



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

“Explorando los canales de potasio KCNQ: Una perspectiva en trastornos del neurodesarrollo y cardíacos”

SOFIA STUPNIKI

Bahía Blanca

Argentina

2024

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, durante el período comprendido entre el 2 de octubre de 2018 y el 30 de abril de 2024, bajo la dirección del Dr. Guillermo Spitzmaul y el Dr. Carlos Javier Baier, ambos investigadores Adjuntos de CONICET y docentes de la Universidad Nacional del Sur.



Farmacéutica Sofia Stupniki



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/....../..... , mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

Al director de esta tesis, el Dr. Guillermo Spitzmaul, por haber confiado en mí, por las enseñanzas compartidas, y por haberme guiado durante todos estos años de doctorado. Gracias Guille por permitirme formar parte de tu grupo de investigación, lleno de personas con gran calidad humana. A mi co-director, el Dr. Javier Baier, por el asesoramiento y el acompañamiento durante el desarrollo de esta tesis. Sin el cariño, estímulo y dedicación de mis directores esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

A mis compañeros del laboratorio, a los que están y los que ya se fueron: Eze, Marce, Cami, Esteban, Giuli, Julia. Encontrarme con gente tan valiosa es algo que sin dudas debo agradecer. Gracias por ayudarme cada vez que lo necesité, por su compañía, por la colaboración en los experimentos, pero sobre todo por su apoyo incondicional. Una mención especial para Leo, que desde el primer día recorre el camino de esta tesis conmigo. Gracias por estar siempre presente con una palabra de aliento.

Gracias a todos los investigadores, CPA y becarios del INIBIBB por prestarme materiales y reactivos, y por el acompañamiento a lo largo de este camino. Especialmente al laboratorio vecino de Diego Rayes y María José de Rosa, por estar en el día a día y por todos los momentos compartidos. A Leti y Caro, por su ayuda con los animales del bioterio, y por la paciencia que me han tenido todos estos años. A Ignacio, no sólo por la ayuda con los experimentos de biología molecular, sino también por las horas de terapia prestadas. A Edgardo por su asistencia con los distintos microscopios del instituto. Gracias Ed por compartir tu lugar conmigo mientras escribía esta tesis, y por las charlas compartidas en esos momentos. A Leti Cabral y a Vivi, por darme la bienvenida todos los días al instituto, por las charlas, y por los consejos que me han dado.

Al Dr. Marcelo Pistonesi, y a todo el grupo de Química Analítica de la UNS, que fueron los primeros en abrirme las puertas a la investigación cuando era una estudiante de grado. Al Dr. Balazs Pal y la Dra. Gaia Novarino, que me recibieron en sus laboratorios en Hungría y Austria, y por las innumerables cartas de recomendación que han escrito para mí.

A las cátedras de docencia de las que formo o formé parte en algún momento. A todos mis compañeros de Fisiología Humana e Inmunología, gracias por el espacio que me han dado.

Agradezco a la Universidad Nacional del Sur, por darme la posibilidad de cursar mi carrera de grado, y por la oportunidad de realizar un posgrado. Gracias por darme el honor de representar a la UNS en el encuentro con Premios Nobel en Lindau y por la posibilidad de vivir esa experiencia maravillosa. Gracias a los docentes de BByF que, de alguna u otra manera, han colaborado con mi trabajo y formación.

Al CONICET por la beca doctoral otorgada, y por el espacio para la realización de los experimentos.

A mis amigos de la vida, a los de Patagones y los que me dejó el paso por Bahía Blanca, por estar siempre presentes.

