, las jaulas de alambre de las cámaras laterales se dejaron vacías. En la fase previa a la prueba, se colocó una sola bola de papel en cada jaula de alambre para que el ratón se acostumbrara a la presencia de un objeto en su interior. Posteriormente, en la fase de preferencia social, una jaula de alambre albergaba un estímulo social (Extraño 1), mientras que la jaula de alambre opuesta contenía un estímulo no social (un cubo de madera morado). En la fase final (novedad social), el estímulo no social se sustituyó por un ratón nuevo (Extraño 2); así, el estímulo social inicial, Extraño 1, se convirtió en el ratón familiar. Los ratones extraños utilizados como estímulos eran ratones C57BL/6 J de la misma edad, sexo y peso corporal. Las jaulas de alambre que contenían al Extraño 1 o al objeto se alternaron entre los ratones de prueba para garantizar la variabilidad. El tiempo dedicado a olfatear las jaulas de alambre se puntuó manualmente con un cronómetro. La exploración se puntuó cuando el ratón orientó su nariz hacia la copa de alambre con una investigación activa (olfateando, tocando o inspeccionando de cerca), según la evaluación visual del experimentador. El índice de preferencia social se determinó por la cantidad de tiempo dedicado a explorar el estímulo social en comparación con el tiempo total dedicado a explorar ambos estímulos. El índice de novedad social se evaluó en función del tiempo dedicado a explorar al ratón Extraño 2 en relación con el tiempo total dedicado a explorar a ambos ratones extraños. Se aplicó un criterio de exclusión de un tiempo mínimo de exploración de 20 s, como se ha descrito anteriormente (Leger et al., 2013).

Los datos se analizaron con un ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

### 2.2.3. Prueba de vocalización ultrasónica

Se utilizaron como estímulos hembras WT de la misma edad y con el mismo origen C57BL/6 J que el ratón macho de prueba (de entre 7 y 11 semanas de edad). La mañana de la prueba de vocalización ultrasónica (USV), se tomaron frotis vaginales de cada hembra. Se tomaron muestras de estímulo para determinar su estado en el ciclo estral sujetándolas por la cola y recogiendo una muestra vaginal con un bastoncillo de algodón previamente empapado en PBS. Las muestras se tiñeron con cristal violeta (1 minuto en cristal violeta y 1 minuto en agua bidestilada, tres veces cada una), se dejaron secar y se analizaron al microscopio. Solo las hembras en celo completo (células epiteliales escamosas predominantemente cornificadas que se encuentran en grupos densamente agrupados) fueron seleccionadas como estímulos (McLean et al., 2012). Después de eso, se instaló una jaula limpia con aproximadamente 1,5 cm de material de cama con una rejilla, pero sin tapa, en una cámara aislada con un

micrófono ultrasónico (micrófono ultrasónico de condensador Avisoft-UltraSoundGate CM16/CMPA; Avisoft Bioacoustics) suspendido a 20 cm por encima de la jaula. Se introdujo al ratón macho de prueba en la jaula y, tras 10 minutos de habituación, se introdujo en la jaula una hembra en pleno celo. A continuación, se dejó que los dos ratones interactuaran durante 5 minutos mientras se grababa la interacción con el software Avisoft-RECORDER (versión 4.2.27; Avisoft Bioacoustics; RRID:SCR\_014436). Se utilizó una jaula nueva para cada ratón de prueba, y cada hembra estimulante interactuó con no más de tres ratones machos al día, con al menos media hora de descanso entre pruebas, como se ha descrito anteriormente (Ferhat et al., 2016). Los datos se analizaron con el software Avisoft-SASLab Pro (versión 5.2.12; Avisoft Bioacoustics) y se clasificaron en llamadas por minuto y duración de los USV utilizando un archivo Python de creación propia (Marsal-García, 2024). Los datos se analizaron con un ANOVA bidireccional

seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

### 2.2.4. Localización de objetos nuevos

Se colocó a los ratones (machos de entre 17 y 21 semanas) individualmente, durante 4 días, en una caja de paredes blancas (50 cm × 50 cm × 30 cm) con una estrella en una de las paredes como Pista de posición. Cada día, excepto el día 4, se realizó una sesión de prueba por la mañana y otra por la tarde, y entre sesiones se devolvió a los ratones a su jaula para que descansaran y se hidrataran. El día 1 (aclimatación), se colocó a los ratones en el aparato de prueba vacío durante 10 minutos por la mañana y por la tarde para que se acostumbraran al entorno. Los días 2 y 3 (entrenamiento), se colocaron dos objetos idénticos en el centro de la caja y se devolvió a los ratones al aparato durante 10 minutos en cada sesión, por la mañana y por la tarde, para que exploraran los objetos. El día 4 (prueba), 24 horas después de la última sesión de entrenamiento, uno de los objetos utilizados los días 2 y 3 se trasladó a un lugar nuevo y se volvió a introducir a los ratones para que exploraran este entorno durante 10 minutos. La nueva ubicación se equilibró entre los ratones de prueba variando el objeto que se movía y su posición específica dentro de la caja. Esto garantizó que la ubicación del objeto nuevo fuera diferente entre los ensayos, minimizando el sesgo posicional. Todas las pruebas se grabaron con una cámara situada en la parte superior de la caja para su posterior análisis con EthoVision XT (RRID:SCR\_000441). La exploración de los objetos se cuantificó como el tiempo dedicado a interactuar con el objeto. Definimos una zona de exploración como una región circular de 10 cm de diámetro centrada en cada objeto, siguiendo los procedimientos estándar de EthoVision. Esta zona incluía el propio objeto. El tiempo de exploración se analizó cuando el

Se detectó la punta de la nariz del ratón dentro de esta zona definida. Preferencia por la nueva ubicación, también denominada índice de discriminación, se calculó como la diferencia entre el tiempo dedicado a explorar la ubicación del objeto nuevo y el tiempo dedicado a explorar la ubicación del objeto familiar en relación con el tiempo total dedicado a explorar ambas ubicaciones (Huang et al., 2025). Se aplicó un criterio de exclusión de un tiempo mínimo de exploración de 20 s, tal y como se ha descrito anteriormente (Leger et al., 2013). Los datos se analizaron con un ANOVA de tres vías de diseño mixto o un ANCOVA no paramétrico.

utilizando la prueba de Quade, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni

### 2.2.5. Reconocimiento de objetos nuevos

Se colocó a los ratones (machos de entre 18 y 22 semanas de edad) individualmente, durante 4 días, en una caja de paredes blancas (50 cm × 50 cm × 30 cm) con una estrella en una de las paredes como Pista de posición. En la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR), cada día solo se realizaba una sesión de prueba por la mañana, a diferencia de la prueba de localización de objetos nuevos (NOL). El día 1 (habituaación), se colocó al ratón en la caja vacía durante 10 minutos para que explorara el aparato. Los días 2 y 3 (entrenamiento), se colocaron dos objetos idénticos (familiares) en el centro de la caja y se volvió a introducir al ratón en la arena durante 10 minutos para que explorara los objetos. El día 4 (prueba), uno de los objetos se cambió por otro diferente. A continuación, se volvió a introducir al ratón para que explorara el objeto nuevo. Al igual que en la prueba de localización novedosa, la ubicación del objeto nuevo variaba entre los ratones de prueba para garantizar un sesgo posicional mínimo. Todas las pruebas se grabaron con una cámara situada en la parte superior de la caja para su posterior análisis con EthoVision XT (RRID:SCR\_000441). La exploración del objeto se cuantificó como el tiempo dedicado a interactuar con él. Definimos una zona de exploración como un círculo de 10 cm de diámetro.

región centrada en cada objeto, siguiendo los procedimientos estándar de EthoVision

. Esta zona incluía el propio objeto. Se analizó el tiempo de exploración cuando se detectó la punta de la nariz del ratón dentro de esta zona definida. Se calculó la preferencia por el objeto nuevo, o índice de discriminación,

como la diferencia entre el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo y el tiempo dedicado a explorar el objeto familiar en relación con el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos (Huang et al., 2025). Se aplicó un criterio de exclusión de un tiempo mínimo de exploración de 20 s, tal y como se ha descrito anteriormente (Leger et al., 2013). Los datos se analizaron con un diseño mixto de tres vías

o un ANCOVA no paramétrico utilizando la prueba de Quade, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 2.2.6. Locomoción en campo abierto

Los ratones (machos de entre 18 y 22 semanas) se colocaron individualmente en una caja de paredes blancas (50 cm × 50 cm × 30 cm) con una estrella en una de las paredes como posición.

pista durante 10 minutos (Wiebe et al., 2020). Todos los ensayos se grabaron con una cámara situada en la parte superior de la caja para su posterior análisis con EthoVision XT (RRID: SCR\_000441). Se midió el tiempo dedicado al movimiento (movilidad) y el tiempo en la zona central frente al tiempo en la zona exterior (ansiedad). Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica bilateral *U* de Mann-Whitney (sin distribución normal:  $p < 0,05$  para la prueba de Shapiro-Wilk) para la ansiedad y con un ANOVA bidireccional para la movilidad.

#### 2.2.7. Prueba de la caja de luz-oscuridad

El aparato de prueba consistía en una cámara cerrada de color negro oscuro y una cámara blanca abierta por la parte superior (40 cm × 40 cm × 20 cm) conectada

a través de una pequeña abertura. Se colocó una luz brillante (~390 lx) sobre la cámara abierta (Gantois et al., 2017). Se colocó a los ratones (machos de 9-10 semanas) en el lado iluminado y se les dejó explorar libremente el aparato durante 10

minutos mientras se les grababa desde arriba. El tiempo que pasaban en cada cámara se anotaba manualmente con un cronómetro. Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica bilateral *U* de Mann-Whitney (sin distribución normal:  $p < 0,05$  para la prueba de Shapiro-Wilk).

#### 2.2.8. Laberinto en cruz elevado

El aparato de prueba consistía en dos brazos cerrados y dos brazos abiertos orientados en forma de signo más y elevados del suelo (Stoelting). Se esparció serrín sobre la superficie para proporcionar contraste entre el

ratón y el laberinto y dar al ratón algo de tracción. El serrín se reemplazó según fue necesario entre ratones. Los ratones (machos de 10 a 15 semanas de edad) fueron colocados en el centro del laberinto en forma de más y eran libres de explorar todos los

brazos durante 5 minutos mientras se les grababa desde arriba (Wiebe et al., 2020). El tiempo que pasaban en los brazos abiertos y cerrados se utilizó como medida de la ansiedad generalizada. La puntuación se realizó manualmente con un cronómetro. Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica bilateral *U* de Mann-Whitney (sin distribución normal:  $p < 0,05$  para la prueba de Shapiro-Wilk).