Finalmente, de manera especial, agradezco a mi familia: mi mamá Adriana, mi papá Roberto, mis hermanos Mikaela, Javier y Mauro. Gracias por apoyarme siempre, aunque no necesariamente estén de acuerdo con mis decisiones. Gracias por ser el sostén fundamental de mi vida, por estar a mi lado, por entenderme y por compartir la felicidad que significa poder cumplir esta meta.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIACIONES	5
INTRODUCCIÓN	9
Canales de potasio KCNQ	9
○ Estructura del canal y propiedades biofísicas	10
○ Localización de las subunidades KCNQ	12
– Subunidades extra neuronales	13
– Subunidades neuronales	14
○ Corriente M	19
Patologías vinculadas a canales KCNQ	20
○ Mutaciones en <i>KCNQ4</i>	22
○ KCNQ4 en SNC: núcleo pedúnculo pontino	23
Autismo	27
○ Posible rol del PPN en los TEA	31
○ Contribución de los canales KCNQ en los TEA	32
○ Modelo murino de autismo	34
Modelo de reversión	37
○ Estado de cetosis	38
○ Dieta cetogénica	42
Alteraciones de la conducción cardíaca	43
○ Potencial de acción cardíaco	44
○ Síndrome de QT largo (SQTL)	45
– KCNQ1	49
– KCNH2.....	49
– SCN5A	50
OBJETIVOS	53
OBJETIVOS GENERALES	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
○ CAPÍTULO 1:	53
○ CAPÍTULO 2:	53

○	CAPÍTULO 3.....	54
○	CAPÍTULO 4.....	54
	MATERIALES Y MÉTODOS	56
1.	Ratones	56
1.1.	Identificación de los ratones	58
1.2.	Identificación del genotipo	59
–	Extracción del ADN genómico	59
–	PCR convencional	59
–	Electroforesis en gel de agarosa	60
1.3.	Eutanasia	61
2.	Generación del modelo animal de AVP	61
3.	Elaboración y caracterización de la dieta cetogénica	63
4.	Ensayos conductuales	67
○	4.1. Ensayo de Campo Abierto (<i>Open field</i>)	68
○	4.2. Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (<i>NOR test</i>).....	69
○	4.3. Ensayo de Interacción Social	70
○	4.4. Ensayo de auto-acicalamiento (<i>Self-Grooming</i>)	71
○	4.5. Caja de Luz-Oscuridad	72
5.	Análisis de expresión génica	72
○	5.1. Disección del cerebro	72
○	5.2. Extracción de ARN de regiones cerebrales.....	73
○	5.3. Transcripción reversa.....	74
○	5.4. Validación de <i>primers</i>	75
○	5.5. PCR cuantitativa en tiempo real	76
6.	Obtención de secciones coronales de cerebro	79
7.	Inmunofluorescencia sobre rebanadas de cerebro	80
8.	Obtención de imágenes de microscopía	81
9.	Electrofisiología en rebanadas de cerebro	81
10.	Estudio genético en pacientes con patologías cardíacas	85
○	10.1. Selección de pacientes	85
○	10.2. Aislamiento del ADN genómico.....	85
○	10.3. Amplificación de los exones. Purificación	86
○	10.4. Secuenciación del exoma	86
○	10.5. Análisis de los datos	86

10. Análisis estadístico.....	91
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	92
CAPÍTULO 1: Generación de un modelo murino de autismo por exposición prenatal a ácido valproico.	93
RESULTADOS	93
○ Control de peso para la determinación de preñez.....	93
○ Ensayos de comportamiento.....	94
DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES	104
CAPÍTULO 2: Elaboración y administración de una dieta que promueva la cetogénesis en ratones como modelo de reversión de trastornos del neurodesarrollo.	105
RESULTADOS	105
○ Elaboración y caracterización de la dieta cetogénica en ratones C57BL/6	105
– Control de peso y de ingesta de alimento.....	106
– Glucemia y cetonemia.....	108
– Determinaciones bioquímicas en suero obtenido al finalizar el tratamiento	110
○ Alteraciones de la conducta tras la administración de la KD	114
– Caja de Luz-Oscuridad	115
– NOR test	116
– Ensayo de campo abierto (OF)	117
– Sociabilidad	119
○ Análisis de la expresión de genes tras la ingesta de la KD.....	120
DISCUSIÓN	127
○ Memoria.....	135
○ Ansiedad.....	136
○ Sociabilidad	137
CONCLUSIONES	139
CAPÍTULO 3: Canales de potasio KCNQ en el núcleo pedúnculo pontino.	140
RESULTADOS	140
○ Expresión del ARNm de las subunidades <i>Kcnq</i> en el PPN.	140
○ Expresión de las proteínas KCNQ por inmunofluorescencia en el PPN.....	142
○ Electrofisiología	¡Error! Marcador no definido.
○ Ciclo sueño-vigilia.....	150
DISCUSIÓN	153
CONCLUSIONES	159