### 2.3. Electrofisiología

Se obtuvieron cortes del hipocampo de ratones WT o

*Shank3B<sup>-/-</sup>* de 25 a 40 días de edad. Los ratones fueron anestesiados profundamente con isoflurano y sacrificados por decapitación. Los cortes (400 μm) se realizaron con un vibrátomo (Leica Microsystems, VT1200S) en una solución a base de sacarosa que contenía

siguiente (en mm): 280 sacarosa, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucosa, 1,3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub> y 10 MgCl<sub>2</sub> y se transfirieron a 32 °C en líquido cefalorraquídeo artificial regular (ACSF) que contenía lo siguiente (en mm): 124 NaCl, 5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub> y 10 glucosa saturada con 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> (pH 7,3, 300 mOsm) durante 15 minutos antes de reposar a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora en ACSF oxigenado (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>). Para el registro, los cortes se transfirieron a una cámara con temperatura controlada (32 °C) con ACSF oxigenado. Para evaluar la depresión a largo plazo (LTD) dependiente del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) del grupo I, los cortes se colocaron en una cámara de registro calentada (32 °C) de un microscopio vertical (DM LFS A Microsystems) y se perfundieron continuamente con ACSF normal. 3,5-dihidroxifenilglicina

(DHPG) (100 μM) se aplicó durante 5 minutos tras el registro basal. Se registraron potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) en el estrato radiado, una capa de la región CA1 del hipocampo, utilizando microelectrodos de vidrio llenos de NaCl 3 M. La inhibición mediada por el receptor GABAA fue bloqueada con 100 μM de picrotoxina, y el área CA1 fue aislada quirúrgicamente de CA3 para evitar actividad epileptiforme. Los fEPSP fueron

provocada a 0,1 Hz por un estimulador digital alimentado por una unidad aislante de estimulación. Todos los análisis de datos se realizaron con un software personalizado en Igor Pro 8 (Wavemetrics). La pendiente fEPSP se midió como índice de la fuerza sináptica. Los datos se analizaron con una prueba t bilateral estándar.

#### 2.4. Preparación de sinaptosomas

Se aislaron los estriados de ratones (machos de 8 a 11 semanas de edad), se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C. La extracción de sinaptosomas se realizó utilizando el reactivo de extracción de proteínas sinápticas Syn-PER™

(87 793, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante

. Se utilizó el reactivo Syn-PER refrigerado con proteasa y fosfatasa

. Se utilizaron inhibidores (469315901, Roche; P5726-5ML, P0044-5ML, Sigma-Aldrich) para homogeneizar el tejido del estriado. El homogeneizado se centrifugó a 1200 × *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se desechó el sedimento con los restos y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 15 000 × *g* durante 20 minutos a 4 °C. La fracción citosólica (sobrenadante) y el sedimento sinaptosomal se lavaron por separado mediante centrifugación a 15 000 × *g* durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de sinaptosomas se suspendió en tampón RIPA (radioinmunoprecipitación) helado (R0278, Sigma-Aldrich) que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa (como se ha indicado anteriormente) y se utilizó para el posterior análisis por Western blotting.

#### 2.5. Western blotting

Se aislaron el hipocampo, la corteza prefrontal y el estriado de cada ratón (machos de entre 8 y 11 semanas de edad), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C. Se utilizó un tampón RIPA helado (R0278, Sigma-Aldrich) que contenía

mezcla de inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa (469315901, Roche; P5726-5ML, P0044-5ML, Sigma-Aldrich) para homogeneizar las muestras para la extracción de proteínas.

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de homogeneizados de tejido completo (tampón RIPA) o fracciones de sinaptosomas (véase Preparación de sinaptosomas) y se procesaron para Western blotting como se describe a continuación. Los extractos se desnaturalizaron por calor (5 min, 95 °C), se separaron mediante SDS-PAGE al 7 % o al 10 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a inmunotransferencia. Las membranas se despojaron en 25 mM de glicina-HCl, pH 2,0 y 1 % de SDS durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con TBS-T (TBS, 0,1 % Tween 20) antes de volver a sondear. La inmunorreactividad se detectó mediante quimioluminiscencia mejorada (plus-ECL, PerkinElmer, Inc.) tras la exposición a una película de rayos X (Denville Scientific, Inc.). Cuantificación de la inmunorreactividad.

Los noblots se realizaron con ImageJ (Institutos Nacionales de Salud). Se utilizaron gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), β-tubulina o β-actina como control de carga para las proteínas totales. Las proteínas fosforiladas proteínas se normalizaron con respecto a sus formas no fosforiladas. Los anticuerpos

anticuerpos se describen en la Tabla complementaria 2. Los western blots completos están disponibles en el material complementario 2.

#### 2.6. Extracción de ARNm y RT-qPCR

Se aislaron el hipocampo, la corteza prefrontal y el estriado de ratones (machos de 8 a 11 semanas de edad), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

El ARNm total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transcribieron inversamente cantidades iguales de ARNm (1 μg) siguiendo el protocolo de la transcriptasa inversa SuperScript III

(18080044, Invitrogen) utilizando oligo(dT)<sub>18</sub>. La abundancia de ARNm se determinó mediante el sistema de PCR en tiempo real (qPCR) CFX Connect (Bio-Rad) y el software CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad) utilizando 2× Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (ABclonal). Todas las muestras se realizaron por duplicado y se utilizó β-actina para la normalización. Se utilizó un método Ct comparativo

para la cuantificación. Las secuencias de los cebadores se indican en la tabla complementaria 3.

## 2.7. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando SPSS Versión 29, y los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se incluye un resumen detallado

resumen de los resultados estadísticos y las pruebas empleadas (prueba t, prueba U de Welch

, prueba U de Mann-Whitney, ANOVA bidireccional, ANOVA bidireccional de diseño mixto

, ANOVA de diseño mixto de tres vías y ANCOVA utilizando la prueba de Quade) se puede encontrar en la Tabla complementaria 1. Se consideró estadísticamente significativo si  $p < 0,05$ . El tamaño de los grupos se eligió basándose en la experiencia previa de nuestro laboratorio y en los tamaños de muestra establecidos en la literatura para ensayos conductuales y moleculares similares, lo que garantiza la viabilidad y la potencia suficiente para detectar efectos significativos.

Para tener en cuenta las posibles diferencias en los niveles generales de actividad debidas a la hipomovilidad de los ratones durante las pruebas NOL y NOR, realizamos un análisis de covarianza no paramétrico (ANCOVA) utilizando la prueba de Quade (Mina et al., 2018). La variable dependiente fue el índice de discriminación de los dos objetos explorados por los ratones, y los factores entre sujetos fueron el genotipo y el tratamiento. El tiempo total de exploración, que mide el tiempo dedicado a explorar ambos objetos, se utilizó como covariable para controlar las variaciones en los niveles generales de actividad entre los ratones. Se aplicaron procedimientos de clasificación a la variable dependiente y a la covariable para cumplir con los supuestos de la prueba de Quade. Se analizaron los residuos de la variable dependiente clasificada para evaluar los efectos del genotipo y el tratamiento, ajustando al tiempo total de exploración.

Dado el pequeño tamaño de la muestra de la prueba de vocalización ultrasónica ( $n = 7-8$ )

y el rango relativamente estrecho de valores observados (0 a 0,03),

empleamos la prueba ROUT con un valor Q del 10 % para la detección de valores atípicos, lo que excluyó a un ratón.

Se utilizaron GraphPad Prism 10.4.1 (GraphPad Software) y Microsoft Excel (Microsoft 365, Microsoft Corporation) para generar los gráficos.

## 3. Resultados

En primer lugar, confirmamos que los ratones machos *Shank3B<sup>-/-</sup>* no expresaban el ARNm y la proteína *Shank3* en el hipocampo, la corteza prefrontal y el estriado (figura complementaria 1A-F; niveles de ARNm: hipocampo:  $p < 0,001$ ; corteza prefrontal:  $p < 0,001$ ; estriado:  $p < 0,001$ , y niveles de proteína: hipocampo: efecto principal del genotipo:  $p < 0,001$ ; corteza prefrontal: efecto principal del genotipo:  $p < 0,001$ ; estriado: efecto principal del genotipo:  $p < 0,001$ ).

Dado que el tratamiento con metformina provoca pérdida de peso en pacientes diabéticos, personas con una relación cintura-cadera elevada, obesidad y jóvenes con TEA (Anagnostou et al., 2016; Dy et al., 2018; Fontbonne et al., 1996;

Glueck et al., 2001; Yerevanian y Soukas, 2019), monitorizamos el peso corporal de los ratones. Los ratones adultos (10-13 semanas de edad) de tipo salvaje (WT) y *Shank3B<sup>-/-</sup>* tratados con metformina (régimen de tratamiento: Figura complementaria

Fig. 2A) mostraron una disminución de peso similar en comparación con los grupos tratados con vehículo, 11,3 % y 10,5 %, respectivamente (Fig. 2B suplementaria; efecto principal del tratamiento:  $p < 0,001$ ). Dado que también se observó una reducción del peso corporal en el grupo WT, no se realizó ningún ajuste en nuestro diseño experimental.

### 3.1. Los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* mostraron comportamientos similares al autismo que se corrigieron con el tratamiento con metformina

Dada la alta incidencia (80 %) de TEA en pacientes con PMS, examinamos a ratones machos en busca de fenotipos centrales del TEA: comportamiento repetitivo e interacciones sociales (Cammarata-Scalisi et al., 2022) (Fig. 2A). Se midió el acicalamiento, que está asociado con el funcionamiento estriatal, para evaluar el comportamiento repetitivo (Kazdoba et al., 2016; Piantadosi et al., 2024). Los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* mostraron un aumento de  $2,52 \pm 0,70$  veces en la duración ( $p < 0,001$ ) y un aumento de  $2,18 \pm 0,61$  veces en la frecuencia ( $p < 0,001$ ) del acicalamiento.

Aseo (Fig. 2B, C). El tiempo dedicado al aseo ( $p < 0,001$ ) y el número de sesiones de aseo ( $p < 0,001$ ) en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* se redujeron a los niveles WT mediante la administración de metformina (Fig. 2B, C).

Las personas con PMS manifiestan una alteración de las habilidades sociales, que puede modelarse y analizarse en roedores mediante la prueba de las tres cámaras (Cammarata-Scalisi et al., 2022; Crawley, 2004; Kazdoba et al., 2016). Los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* mostraron una reducción de aproximadamente el 25,5 % en el índice de preferencia social en comparación con los ratones WT (fig. 2D;  $p = 0,006$ ), lo que indica una disminución de la interacción social. No se encontraron diferencias en el índice de novedad social (fig. 2E;  $p = 0,696$ ), lo que indica una memoria social o una preferencia por la novedad normales. El tratamiento con metformina desde el nacimiento corrigió el deterioro de la preferencia social observado en los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* (fig. 2D;  $p = 0,037$ ).

Para examinar el retraso en el desarrollo y el habla, que son características fundamentales del PMS y el TEA, analizamos los USV durante la interacción social, reflejando aspectos de la comunicación humana (Cammarata-Scalisi et al., 2022; Crawley, 2004; Morrel et al., 2023; Yao et al., 2023). Los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* mostraron una reducción de  $1,80 \pm 0,45$  veces en la duración de los USV (Fig. 2F;  $p = 0,016$ ) y una disminución de  $5,23 \pm 5,05$  veces en el número de llamadas por minuto (fig. 2G; efecto principal del genotipo:  $p = 0,034$ ). El tratamiento con metformina aumentó la duración de los USV en  $2,10 \pm 0,47$  veces ( $p = 0,003$ ) y corrigió parcialmente ( $4,12 \pm 4,22$  veces) la frecuencia de las llamadas (efecto principal del tratamiento:  $p = 0,156$ ) en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* (Fig. 2F, G).

En conjunto, la metformina corrigió tres déficits conductuales básicos similares al autismo en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>*.

### 3.2. La metformina corrigió los déficits de aprendizaje y memoria en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>*.

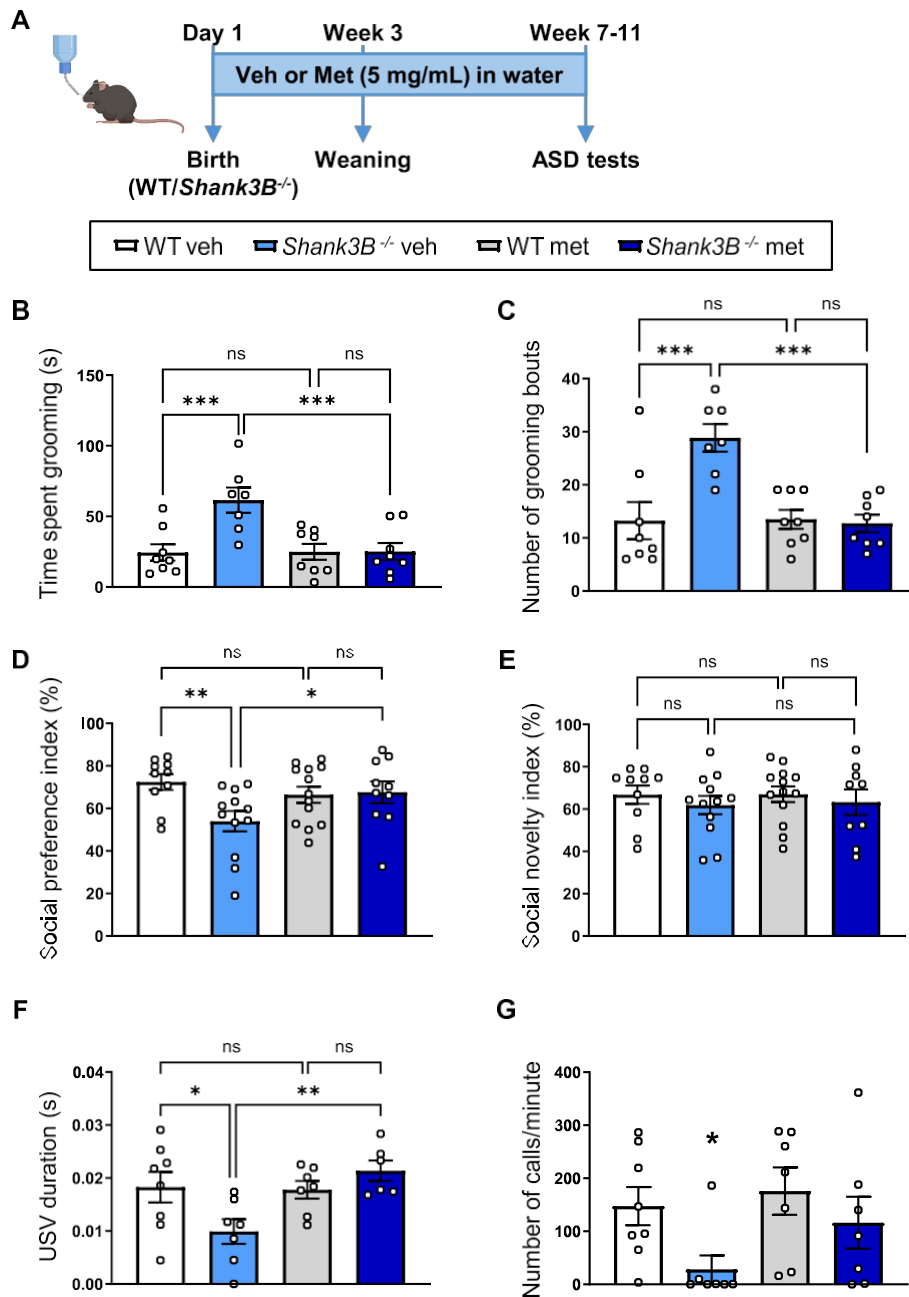
Dado que SHANK3 desempeña un papel fundamental en el desarrollo, la función y la plasticidad de las sinapsis, se evaluó la memoria en ratones machos *Shank3B<sup>-/-</sup>* mediante pruebas de localización de objetos nuevos (NOL) y reconocimiento de objetos nuevos (NOR) (Monteiro y Feng, 2017; Sala et al., 2015; Vogel-Ciernia y Wood, 2014) (fig. 3A).

Los ratones WT y *Shank3B<sup>-/-</sup>* fueron sometidos a la prueba NOL. Como era de esperar, los ratones WT mostraron un aumento de  $1,35 \pm 0,19$  veces en el tiempo de exploración con el objeto en la ubicación nueva ( $p = 0,006$ ), mientras que los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* no mostraron preferencia, ya que dedicaron el mismo tiempo a explorar tanto el objeto en la ubicación familiar como el objeto en la ubicación nueva (fig. 3B;  $p = 0,222$ ). Tras ajustar el tiempo total de exploración, observamos un deterioro estadísticamente significativo de la memoria dependiente del hipocampo en los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>*, con una disminución del 151,14 % en comparación con los ratones WT (fig. 3C;  $p = 0,017$ ).

Dado que la metformina mejora la memoria (Gantois et al., 2019; Ishola et al., 2020; Monyak et al., 2017; Pourfridoni et al., 2024), examinamos si podía mejorar el déficit de memoria en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>*. De hecho, el deterioro de la memoria observado en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* se corrigió de manera efectiva, ya que pasaron  $2,28 \pm 0,49$  veces más tiempo explorando el objeto en la ubicación nueva en comparación con la ubicación familiar (fig. 3B;  $p < 0,001$ ), y se produjo un aumento significativo de  $4,77 \pm 4,39$  veces en la preferencia por la ubicación del objeto (fig. 3C;  $p < 0,001$ ).

En la prueba NOR, los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>*, al igual que los ratones WT, exploraron el objeto nuevo  $1,53 \pm 0,41$  veces más que el objeto familiar (fig. 3D; efecto principal del objeto:  $p < 0,001$ ). Tras tener en cuenta el tiempo total dedicado a la exploración, los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* presentaron un índice de discriminación similar al de los ratones WT, lo que indica que no hay deterioro de la memoria de reconocimiento (fig. 3E; efecto principal del genotipo:  $p = 0,608$ ).

Varios estudios han descrito hipoactividad en ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* (Angelakos et al., 2019; Balasco et al., 2022; Dhamme et al., 2017; Liu et al., 2021; Peixoto et al., 2019). Para examinar este fenotipo en nuestro modelo, medimos la distancia total recorrida en campo abierto. Los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* recorrieron una distancia  $1,63 \pm 0,15$  veces menor que el grupo WT (fig. 3F; efecto principal del genotipo:  $p < 0,001$ ), en consonancia con informes anteriores. La metformina no corrigió la hipoactividad de los ratones *Shank3B<sup>-/-</sup>* (fig. 3F; efecto principal del tratamiento:  $p = 0,650$ ). Debido a su hipomovilidad, el índice de discriminación descrito en NOL y NOR se analizó utilizando un ANCOVA no paramétrico (prueba de Quade), con un total de



**Fig. 2.** La metformina corrigió los comportamientos similares al autismo en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>. (A) Los ratones tratados desde el nacimiento con vehículo (veh) o metformina (met) se sometieron a pruebas de comportamiento similares al autismo a las 7-11 semanas de edad. El comportamiento repetitivo ( $n = 7-8$ ) se evaluó midiendo (B) el tiempo dedicado al acicalamiento y (C) el número de episodios de acicalamiento.

(D) La preferencia social ( $n = 10-13$ ) se evaluó mediante la prueba de las tres cámaras, expresada como la relación entre el tiempo dedicado al estímulo social (desconocido 1) y el tiempo dedicado al

tiempo total dedicado a los estímulos sociales y no sociales. (E) La novedad social ( $n = 9-13$ ) se evaluó en la prueba de tres cámaras calculando la proporción de tiempo dedicado al ratón nuevo (desconocido 2) en comparación con el tiempo total dedicado tanto al desconocido 2 como al ratón familiar (desconocido 1). Los USV ( $n = 6-8$ ) se midieron como (F)

Duración del USV y (G) número de llamadas por minuto. En (G), el efecto principal del genotipo fue significativo, pero la interacción genotipo  $\times$  tratamiento no lo fue; el asterisco sobre la barra del vehículo KO indica un efecto genotípico significativo, que muestra una reducción en las llamadas en comparación con el WT. Cada punto representa los datos de un ratón individual, y todos los valores (B-G) se muestran como media  $\pm$  SEM, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns = no significativo frente a todos los demás grupos; calculado mediante ANOVA bidireccional con prueba post hoc de Bonferroni (el análisis estadístico se muestra en la tabla complementaria 1).

tiempo de exploración incluido como covariable para controlar las diferencias relacionadas con la hipomovilidad en los niveles generales de actividad (Fig. 3C,

E). Por lo tanto, concluimos que las diferencias observadas en el índice de discriminación de las pruebas NOL y NOR están directamente asociadas con las variables genéticas y de tratamiento estudiadas y no son simplemente el resultado de los niveles generales de actividad. Para estudiar la plasticidad sináptica en

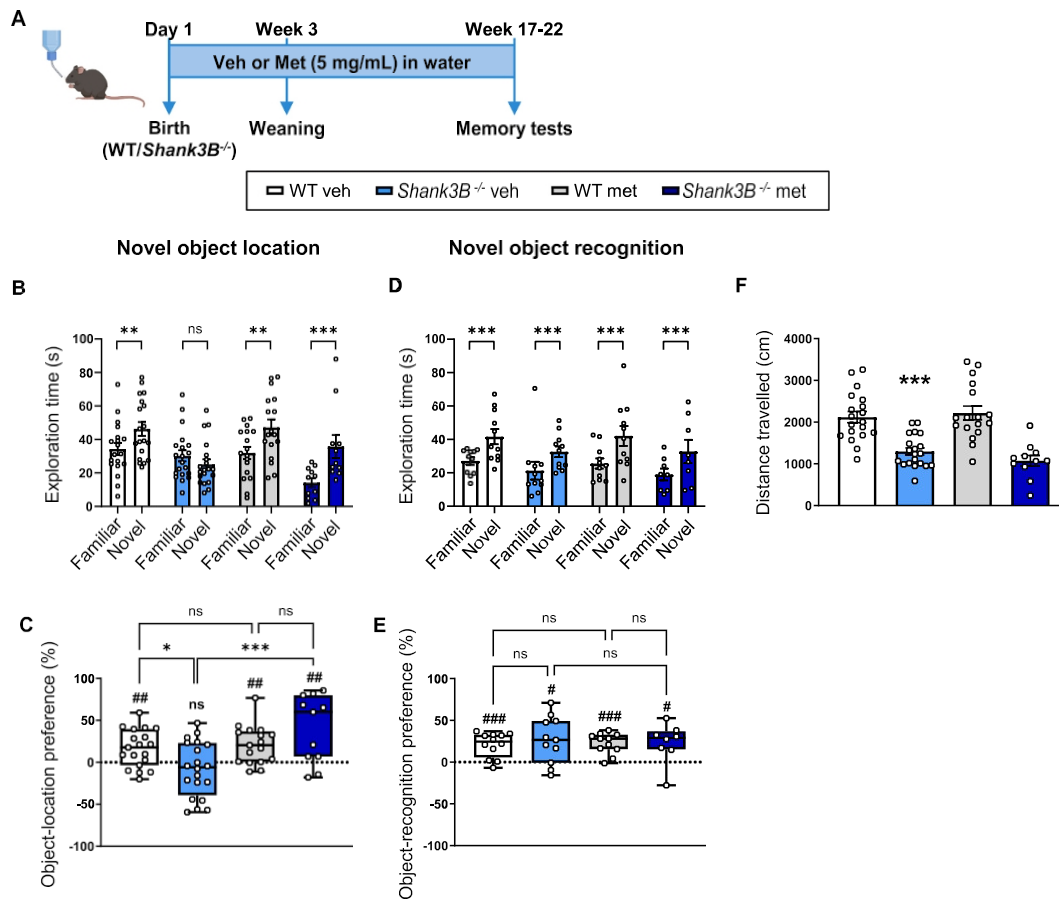
ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>, medimos la I mGluR-dependiente a largo plazo (mGluR-LTD) en el hipocampo (figura complementaria 3A). No se encontraron diferencias en la mGluR-LTD del hipocampo entre los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> y los ratones WT (figura complementaria

Fig. 3B, C;  $p = 0,446$ ).