CAPÍTULO 4: Estudios genéticos en pacientes con Síndrome de QT alargado: KCNQ1, KCNH2 y SCN5A en enfermedades cardíacas.....	160
RESULTADOS	160
• Población analizada.....	160
• Variantes alélicas encontradas	161
– Secuenciación de KCNQ1.....	162
– Secuenciación de KCNH2.....	163
– Secuenciación de SCN5A	164
• Estructura tridimensional de las proteínas	166
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	176
PUBLICACIONES y CONGRESOS	215
Internacionales:.....	215
Nacionales:.....	215
FINANCIACIÓN	217

RESUMEN

Los canales KCNQ son canales de potasio activados por voltaje, cuya función principal es regular la excitabilidad de neuronas y fibras musculares cardíacas. En neuronas, generan la corriente M (I_M), que eleva el umbral para la generación de potenciales de acción, limitando su sobreactividad. Variantes en los genes *Kcnq2/3* fueron vinculadas con epilepsias neonatales, y trastornos del espectro autista (TEA). Dentro del SNC, la expresión de KCNQ4 está restringida a ciertas áreas cerebrales, como algunos núcleos del Sistema Activador Reticular (RAS), cuya función es desconocida. Alteraciones en KCNQ1, presente en cardiomiocitos, causan canalopatías cardíacas como el Síndrome de QT Largo (SQTL).

El capítulo 1 de esta tesis se centró en la generación de un modelo murino de autismo, inducido por la exposición prenatal al ácido valproico, a fin de evaluar alteraciones epigenéticas y conductuales detrás de este trastorno. Si bien no se logró inducir el fenotipo autista en los ratones, su caracterización permitió estandarizar experimentos que se realizaron en capítulos posteriores. Intervenciones ambientales tempranas durante el neurodesarrollo, como la dieta cetogénica (KD), pueden mejorar la condición de individuos con TEA. Con el objetivo de caracterizar los efectos epigenéticos y conductuales de los cuerpos cetónicos, en el capítulo 2 se administró una KD a ratones, y se evaluó su impacto sobre conductas animales y la expresión de genes involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal (*Kcnq2-5*), del estrés oxidativo (*Sod1* y *Sod2*) y la memoria (*Chrna7*, *Chrna4* y *Chrb2*). En ratones KD, se encontró un aumento de la sociabilidad, y un cambio en la memoria de reconocimiento a corto plazo. En animales adultos, la expresión de *Sod1* y *Sod2* aumentó, resaltando el potencial de la KD en la modulación de vías de estrés oxidativo, que podría explicar sus efectos neuroprotectores. La expresión de *Chrna7*, *Chrna4* y *Chrb2* disminuyó, lo cual podría relacionarse con el deterioro en la memoria de reconocimiento. También aumentó la expresión de *Kcnq2* y *Kcnq5*, que podrían modular la excitabilidad neuronal, siendo parte responsable del potencial terapéutico de la KD en TEA y epilepsia.

El núcleo pedúnculo pontino (PPN), integrante del RAS, presenta I_M en neuronas colinérgicas. De allí que, el capítulo 3 se enfocó en el análisis de la expresión de las

subunidades KCNQ, y en la determinación del rol funcional de KCNQ4 en el PPN. Se demostró la presencia de KCNQ2-5 en el PPN, y que la ausencia de KCNQ4 modifica el patrón de expresión de otras subunidades, lo cual influye en la adaptación de la frecuencia de gatillado neuronal. Además, KCNQ4 contribuiría en la adaptación de los ciclos de sueño-vigilia a los cambios ambientales de luz.

Finalmente, el capítulo 4 se centró en la pesquisa de variantes alélicas en pacientes con diagnóstico clínico de SQT, enfocada en los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*. El análisis permitió la detección de variantes genéticas tanto benignas como patogénicas en los distintos genes para un mismo individuo, y también proporcionó información valiosa para un asesoramiento terapéutico más adecuado.

Conjuntamente, esta tesis aporta información valiosa sobre varios puntos clave respecto a los canales KCNQ y sus implicaciones en trastornos neurológicos y cardíacos, así como el papel de la dieta cetogénica en el tratamiento de ciertas condiciones patológicas.