Los resultados subrayan el papel fundamental de *Shank3* en los procesos de memoria. La eliminación de *Shank3* provoca un deterioro de la memoria dependiente del hipocampo en ratones, que se corrige con la administración de metformina desde el nacimiento.

### 3.3. Los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> no mostraron comportamiento ansioso.

Para excluir la ansiedad como factor de confusión en la interpretación de



**Fig. 3.** El deterioro de la memoria en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> se corrigió con el tratamiento con metformina. (A) Los ratones tratados desde el nacimiento con vehículo (veh) o metformina (met) se sometieron a pruebas de memoria a las 17-22 semanas de edad. La memoria se evaluó utilizando dos parámetros: la diferencia en el tiempo de exploración (B) entre la ubicación familiar y la nueva en la prueba NOL ( $n = 11-20$ ) y (D) entre el objeto familiar y el nuevo en la prueba NOR ( $n = 8-12$ ), así como el índice de discriminación ajustado para (C) NOL y (E) Pruebas NOR en ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup>. El índice de discriminación ajustado tuvo en cuenta el tiempo total de exploración como covariable para controlar las diferencias relacionadas con la hipomovilidad en los niveles generales de actividad. (F) La movilidad ( $n = 11-20$ ) se midió como la distancia recorrida en la prueba de campo abierto. En (C, E), se utilizaron los valores originales del índice de discriminación para trazar el gráfico, con el fin de conservar los valores negativos observados en los datos brutos. En (F), el efecto principal del genotipo fue significativo, pero el genotipo  $\times$

La interacción del tratamiento no lo fue; el asterisco sobre la barra del vehículo KO indica un efecto genotípico significativo, que muestra una reducción en la distancia recorrida en comparación con el WT. Cada punto representa los datos de un ratón individual, y todos los valores (B-F) se muestran como media  $\pm$  SEM, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ####  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$ , ns = no significativo frente a todos los demás grupos (\*) o frente a 0 (\*): calculado mediante (B, D) ANOVA de tres vías de diseño mixto con prueba post hoc de Bonferroni, (C, E) prueba de Quade con prueba post hoc de Bonferroni, o (F) ANOVA de dos vías (el análisis estadístico se muestra en la Tabla complementaria 1).

Los resultados conductuales se obtuvieron mediante pruebas realizadas a diferentes edades, entre las 9 y las 22 semanas (figura complementaria 4A). A las 9-10 semanas de edad, los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> no mostraron ansiedad en la prueba de la caja de luz-oscuridad, como

lo que se evidenció por el tiempo similar que pasaron en la luz en comparación con los ratones WT (figura complementaria 4B;  $p = 0,101$ ). A las 10-15 semanas de edad, los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> pasaron tanto tiempo como los ratones WT en los brazos abiertos de la

laberinto elevado en cruz (figura complementaria 4C;  $p = 0,606$ ). Del mismo modo, a las 18-22 semanas de edad, no se observaron diferencias significativas en el tiempo pasado en la zona central de la prueba de campo abierto entre los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> y WT

(figura complementaria 4D;  $p = 0,630$ ).

Los resultados indican que las deficiencias conductuales observadas en los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> no estaban influenciadas por la ansiedad.

### 3.4. La señalización elevada de mTORC1 en los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> se normalizó con metformina

Investigamos si las vías mTORC1 y MAPK/ERK, que están implicadas en el modelo de ratón FXS, también estaban aumentadas en los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> (fig. 4A) (Choi et al., 2024).

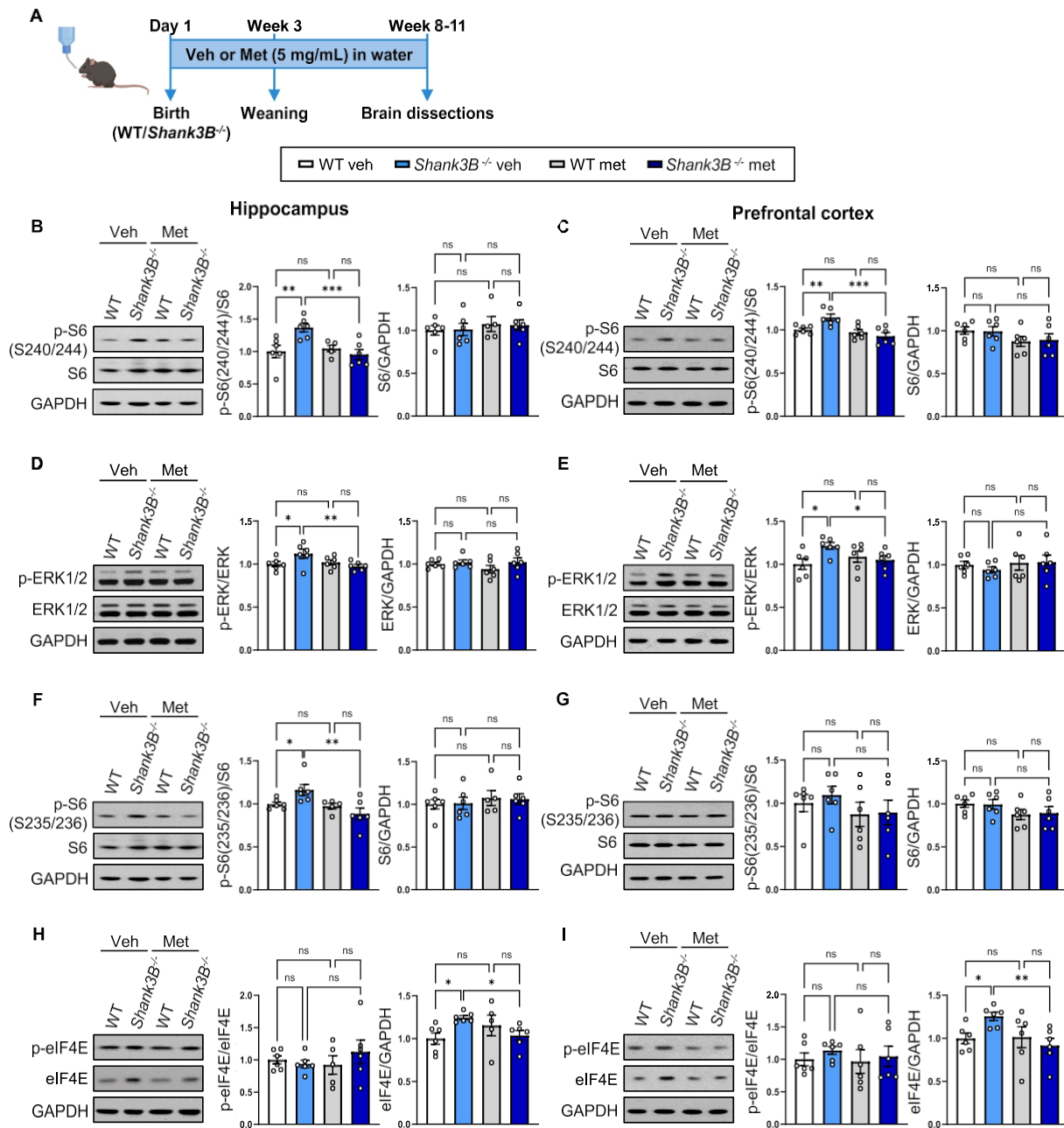
La proteína ribosómica S6 fosforilada (p-S6) (S240/244), una diana descendente de mTORC1, se elevó tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal en  $1,37 \pm 0,15$  veces y  $1,14 \pm 0,05$  veces, respectivamente,

en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> (fig. 4B; hipocampo:  $p = 0,002$ ; fig. 4C; corteza prefrontal:  $p = 0,008$ ). La p-ERK solo aumentó marginalmente en 1,12,

$\pm 0,06$  veces en el hipocampo y  $1,22 \pm 0,08$  veces en la corteza prefrontal de los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones WT (fig. 4D; hipocampo:  $p = 0,024$ ; fig. 4E; corteza prefrontal:  $p = 0,012$ ). La p-S6 (S235/236), una diana descendente de la vía MAPK/ERK, aumentó  $1,16 \pm 0,07$  veces solo en el hipocampo de los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> (fig. 4F; hipocampo:  $p = 0,034$ ; fig. 4G; corteza prefrontal: efecto principal del genotipo:  $p = 0,642$ ).

El aumento marginal de la fosforilación de ERK podría explicar la ausencia de hiperfosforilación de eIF4E, una diana descendente de la vía MAPK/ERK (fig. 4H; hipocampo: efecto principal del genotipo:  $p = 0,569$ ; fig. 4I; corteza prefrontal: efecto principal del genotipo:  $p = 0,434$ ), a diferencia de lo que se había descrito anteriormente en el modelo de ratón FXS (Choi et al., 2024; Gantois et al., 2017). Sin embargo, los niveles totales de proteína eIF4E se elevaron en  $1,25 \pm 0,09$  veces en ambas áreas (fig. 4H; hipocampo:  $p = 0,020$ ; fig. 4I; corteza prefrontal:  $p = 0,042$ ), pero los niveles totales de ARNm se mantuvieron sin cambios en comparación con los ratones WT (fig. 5A complementaria; hipocampo:  $p = 0,103$ ; fig. 5B complementaria; corteza prefrontal:  $p = 0,310$ ). El mecanismo que subyace al aumento del nivel de proteína eIF4E no está claro de inmediato.

En el cuerpo estriado (figura complementaria 6A), ni p-S6 (S240/244) (Figura complementaria 6B; efecto principal del genotipo:  $p = 0,455$ ) ni p-ERK



**Fig. 4.** Las vías de señalización mTORC1 y MAPK/ERK reguladas al alza y mínimamente aumentadas en el hipocampo y la corteza prefrontal de los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> se redujeron con el tratamiento con metformina. (A) Las estructuras cerebrales se aislaron a las 8-11 semanas de edad después del tratamiento desde el nacimiento. Inmuntotransferencias representativas de ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> (—) (—) tratados con vehículo (veh) y metformina (met) de ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> de niveles fosforilados y totales de (B-C, F-G) S6, (D-E) ERK y (H-I) eIF4E en el hipocampo y corteza prefrontal. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los niveles de proteína se normalizaron a 1 para el WT veh, y los demás grupos se ajustaron en consecuencia. Cada punto representa los datos de un ratón individual ( $n = 5-6$ ), y todos los valores (B-I) se muestran como media  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns = no significativo frente a todos los demás grupos; calculado mediante ANOVA bidireccional con prueba post hoc de Bonferroni (el análisis estadístico se muestra en la tabla complementaria 1).

(Figura complementaria 6C; efecto principal del genotipo:  $p = 0,126$ ) los niveles estaban elevados en *Shank3B*<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones WT.

La metformina normalizó la señalización mTORC1 mejorada en el hipocampo y la corteza prefrontal de *Shank3B*<sup>-/-</sup> a los niveles WT (Fig. 4B, C) (hipocampo: p-S6 (S240/244):  $p < 0,001$ ; corteza prefrontal: p-S6 (S240/244):  $p < 0,001$ ). El pequeño aumento en la señalización MAPK/ERK también se corrigió, incluyendo p-S6 (S235/236) y eIF4E total (Fig. 4D-F, H-I; hipocampo: p-ERK:  $p = 0,009$ ; p-S6 (S235/236):  $p = 0,001$ ;

eIF4E:  $p = 0,043$ ; corteza prefrontal: p-ERK:  $p = 0,047$ ; eIF4E:  $p = 0,009$ ). Por lo tanto, la señalización elevada de mTORC1 en el hipocampo y la corteza prefrontal de los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> se corrigió con metformina.

### 3.5. La disminución de los niveles de *GluN2B*, *Homer1* y *GluA2* en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> se corrigió con metformina

Dado que las vías mTORC1 y MAPK/ERK no se alteraron en el cuerpo estriado, estudiamos *GluN2B* (también conocido como NR2B; una subunidad NMDAR), *Homer1b/c* y *GluA2* (también conocido como *GluR2*; una subunidad AMPAR), que se encuentran en las postsinapsis excitatorias asociadas a ambas vías, y que se demostró que estaban disminuidos en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> (Peça et al., 2011; Wang et al., 2024).

Medimos los niveles de proteína *GluN2B*, *Homer1* y *GluA2* en el fraccionamiento de sinaptosomas del estriado de ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> (fig. 5A). Como era de esperar, los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> mostraron una marcada reducción en

estas proteínas sinápticas: GluN2B disminuyó en un  $43,2 \pm 8,2 \%$ , Homer1 en un  $32,6 \pm 8,2 \%$  y GluA2 en un  $35,5 \pm 7,2 \%$  (Fig. 5B-D;  $p < 0,001$ ). El tratamiento con metformina aumentó significativamente estas proteínas en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>, GluN2B en  $1,39 \pm 0,15$  veces, Homer1 en  $1,27 \pm 0,12$  veces y GluA2 en  $1,23 \pm 0,12$  veces (Fig. 5B-D; GluN2B:  $p = 0,026$ ; Homer1:  $p = 0,041$ ; GluA2:  $p = 0,037$ ). Sin embargo, los niveles de GluA2 no difirieron en el homogeneizado estriatal total entre genotipos o después del tratamiento (figura complementaria 6D; efecto principal del genotipo:  $p = 0,485$ ; efecto principal del tratamiento:  $p = 0,322$ ).

#### 4. Discusión

Este estudio demuestra que la eliminación de *Shank3* en ratones provoca comportamientos similares al autismo, deterioro del aprendizaje y la memoria, e hiperactivación de la vía de señalización mTORC1. El tratamiento con metformina desde el nacimiento corrigió los déficits de comportamiento asociados al TEA, restauró el rendimiento de la memoria dependiente del hipocampo, redujo la señalización exagerada de la vía mTORC1 y corrigió la disminución de las proteínas sinápticas estriatales en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>.

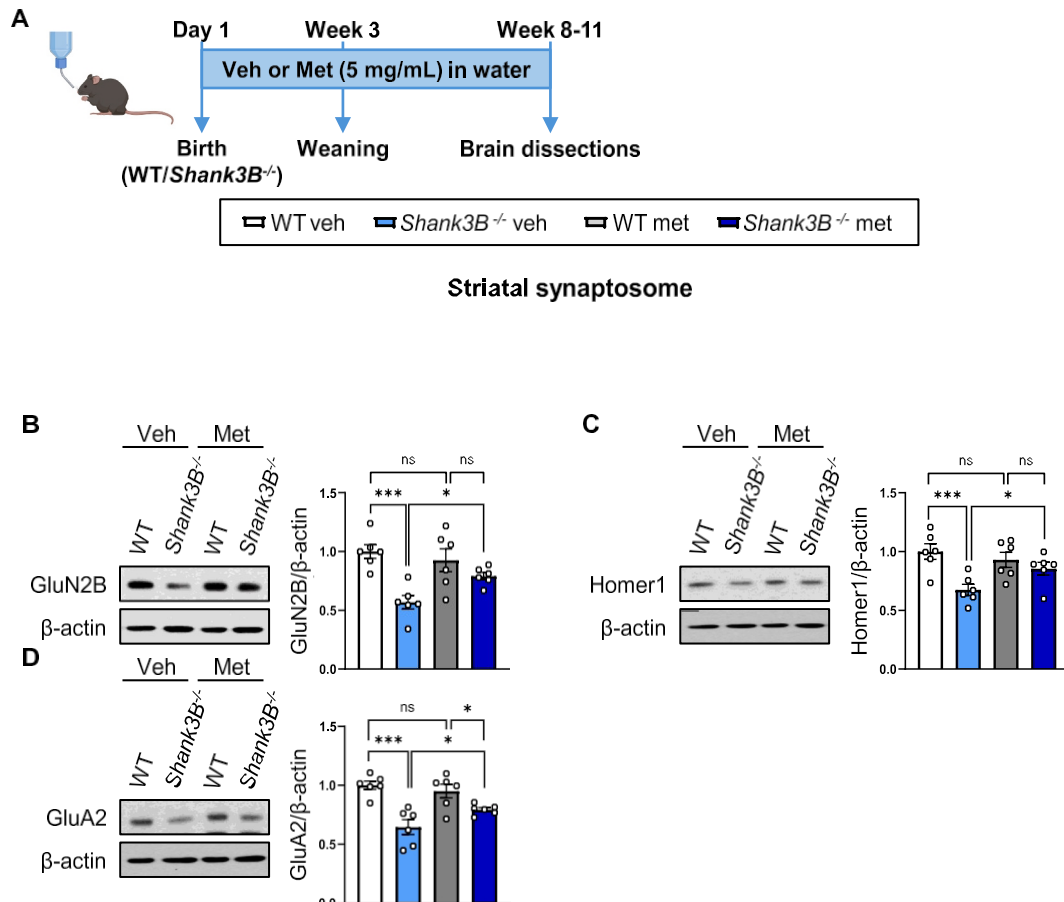
Estudiamos tres comportamientos autistas básicos en el modelo de ratón *Shank3B*<sup>-/-</sup>: comportamiento repetitivo, interacción social y comunicación. Confirmamos los hallazgos anteriores de que los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> presentaban un aumento del acicalamiento y un deterioro de la preferencia social, sin diferencias en la novedad social en la prueba de las tres cámaras (Dhamne et al., 2017; Kabitzke et al., 2018; Mei et al., 2016; Peça et al., 2011; Sgritta et al., 2019; Wang et al., 2017). Observamos una disminución en el USV

frecuencia, en consonancia con Pagani et al., y proporcionó nuevos resultados sobre la reducción de la duración de los USV, haciendo hincapié en las deficiencias socio comunicativas (Burdeus-Olavarrieta et al., 2023; Pagani et al., 2019; Sarasua et al., 2014; Yao et al., 2023).

La metformina corrigió los déficits asociados al FXS: aseo, interacción social y USV, cuando los ratones fueron tratados en la edad adulta o desde el nacimiento (Choi et al., 2024; Gantois et al., 2017). Los informes de casos documentaron los beneficios de la metformina en la mejora del habla, la interacción social, la estereotipia y la cognición en adultos y niños con FXS (Biag et al., 2019; Dy et al., 2018). Aquí informamos de que la administración de metformina desde el nacimiento rescató el comportamiento repetitivo, la preferencia social y la duración de los USV, y mejoró parcialmente la frecuencia de los USV en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>.

Mediante la prueba NOL, demostramos un deterioro de la memoria a largo plazo dependiente del hipocampo en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>. Por el contrario, no presentaron ningún deterioro en la memoria a largo plazo NOR, lo que concuerda con un estudio anterior que utilizó un protocolo de memoria a corto plazo para esta prueba (Dhamne et al., 2017).

Los resultados contrastantes obtenidos en las pruebas NOL y NOR podrían atribuirse a la participación de diferentes regiones cerebrales responsables de estas tareas (Haettig et al., 2011; Vogel-Ciernia y Wood, 2014). La prueba NOL se basa principalmente en el hipocampo, que codifica la información espacial sobre el objeto, mientras que la prueba NOR involucra múltiples áreas del cerebro, incluyendo la corteza insular, ventromedial prefrontal y perirrenal, y el hipocampo, que participan en el procesamiento de las características y rasgos del objeto (Haettig et al.,



**Fig. 5.** La disminución de la expresión de GluN2B, Homer1 y GluA2 en los sinaptosomas estriatales de ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> se elevó con el tratamiento con metformina. (A) Se aisló el estriado a las 8-11 semanas de edad tras el tratamiento desde el nacimiento. Inmunotransferencias representativas de ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> tratados con vehículo (veh) y metformina (met) de los niveles totales de (B) GluN2B, (C) Homer1 y (D) GluA2 en los sinaptosomas del estriado. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. Los niveles de proteína se normalizaron a 1 para el WT. veh, con otros grupos ajustados en consecuencia. Cada punto representa los datos de un ratón individual ( $n = 6$ ), y todos los valores (B-D) se muestran como media  $\pm$  SEM, \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ , ns = no significativo frente a todos los demás grupos; calculado mediante ANOVA bidireccional con prueba post hoc de Bonferroni (el análisis estadístico se muestra en la tabla complementaria 1).

2011; Vogel-Ciernia y Wood, 2014).

El mGluR-LTD desempeña un papel importante en el aprendizaje y la memoria, y su desregulación es evidente en modelos de ratones con TEA, como el ratón FXS (Collingridge et al., 2010; Ebert y Greenberg, 2013; Gantois et al., 2017). Aunque los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> muestran una plasticidad estriatal alterada (Peça et al., 2011; Wang et al., 2017), incluida la alteración de la LTD inducida por DHPG en las MSN D2 estriatales (Wang et al., 2017), múltiples líneas *Shank3* KO no informaron de cambios en la mGluR-LTD del hipocampo (Jaramillo et al., 2017; Kouser et al., 2013; Vicidomini et al., 2017). Esta ausencia de alteración en el hipocampo concuerda con nuestros hallazgos actuales. La disociación específica de la región cerebral sugiere que el fenotipo de la memoria no depende de la LTD del mGluR del hipocampo. La LTP y la LTD dependientes de NMDAR se consideran ampliamente como mecanismos celulares subyacentes al aprendizaje y la memoria (Dupuis et al., 2023; Lüscher y Malenka, 2012). En varias líneas *Shank3*, se redujo la LTP dependiente de NMDAR en el hipocampo (Jaramillo et al., 2017; Kouser et al., 2013), mientras que, según lo informado por Peça et al., la relación de pulsos pareados (PPR) y la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) en CA1 no se modificaron (Peça et al., 2011). Por lo tanto, las alteraciones de la LTP podrían subrayar el deterioro de la memoria dependiente del hipocampo que observamos. Sin embargo, es necesario realizar una medición directa de la LTP dependiente del NMDAR del hipocampo en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> para comprobar esta hipótesis.

La metformina mejoró la memoria a corto y largo plazo en un modelo de mosca FXS

y en un modelo de rata con TEA inducido por ácido valproico, mejorando la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris (Ishola et al., 2020; Monyak et al., 2017). En la prueba NOL, el tratamiento con metformina desde el nacimiento corrigió la reducción de la interacción con el objeto en la nueva ubicación hasta los niveles WT. Sin embargo, la metformina no logró mejorar la hipomovilidad observada en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>, en consonancia con los hallazgos previos de Gantois et al. en los que la metformina no rescató la hiperactividad en el modelo de ratón con FXS (Gantois et al., 2017), lo que indica que la metformina puede no tener ningún efecto sobre la movilidad.

En cuanto a la ansiedad, existe cierta controversia, ya que algunos estudios informan de un aumento de los comportamientos de ansiedad en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> (Peça et al., 2011; Szabo et al., 2025), mientras que otros no observaron diferencias (Balaan et al., 2019; Dhamne et al., 2017; Szabo et al., 2025). Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en la edad de los animales o en las prácticas de manipulación. En nuestro estudio, la ansiedad no pareció influir en los demás comportamientos, ya que no se detectaron diferencias entre los ratones WT y *Shank3B*<sup>-/-</sup> en las medidas de ansiedad.