ABSTRACT

KCNQ channels are voltage-gated potassium channels whose primary function is to regulate the excitability of neurons and cardiac muscle fibers. They generate the M current (I_M) in neurons, which raises the threshold for action potentials, limiting neuronal overactivity. Variants in the *Kncq2/3* genes have been linked to neonatal epilepsies and autism spectrum disorders (ASD). On the other hand, within the CNS, the expression of KCNQ4 is restricted to certain brain areas, such as some nuclei of the Reticular Activating System (RAS), with an unknown function. Alterations in KCNQ1, which is located in cardiomyocytes, cause cardiac channelopathies like Long QT Syndrome (LQTS).

The first chapter of this thesis is focused on generating a murine model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid, to evaluate epigenetic and behavioral alterations underlying this disorder. However, the autistic phenotype was not induced in mice. Early environmental interventions during neurodevelopment can improve the condition of individuals with ASD. Particularly, the ketogenic diet (KD) has been beneficial in such patients. To characterize the epigenetic and behavioral effects of ketone bodies, in chapter 2, a KD was administered to mice, and assessed its impact on animal behavior and the expression of genes involved in regulating neuronal excitability (*Kcna2-5*), oxidative stress control (*Sod1 and Sod2*) and memory processing (*Chrna7, Chrna4, and Chrb2*). KD mice showed an increase in sociability, and changes in short-term recognition memory. In adult mice, the expression of *Sod1* and *Sod2* increased, highlighting KD's potential role in modulating oxidative stress pathways, which could explain its neuroprotective effects. The expression of *Chrna7, Chrna4, and Chrb2* decreased, explaining the impairment observed in recognition memory. The expression of *Kcnq2* and *Kcnq5* also increased, which could modulate neuronal excitability, contributing to KD's therapeutic potential in ASD and epilepsy.

The pedunculopontine nucleus (PPN) is a member of the RAS, where the presence of I_M in cholinergic neurons was reported. Hence, chapter 3 of this thesis focused on analyzing the expression of KCNQ subunits in the PPN, and determining the functional role of KCNQ4 in this nucleus, using a murine model that lacks the expression of KCNQ4. Here

the expression of all neuronal KCNQ subunits was demonstrated in the PPN. In turn, the absence of KCNQ4 causes altered the expression pattern of the other subunits, which is reflected in the neurons' spike frequency adaptation. Additionally, KCNQ4 would contribute to the adaptation of sleep-wakefulness cycles to environmental light changes.

Lastly, chapter 4 focused on the screening for allelic variants in patients with a clinical diagnosis of LQTS. The study centered on the genes that encode the potassium channels KCNQ1 and hERG, and the sodium channel $Na_v1.5$. The analysis allowed the detection of both benign and pathogenic genetic variants of different genes in the same individual, that could be associated with prolonged QT intervals. Likewise, the genetic diagnosis of LQTS provided valuable information for more appropriate therapeutic advice.

This thesis summarizes key points about KCNQ channels and their implications in neurological and cardiac disorders, as well as the role of the ketogenic diet in the treatment of certain conditions.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.



Director de la tesis: Dr. Guillermo Spitzmaul

LISTA DE ABREVIACIONES

ACh	acetilcolina
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AG	ácidos grasos
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
AVP	ácido valproico
BB	beta-bloqueante
BHB	β -hidroxibutirato
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	albúmina de suero bovino
Ca ⁺⁺	ion calcio
ChAT	colinacetiltransferasa
CICUAE	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
Cx	corteza prefrontal
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EE	encefalopatía epiléptica
F	hembras
GD	día gestacional
GOT/AST	Transaminasa glutámico-oxálica (o aspartato aminotransferasa)
HDAC	histona deacetilasas
HPC	hipocampo
I _{Ks}	corriente rectificadora de potasio lenta