La delección de *Shank3* en el hipocampo y la corteza prefrontal de ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> dio lugar a una mayor activación de mTORC1 y a una elevación mínima de las vías MAPK/ERK. Estudios previos mostraron una síntesis elevada de proteínas cerebrales y una actividad mTORC1 en ratones *Shank3* KO, así como una hiperactivación de la vía de señalización MAPK/ERK en células mutantes KRAS con agotamiento de SHANK3 (Lilja et al., 2024; Mencer et al., 2021; Torossian et al., 2021). Los estudios que exploran la relación entre estas vías y SHANK3 son escasos, con resultados inconsistentes entre los modelos *Shank3*, incluidas las neuronas deficientes en *Shank3*, las neuronas derivadas de pacientes con PMS y otros modelos de ratones transgénicos *Shank3* (Bidinosti et al., 2016; Giona et al., 2025; Lee et al., 2017; Mencer et al., 2021; Moutin et al., 2021; Torossian et al., 2021).

Demostramos que el tratamiento con metformina rescató por completo la señalización elevada de la vía mTORC1. Este hallazgo es similar al de nuestros estudios previos en un modelo de ratón con FXS, en el que la administración de metformina desde el nacimiento condujo a una reducción de la actividad de las vías mTORC1 y MAPK/ERK

, mientras que el tratamiento de ratones adultos (8-12 semanas) corrigió la señalización exagerada solo a través de la vía MAPK/ERK (Choi et al., 2024; Gantois et al., 2017). En ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>, mTORC1 es la principal cascada de señalización desregulada. En consonancia con nuestros hallazgos, también se ha demostrado que la metformina inhibe la activación de la proteína quinasa dependiente del ARN bicatenario (PKR), un regulador clave de la iniciación de la traducción, mejorando las características conductuales y neuropatológicas en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica y degeneración frontotemporal (ELA/DFT) (Zu et al., 2020).

Observamos un aumento de los niveles totales de eIF4E en el hipocampo y

corteza prefrontal de ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>, lo cual no se había descrito anteriormente y se corrigió con metformina. Dado que eIF4E media la traducción dependiente de la caperuza (Pelletier et al., 2021), su regulación al alza podría contribuir a la síntesis proteica exagerada descrita anteriormente (Torossian et al., 2021). Dado que los niveles de ARNm de *Eif4e* en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> no difieren de los de los ratones WT, el aumento de la cantidad de proteína podría producirse a nivel de traducción o de estabilidad de la proteína. Se necesitan más estudios para determinar la base mecánica subyacente.

Sorprendentemente, no se observó ningún aumento en la señalización mTORC1 ni MAPK/ERK en el cuerpo estriado de los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>. Esto podría explicarse por la presencia de dos poblaciones distintas de neuronas estriatales, las neuronas de proyección espinoidea de vía directa (dSPN) y las SPN de vía indirecta (iSPN) (Gerfen y Surmeier, 2011). Wang et al. demostraron que en el estriado de los ratones machos *Shank3B*<sup>-/-</sup>, solo las iSPN mostraban alteraciones en sus espinas y en la función sináptica (Wang et al., 2024). Otro estudio relacionó el acicalamiento, un comportamiento alterado conocido en los ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>, con la hiperactividad de las iSPN, pero no de las dSPN (Piantadosi et al., 2024). El análisis por Western blotting no puede detectar la expresión específica de cada tipo de célula, por lo que se necesitan más estudios para analizar las vías de señalización mTORC1 y MAPK/ERK en las iSPN y las dSPN.

Wang et al. informaron que los niveles de GluN2B disminuyeron selectivamente en las iSPN de ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> (Wang et al., 2024). Además, un estudio anterior demostró que la expresión de la proteína GluN2B se reducía en los PSD purificados del estriado de ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> en comparación con los WT (Peça et al., 2011). Por otra parte, Lopatynska-Mazurek et al. demostraron que el pretratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTORC1, normalizaba los cambios inducidos por el alcohol en los niveles de GluN2B sinaptosomal en un modelo de rata, revertiendo tanto los aumentos como las disminuciones (Lopatynska-Mazurek et al., 2021). Esto nos llevó a investigar si la metformina podía restaurar la expresión de GluN2B sinaptosomal en el estriado. Descubrimos que el tratamiento con metformina aumentaba los niveles de GluN2B en el estriado de ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>.

Al igual que con GluN2B, Homer1 también se redujo tanto en las iSPN como en la fracción sinaptosomal de todo el estriado (Peça et al., 2011; Wang et al., 2024). Homer1 actúa como una proteína asociada a las sinapsis que une Shank3 a mGluR (Sheng y Kim, 2000) (fig. 1) y se reduce de forma sistemática en múltiples modelos de ratones con deficiencia de Shank3 (Bey et al., 2018; Mei et al., 2016; Peça et al., 2011). Dado que la señal mGluR es crucial para la LTD (Lüscher y Huber, 2010), Wang et al. informaron de una alteración de la plasticidad sináptica a largo plazo preferentemente en las iSPN de *Shank3B*<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones WT (Wang et al., 2017). Este déficit provocó un acicalamiento excesivo en este modelo de ratón, que se corrigió modulando las iSPN. La metformina corrigió la reducción de la expresión sinaptosomal de Homer1 en el estriado.

Por el contrario, GluA2 disminuyó en ambas poblaciones estriatales de iSPN y dSPN y, por lo tanto, también en la fracción sinaptosomal de todo el estriado (Peça et al., 2011; Wang et al., 2024). Salpietro et al. identificaron un espectro de trastornos del desarrollo neurológico asociados con variantes de novo de *GRIA2* (el gen que codifica el GluA2), incluido el TEA (Salpietro et al., 2019). De acuerdo con investigaciones anteriores (Peça et al., 2011; Wang et al., 2024), encontramos una reducción en la expresión sinapto-somática de GluA2 en el estriado, que se revirtió con metformina. La regulación específica del compartimento de GluA2 se describió en otros contextos que implicaban una alteración de la señalización mTORC1. Pereyra et al. demostraron que la inhibición de mTORC1 en ratas Wistar mediante rapamicina aumentaba los niveles de GluA2 en la densidad postsináptica del hipocampo, pero no en el homogeneizado total. Plantearon la hipótesis de que este aumento selectivo podría deberse a efectos dependientes de mTORC1 sobre la síntesis o el tráfico local de AMPAR, o a mecanismos compensatorios secundarios a la reducción de los niveles de GluA1 (Pereyra et al., 2021). En consonancia con este patrón específico del compartimento, también observamos que la metformina aumentaba los niveles de GluA2 solo en el sinaptosoma estriatal, mientras que los niveles de GluA2 en el homogeneizado total permanecían sin cambios.

Decidimos comenzar el tratamiento con metformina en una etapa temprana de la vida, en lugar de en la edad adulta, basándonos en los resultados del modelo de ratón con FXS y en casos clínicos.

Estudios en pacientes con FXS que demuestran mejores resultados en individuos más jóvenes (Biag et al., 2019; Choi et al., 2024; Dy et al., 2018). Los primeros periodos de desarrollo parecen ser sensibles a las intervenciones dirigidas a las vías de control de la traducción, como la p-S6, que se eleva durante las etapas embrionarias y posnatales tempranas y disminuye gradualmente a partir de entonces (Kouloulia et al., 2019). Esto puede explicar por qué el tratamiento con metformina iniciado al nacer normalizó los niveles de la vía mTORC1 en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup>. El enfoque centrado en las primeras etapas de la vida limita las conclusiones directas sobre la ventana terapéutica relevante para los pacientes mayores con PMS. Además, dado que la metformina influye en el metabolismo sistémico, los cambios periféricos podrían contribuir a los resultados centrales que observamos. Los estudios futuros podrían distinguir la modulación metabólica periférica de los mecanismos centrales directos, y la administración de metformina en diferentes momentos de la vida, como después del destete (3 semanas de edad) o en la edad adulta, sería valiosa para trasladar los hallazgos a la población clínica.

En conclusión, los hallazgos de alteraciones conductuales similares al autismo y déficits cognitivos en ratones *Shank3B*<sup>-/-</sup> recapitulan el fenotipo observado en individuos con PMS. Informamos sobre el mecanismo subyacente que causa los déficits conductuales: señalización elevada de mTORC1 en el hipocampo y la corteza prefrontal, y niveles reducidos de las subunidades del receptor GluN2B y GluA2, y de la proteína Homer1 asociada a las sinapsis en el estriado. Es importante destacar que la metformina, un fármaco aprobado por la FDA, corrigió esta señalización anómala, lo que dio lugar a una mejora del comportamiento. Dada su seguridad, fácil disponibilidad y sencilla administración, la metformina ofrece una oportunidad terapéutica prometedora para una rápida traslación clínica al tratamiento de varones jóvenes con PMS.

#### Declaración de contribución de los autores CRediT

**Laura Marsal-García:** Redacción, revisión y edición, redacción del borrador original, visualización, software, administración del proyecto, metodología.

**Jung-Hyun Choi:** Redacción, revisión y edición, administración del proyecto, metodología,

investigación, curación de datos, conceptualización. **Eve Peraldi:** Redacción,

revisión y edición, investigación, curación de datos. **Pei You Wu:**

Redacción, revisión y edición, investigación, curación de datos. **Cong Loc**

**Dang:** Redacción, revisión y edición, investigación, curación de datos. **R. Anne**

**McKinney:** Redacción, revisión y edición, supervisión. **Ilse Gantois:** Redacción,

revisión y edición, redacción del borrador original, supervisión, administración del

proyecto, metodología, investigación, curación de datos, conceptualización. **Nahum**

**Sonenberg:** Redacción, revisión y edición, supervisión, obtención de financiación.

#### Financiación

Este trabajo ha sido financiado por la subvención de la Fundación de los Institutos Canadienses de Investigación en Salud (CIHR) [FDN-148423], la Fundación Azrieli y la Fundación de la Familia Norman Zavalkoff a N.S.; y por Global - Learning & Academic Research Institution for Master's-PhD y posdoctorados (LAMP) de la Fundación Nacional de Investigación de Corea (NRF), financiado por el Ministerio de Educación [n.º RS-2024-00445180], a J.-H.C.

#### Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses financieros ni relaciones personales que pudieran influir en el trabajo descrito en este artículo.

#### Agradecimientos

Agradecemos a Eileen Hu, JiaHao Zhang y Raquel Suissa por su ayuda en la investigación; a Annie Sylvestre y Annik Lafrance por el cuidado de los animales; y a Niaz Mahmood y Caleb Walters por sus comentarios sobre el manuscrito. El resumen gráfico y la figura 1 se crearon en BioRender. Sonenberg, N. (2025) <https://BioRender.com/czihmfv>, y <https://BioRender.com>

m/s7h9woc, respectivamente.

#### Apéndice A. Datos complementarios

Los datos complementarios de este artículo se pueden encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2025.107217>.

#### Disponibilidad de los datos

Todos los datos están disponibles en el texto principal o en los materiales complementarios.

El código informático generado en este estudio está disponible en la siguiente base de datos: Script Python de creación propia para clasificar los datos USV según la duración USV y las llamadas por minuto; Zenodo (doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.14537932>). La última versión está disponible en GitHub (<https://github.com/Laura3-13/usv-utils>).

#### Referencias

- Asociación Americana de Psiquiatría, 2013. Trastornos del desarrollo neurológico. En: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (5.ª ed.), A.P. Association. American Psychiatric Publishing, Arlington, VA, pp. 31-86.
- Amiel, S.A., 2021. Las consecuencias de la hipoglucemia. *Diabetologia* 64, 963-970. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05366-3>.
- Anagnostou, E., et al., 2016. Metformina para el tratamiento del sobrepeso inducido por medicamentos antipsicóticos atípicos en jóvenes con trastorno del espectro autista: un ensayo clínico aleatorizado. *JAMA Psychiatry* 73, 928-937. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.1232>.
- Angelakos, C.C., et al., 2019. Hipactividad en jaulas domésticas en modelos genéticos de ratones con trastorno del espectro autista. *Neurobiol. Learn. Mem.* 165, 107000. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.02.010>.
- Arons, M.H., et al., 2012. Las mutaciones asociadas al autismo en ProSAP2/Shank3 deterioran la transmisión sináptica y la señalización transsináptica mediada por neurexina-neureglin. *J. Neurosci.* 32, 14966-14978. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2215-12.2012>.
- Balaan, C., et al., 2019. Los ratones jóvenes con deficiencia de Shank3b presentan un fenotipo conductual relevante para el trastorno del espectro autista. *Behav. Brain Res.* 356, 137-147. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.005>.
- Balasco, L., et al., 2022. Comportamientos anormales dependientes de los bigotes y conectividad cortico-hipocámpal alterada en ratones *Shank3b*<sup>-/-</sup>. *Cereb. Cortex* 32, 3042-3056. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab399>.
- Bey, A.L., et al., 2018. La alteración específica de la región cerebral *Shank3* en ratones revela una disociación de los circuitos corticales y estriatales en los comportamientos relacionados con el autismo. *Transl. Psychiatry* 8, 94. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0142-6>.
- Biag, H.M.B., et al., 2019. Tratamiento con metformina en niños pequeños con síndrome de X frágil. *Mol. Genet. Genomic Med.* 7, e956. <https://doi.org/10.1002/mgg3.956>.
- Bidinosti, M., et al., 2016. La inhibición de CLK2 mejora los rasgos autistas asociados con la deficiencia de SHANK3. *Science* 351, 1199-1203. <https://doi.org/10.1126/science.aad5487>.
- Bluck, S., 2003. Memoria autobiográfica: exploración de sus funciones en la vida cotidiana. *Memory* 11, 113-123. <https://doi.org/10.1080/741938206>.
- Bozdagi, O., et al., 2013. El factor de crecimiento similar a la insulina 1 rescata los déficits sinápticos y motores en un modelo murino de autismo y retraso del desarrollo. *Mol. Autism.* 4, 9. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-9>.
- Burdeus-Olavarrieta, M., et al., 2023. Recomendaciones consensuadas sobre comunicación, lenguaje y habla en el síndrome de Phelan-McDermid. *Eur. J. Med. Genet.* 66, 104745. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2023.104745>.
- Cammarata-Scalisi, F., et al., 2022. Aspectos clínicos y genéticos del síndrome de Phelan-McDermid: un enfoque interdisciplinario para su tratamiento. *Genes* 13, 504. <https://doi.org/10.3390/genes13030504>.
- Choi, J.H., et al., 2024. Tratamiento temprano con metformina: un enfoque eficaz para abordar la fisiopatología del síndrome de X frágil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 121, e2407546121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2407546121>.
- Collingridge, G.L., et al., 2010. Depresión a largo plazo en el SNC. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 459-473. <https://doi.org/10.1038/nrn2867>.
- Cope, E.C., et al., 2023. La activación de la vía CA2-CA1 ventral revierte la disfunción de discriminación social en ratones knockout *Shank3B*. *Nat. Commun.* 14, 1750. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37248-8>.
- Crawley, J.N., 2004. Diseño de tareas conductuales en ratones relevantes para comportamientos similares al autismo. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 10, 248-258. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20039>.
- Delling, J.P., Boeckers, T.M., 2021. Comparación de la deficiencia de SHANK3 en modelos animales: fenotipos, estrategias de tratamiento e implicaciones traslacionales. *J. Neurodev. Disord.* 13, 55. <https://doi.org/10.1186/s11689-021-09397-8>.
- Desaunay, P., et al., 2020. La memoria en el trastorno del espectro autista: un metaanálisis de estudios experimentales. *Psychol. Bull.* 146, 377-410. <https://doi.org/10.1037/BUL0000225>.
- Dhame, S.C., et al., 2017. Fenotipos fisiológicos y conductuales replicables in vivo del modelo de ratón mutante nulo *Shank3B* para el autismo. *Mol. Autism.* 8, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0142-z>.

- Dupuis, J.P., et al., 2023. Funciones del receptor NMDA en la salud y la enfermedad: viejo actor, nuevas dimensiones. *Neuron* 111, 2312–2328. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.05.002>.
- Durand, C.M., et al., 2012. Las mutaciones SHANK3 identificadas en el autismo conducen a la modificación de la morfología de las espinas dendríticas a través de un mecanismo dependiente de la actina. *Mol. Psychiatry* 17, 71–84. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.57>.
- Dy, A.B.C., et al., 2018. La metformina como tratamiento específico para el síndrome de X frágil. *Clin. Genet.* 93, 216–222. <https://doi.org/10.1111/cge.13039>.
- Ebert, D.H., Greenberg, M.E., 2013. Señalización neuronal dependiente de la actividad y trastorno del espectro autista. *Nature* 493, 327–337. <https://doi.org/10.1038/nature11860>.
- Ensembl, 2025. Variantes de transcripción de SHANK3 en humanos y ratones. Disponible en: [https://useast.ensembl.org/Human/Search/Results?q=SHANK3;site=ensembl;facet\\_species=Human;page=1;facet\\_feature\\_type=Transcript;perpage=10](https://useast.ensembl.org/Human/Search/Results?q=SHANK3;site=ensembl;facet_species=Human;page=1;facet_feature_type=Transcript;perpage=10) [https://useast.ensembl.org/Mouse/Search/Results?q=Shank3;site=ensembl;facet\\_species=Mouse;page=1;perpage=10;facet\\_feature\\_type=Transcript](https://useast.ensembl.org/Mouse/Search/Results?q=Shank3;site=ensembl;facet_species=Mouse;page=1;perpage=10;facet_feature_type=Transcript) [Consultado: 3 de octubre de 2025].
- Ferhat, A.T., et al., 2016. Grabación de vocalizaciones ultrasónicas de ratones para evaluar la comunicación social. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/53871>.
- Fischer, I., et al., 2024. La mutación Shank3 altera la señalización del glutamato y la mielinización en un modelo murino de TEA y en OPC derivadas de iPSC humanas. *Sci. Adv.* 10, ead4573. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ad4573>.
- Fontbonne, A., et al., 1996. El efecto de la metformina en las anomalías metabólicas asociadas con la distribución de grasa en la parte superior del cuerpo. Grupo de estudio BIGPRO. *Diabetes Care* 19, 920–926. <https://doi.org/10.2337/diacare.19.9.920>.
- Gallagher, S.M., et al., 2004. La activación de la proteína quinasa regulada por señales extracelulares es necesaria para la depresión a largo plazo dependiente del receptor metabotrópico de glutamato en el área CA1 del hipocampo. *J. Neurosci.* 24, 4859–4864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5407-03.2004>.
- Gantois, I., et al., 2017. La metformina mejora los déficits fundamentales en un modelo murino del síndrome de X frágil. *Nat. Med.* 23, 674–677. <https://doi.org/10.1038/nm.4335>.
- Gantois, I., et al., 2019. Metformina para el tratamiento del síndrome de X frágil y otros trastornos neurológicos. *Annu. Rev. Med.* 70, 167–181. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-081117-041238>.
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulación de los sistemas de proyección estriatal por la dopamina. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>.
- Giona, F., et al., 2025. Shank3 modula la expresión de Rpl3 y la síntesis de proteínas a través de mGlu5: implicaciones para el síndrome de Phelan-McDermid. *Mol. Psychiatry* 30, 3599–3614. <https://doi.org/10.1038/s41380-025-02947-9>.
- Glueck, C.J., et al., 2001. La metformina reduce el peso, la obesidad centrípeta, la insulina, la leptina y el colesterol de lipoproteínas de baja densidad en sujetos no diabéticos con obesidad mórbida y un índice de masa corporal superior a 30. *Metabolism* 50, 856–861. <https://doi.org/10.1053/meta.2001.24192>.
- Guillory, S.B., et al., 2021. Compromiso anticipado visual social y memoria en el síndrome de Phelan-McDermid y el trastorno del espectro autista: un estudio piloto de seguimiento ocular. *J. Neurodev. Disord.* 13, 58. <https://doi.org/10.1186/s11689-021-09400-2>.
- Haettig, J., et al., 2011. La inhibición de HDAC modula la memoria a largo plazo dependiente del hipocampo para la localización de objetos de una manera dependiente de CBP. *Learn. Mem.* 18, 71–79. <https://doi.org/10.1101/lm.198691>.
- Hale, T., et al., 2002. Transfancia de metformina a la leche materna. *Diabetologia* 45, 1509–1514. <https://doi.org/10.1007/S00125-002-0939-X>.
- Huang, Z., et al., 2024. Estrategias para evaluar comportamientos similares al autismo en ratones. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/66846>.
- Huang, Z., et al., 2025. El tratamiento con DREADDs específicos para interneuronas inhibitorias del hipocampo altera la señalización mTORC1-4E-BP y perjudica la formación de la memoria. *J. Neurochem.* 169, e70048. <https://doi.org/10.1111/jnc.70048>.
- Ishola, I.O., et al., 2020. Nuevo potencial de la metformina en el trastorno del espectro autista inducido por el ácido valproico en ratas: participación del sistema de defensa antioxidante. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 34, 650–661. <https://doi.org/10.1111/fcp.12567>.
- Jaramillo, T.C., et al., 2016. Alteración de la función sináptica estriatal y comportamiento anormal en el modelo murino de autismo con delección del exón 4-9 de Shank3. *Autism Res.* 9, 350–375. <https://doi.org/10.1002/AUR.1529>.
- Jaramillo, T.C., et al., 2017. La nueva mutación Shank3 muestra comportamientos con validez aparente para el autismo y alteración de la función estriatal y del hipocampo. *Autism Res.* 10, 42–65. <https://doi.org/10.1002/aur.1664>.
- Jesse, S., et al., 2020. Daño grave de la sustancia blanca en la deficiencia de SHANK3: un estudio humano y traslacional. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 7, 46–58. <https://doi.org/10.1002/acn3.50959>.
- Kabitzke, P.A., et al., 2018. Análisis exhaustivo de dos modelos murinos de trastorno del espectro autista, Shank3 y Cacna1c. *Genes Brain Behav.* 17, 4–22. <https://doi.org/10.1111/gbb.12405>.
- Kaluff, A.V., et al., 2015. Neurobiología del acicalamiento en roedores y su valor para la neurociencia traslacional. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>.
- Kazdoba, T.M., et al., 2016. Fenotipos conductuales de modelos genéticos de autismo en ratones. *Genes Brain Behav.* 15, 7–26. <https://doi.org/10.1111/gbb.12256>.
- Kolevzon, A., et al., 2022. Ensayo clínico del factor de crecimiento insulínico tipo 1 en el síndrome de Phelan-McDermid. *Mol. Autism.* 13, 17. <https://doi.org/10.1186/s13229-022-00493-7>.
- Kouloulia, S., et al., 2019. La degradación proteasómica mediada por Raptor de la 4E-BP2 desamida regula la traducción neuronal posnatal y la actividad del NF-κB. *Cell Rep.* 29, 3620–3635. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.023>.
- Kouser, M., et al., 2013. La pérdida de las isoformas predominantes de Shank3 da lugar a alteraciones en el hipocampo en el comportamiento y la transmisión sináptica. *J. Neurosci.* 33, 18448–18468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3017-13.2013>.
- Krapivinsky, G., et al., 2003. El receptor NMDA está acoplado a la vía ERK mediante una interacción directa entre NR2B y RasGRF1. *Neuron* 40, 775–784. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00645-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00645-7).
- Leblond, C.S., et al., 2014. Meta-análisis de las mutaciones SHANK en los trastornos del espectro autista: un gradiente de gravedad en las deficiencias cognitivas. *PLoS Genet.* 10, e1004580. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004580>.
- Lee, Y., et al., 2017. El análisis del transcriptoma y el interactoma estriatal de ratones con sobreexpresión de Shank3 revela la conectividad entre Shank3 y la señalización mTORC1. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 201. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00201>.
- Leger, M., et al., 2013. Prueba de reconocimiento de objetos en ratones. *Nat. Protoc.* 8, 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>.
- Lilja, J., et al., 2024. La disminución de SHANK3 provoca una sobredosis de señalización ERK y la muerte celular en cánceres con mutación KRAS. *Nat. Commun.* 15, 8002. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52326-1>.
- Liu, H.Y., et al., 2021. Análisis de la relación entre la ansiedad y el acicalamiento estereotipado utilizando el modelo autista mutante, el modelo de estrés agudo y el modelo de dolor crónico. *Neurobiol. Stress* 15, 100417. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100417>.
- Lopatynska-Mazurek, M., et al., 2021. La rapamicina mejora los déficits de aprendizaje espacial, la vulnerabilidad a la adicción al alcohol y la expresión alterada de la subunidad GluN2B del receptor NMDA en ratas adultas expuestas al etanol durante el período neonatal. *Biomolecules* 11, 650. <https://doi.org/10.3390/biom11050650>.
- Lüscher, C., Huber, K.M., 2010. Depresión sináptica a largo plazo dependiente del mGluR del grupo 1 : mecanismos e implicaciones para los circuitos y las enfermedades. *Neuron* 65, 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.016>.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2012. Potenciación a largo plazo dependiente del receptor NMDA y depresión a largo plazo (LTP/LTD) dependientes del receptor NMDA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>.
- Ma, Y., et al., 2025. Las alteraciones de los oligodendrocitos relacionadas con Shank3 en el autismo se restauran mediante la inhibición de la vía Erk. *Mol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-025-03333-1>.
- Maenner, M.J., et al., 2023. Prevalencia y características del trastorno del espectro autista entre niños de 8 años: red de vigilancia del autismo y las discapacidades del desarrollo, 11 centros, Estados Unidos, 2020. *MMWR Surveill. Summ.* 72, 1–14. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7202a1>.
- Malará, M., et al., 2022. La deficiencia de SHANK3 provoca defectos en la mielina del sistema nervioso central y periférico. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 371. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04400-4>.
- Marsal-García, L., 2024. Usv-utiles (Versión 1.1.0). <https://doi.org/10.5281/zenodo.14537932>.
- McLean, A.C., et al., 2012. Realización de lavado vaginal, tinción con cristal violeta y evaluación citológica vaginal para la identificación de las etapas del ciclo estral en ratones. *J. Vis. Exp.* e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>.
- Mei, Y., et al., 2016. La restauración adulta de la expresión de Shank3 rescata fenotipos selectivos similares al autismo. *Nature* 530, 481–484. <https://doi.org/10.1038/nature16971>.
- Memmott, R.M., et al., 2010. La metformina previene el cáncer de pulmón inducido por carcinógenos del tabaco. *Tumorigénesis. Cancer Prev. Res.* 3, 1066–1076. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.Ccrp-10-0055>.
- Mencer, S., et al., 2021. La proteómica de los modelos murinos de autismo y Alzheimer revela alteraciones comunes en la vía de señalización mTOR. *Transl. Psychiatry* 11, 480. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01578-2>.
- Mina, A.I., et al., 2018. CalR: una herramienta de análisis basada en la web para experimentos de calorimetría indirecta. *Cell Metab.* 28 (656–666), e651. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.019>.
- Monteiro, P., Feng, G., 2017. Proteínas SHANK: funciones en la sinapsis y en el trastorno del espectro autista. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 147–157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>.
- Monyak, R.E., et al., 2017. La disregulación de la señalización de la insulina subyace a los déficits circadianos y cognitivos en un modelo de Drosophila con síndrome de X frágil. *Mol. Psychiatry* 22, 1140–1148. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.51>.
- Morrel, J., et al., 2023. Correlatos neuronales y predictores del desarrollo del habla y el lenguaje en bebés con alta probabilidad de autismo: una revisión sistemática. *Front. Hum. Neurosci.* 17, 1211676. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1211676>.
- Moutin, E., et al., 2021. La restauración de la dinámica del receptosoma del glutamato en las sinapsis rescata los déficits similares al autismo en ratones con deficiencia de Shank3. *Mol. Psychiatry* 26, 7596–7609. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01230-x>.
- Pagani, M., et al., 2019. La eliminación del gen Shank3, asociado al riesgo de autismo, altera la conectividad prefrontal. *J. Neurosci.* 39, 5299–5310. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2529-18.2019>.
- Peça, J., et al., 2011. Los ratones mutantes Shank3 muestran comportamientos similares al autismo y disfunción estriatal. *Nature* 472, 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>.
- Peixoto, R.T., et al., 2019. El desarrollo anormal del estriado subyace al inicio temprano de los déficits conductuales en ratones Shank3B(—/—). *Cell Rep.* 29 (2016–2027), e2014. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.021>.
- Pelletier, J., et al., 2021. La estructura multifacética de la caperuza eucariótica. *WIREs RNA* 12, e1636. <https://doi.org/10.1002/wrna.1636>.
- Pereyra, M., et al., 2021. Requisito de expresión del receptor AMPA durante la recuperación de la memoria a largo plazo y su asociación con la señalización mTORC1. *Mol. Neurobiol.* 58, 1711–1722. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02215-7>.
- Phelan, K., et al., 2022. Síndrome de Phelan-McDermid: un sistema de clasificación tras 30 años de experiencia. *Orphanet J. Rare Dis.* 17, 1–4. <https://doi.org/10.1186/S13023-022-02180-5/METRICS>.
- Fundación del Síndrome de Phelan-McDermid, 2025. ¿Qué es el síndrome de Phelan-McDermid? Disponible en: <https://pmsf.org/what-is-phan-mcdermid-syndrome/> [Consultado el 24 de enero de 2025].

- Piantadosi, S.C., et al., 2024. La hiperactividad de las neuronas espinosas de proyección de la vía indirecta promueve el comportamiento compulsivo. *Nat. Commun.* 15, 4434. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48331-z>.
- Pourfridoni, M., et al., 2024. Efectos beneficiosos del tratamiento con metformina sobre el deterioro de la memoria. *Mol. Biol. Rep.* 51, 640. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09445-1>.
- Rein, B., et al., 2020. Un protocolo estandarizado de preferencia social para medir los déficits sociales en modelos murinos de autismo. *Nat. Protoc.* 15, 3464-3477. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0382-9>.
- Sala, C., et al., 2015. Proteínas del andamiaje sináptico Shank: claves para comprender la patogénesis del autismo y otros trastornos sinápticos. *J. Neurochem.* 135, 849-858. <https://doi.org/10.1111/JNC.13232>.
- Salpietro, V., et al., 2019. Los defectos de la subunidad GluA2 del receptor AMPA son una causa de los trastornos del desarrollo neurológico. *Nat. Commun.* 10, 3094. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10910-w>.
- Santini, E., Klann, E., 2014. Señalización recíproca entre las vías de control traductivo y las proteínas sinápticas en los trastornos del espectro autista. *Sci. Signal.* 7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005832> re10-re10.
- Sarasua, S.M., et al., 2014. Evaluación clínica y genómica de 201 pacientes con síndrome de Phelan-McDermid. *Hum. Genet.* 133, 847-859. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1423-7>.
- Sgritta, M., et al., 2019. Mecanismos subyacentes a los cambios mediados por microbios en el comportamiento social en modelos murinos de trastorno del espectro autista. *Neuron* 101, 246-259.e246. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018>.
- Shcheglovitov, A., et al., 2013. SHANK3 e IGF1 restauran los déficits sinápticos en las neuronas de pacientes con síndrome de delección 22q13. *Nature* 503, 267-271. <https://doi.org/10.1038/nature12618>.
- Sheng, M., Kim, E., 2000. La familia Shank de proteínas de andamiaje. *J. Cell Sci.* 113, 1851-1856. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1851>.
- Szabo, J., et al., 2025. Fenotipo similar al autismo a lo largo de la vida de ratones mutantes Shank3B de ambos sexos. *J. Neurodev. Disord.* 17, 45. <https://doi.org/10.1186/s11689-025-09635-3>.
- Torossian, A., et al., 2021. Aumento de las tasas de síntesis de proteínas cerebrales en ratones knockout Shank3: implicaciones para una relación entre el déficit de proteínas sinápticas y la síntesis de proteínas desregulada en el trastorno del espectro autista/discapacidad intelectual. *Neurobiol. Dis.* 148, 105213. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105213>.
- Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU., 2025. Ensayo de metformina en personas con síndrome de X frágil (Met). *ClinicalTrials.gov*. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03862950>.
- Urrutia-Ruiz, C., et al., 2022. La eliminación de la proteína SHANK3 asociada al autismo elimina la plasticidad sináptica estructural tras un traumatismo cerebral. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 6081. <https://doi.org/10.3390/ijms23116081>.
- Vicidomini, C., et al., 2017. La mejora farmacológica de los receptores mGlu5 rescata los déficits conductuales en ratones knockout para SHANK3. *Mol. Psychiatry* 22, 689-702. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.30>.
- Vogel-Ciernia, A., Wood, M.A., 2014. Examen de la localización de objetos y la memoria de reconocimiento de objetos en ratones. *Curr. Protoc. Neurosci.* 69. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>, 8.31.31-38.31.17.
- Wang, W., et al., 2017. La disfunción estriatopallidal subyace al comportamiento repetitivo en el modelo de autismo con deficiencia de Shank3. *J. Clin. Invest.* 127, 1978-1990. <https://doi.org/10.1172/JCI87997>.
- Wang, X., et al., 2014. La complejidad transcripcional y funcional de Shank3 proporciona un marco molecular para comprender la heterogeneidad fenotípica de SHANK3 que causa el autismo y los ratones mutantes Shank3. *Mol. Autism.* 5, 1-14. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-30>.
- Wang, Y.-Z., et al., 2024. La proteómica específica del tipo de neurona revela distintas proteoformas de Shank3 en iSPN y dSPN que conducen a la sinaptopatía estriatal en ratones Shank3B<sup>-/-</sup>. *Mol. Psychiatry* 29, 2372-2388. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02493-w>.
- Wiebe, S., et al., 2020. El homólogo 4EHP (eIF4E2) del eIF4E regula la depresión a largo plazo en el hipocampo y afecta al comportamiento social. *Mol. Autism.* 11, 92. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00394-7>.
- Yao, K., et al., 2023. Una revisión de las vocalizaciones ultrasónicas en ratones y cómo se relacionan con el habla humana. *J. Acoust. Soc. Am.* 154, 650-660. <https://doi.org/10.1121/10.0020544>.
- Yerevanian, A., Soukas, A.A., 2019. Metformina: mecanismos en la obesidad humana y la pérdida de peso. *Curr. Obes. Rep.* 8, 156-164. <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00335-3>.
- Zu, T., et al., 2020. La metformina inhibe la traducción de RAN a través de la vía PKR y mitiga la enfermedad en ratones C9orf72 ALS/FTD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 18591-18599. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005748117>.
- Zwanenburg, R.J., et al., 2016. ¿Tiene la insulina intranasal algún efecto sobre el desarrollo y el comportamiento en el síndrome de Phelan-McDermid? Ensayo aleatorio, doble ciego y controlado con placebo. *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 1696-1701. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.109>.