I _{Kr}	corriente rectificadora de potasio rápida
I _{Na}	corriente de sodio
I _M	corriente M
IF	inmunofluorescencia
K ⁺	ion potasio
KD	dieta cetogénica
KO	<i>knock-out</i>
M	machos
nAChR	receptor nicotínico de acetilcolina
NGS	suero normal de cabra (del inglés, <i>normal goat serum</i>)
NTC	control sin material genético (del inglés, <i>no template control</i>)
P	día postnatal
PBS	Buffer fosfato
PFA	paraformaldehído
PIP2	fosfolípido fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PPI	inhibición por prepulso (del inglés, <i>prepulse inhibition</i>)
PPN	núcleo pedúnculo pontino
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RAS	Sistema Activador Reticular
RQ	Cuantificación relativa (del inglés, <i>relative quantification</i>)
RT	transcripción reversa
SD	desvío estándar de la media (del inglés, <i>standard deviation</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central
SQTL	Síndrome de QT largo

TEA	Trastornos del Espectro Autista
VSD	dominio sensor de voltaje
VTA	Área tegmental ventral
WT	<i>wild-type</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Canales de potasio KCNQ

Los canales de potasio permiten el paso de iones K^+ a través de la membrana celular a favor de su gradiente electroquímico. Esta conducción de K^+ desempeña un papel crucial en numerosos procesos celulares y fisiológicos, como la regulación del volumen celular, la secreción hormonal, y la generación de impulsos eléctricos en células excitables (MacKinnon, 2003). Estos canales son responsables de establecer el potencial de membrana en reposo, reducir la excitabilidad de las neuronas, y controlar la duración y la frecuencia de activación de los potenciales de acción (Greene & Hoshi, 2017). Existen cuatro familias de canales de potasio: los activados por voltaje (K_v), los rectificadores de entrada (K_{ir}), los activados por calcio (K_{Ca}), los canales de potasio con dominio de dos poros (K_{2P}), y los activados por sodio (K_{Na}) (Taura et al., 2021).

Los canales KCNQ (K_v7) pertenecen a la familia K_v , es decir que son canales de potasio activados por voltaje, cuya apertura se produce ante cambios en el potencial de membrana. Sin embargo, más recientemente, se ha determinado que también pueden ser activados por ligandos, y su apertura puede ser modulada por diversos neurotransmisores, hormonas y fármacos (Abbott, 2020; R. W. Manville et al., 2018). Son canales con una cinética de activación lenta cuyo umbral de apertura se encuentra cerca del potencial de membrana en reposo, y producen una corriente saliente de potasio. Esto los vuelve efectivos en la repolarización durante la generación sostenida de potenciales de acción y, a su vez, su apertura genera un potencial de membrana más negativo, que incrementa el intervalo entre gatillados y así reduce la excitabilidad celular (Delmas & Brown, 2005; Jentsch, 2000). Las subunidades neuronales de los canales KCNQ se expresan ampliamente en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), donde la corriente rectificadora de potasio funciona como un freno para la hiperexcitabilidad neuronal (Delmas & Brown, 2005).

- **Estructura del canal y propiedades biofísicas**

Los canales de potasio KCNQ son proteínas tetraméricas, que requieren del ensamblado de 4 subunidades α para generar un canal funcional. Estas unidades pueden ser homotetraméricas, si poseen cuatro copias de una misma subunidad, o heterotetraméricas cuando están conformadas por subunidades diferentes, lo que confiere una gran diversidad a estos canales (David A. Brown & Passmore, 2009).

Cada una de las subunidades α consiste en una estructura de seis segmentos transmembrana, donde S1-S4 constituyen el dominio sensor de voltaje (VSD), y S5-S6 forman el dominio del poro (PD). El loop que conecta S5-S6 contiene un filtro de selectividad para el ion K^+ . Tienen también un extremo N-terminal corto y uno C-terminal largo, ambos intracelulares (Jentsch, 2000) (**Figura 1A**). Cuando las 4 subunidades se ensamblan, se forma un canal iónico con un poro central que permite el pasaje de K^+ , y alrededor del mismo se ubican los dominios sensores de voltaje de cada subunidad (**Figura 1B**) (Borgini et al., 2021; Jiang, 2021; Soldovieri et al., 2011). Los extremos C terminales de todas las subunidades forman una compuerta que impide el paso de los iones cuando el canal está cerrado (Robbins, 2001; Y. Zheng et al., 2022). Los KCNQ son canales dependientes de voltaje, por lo que requieren de un potencial de membrana específico para su apertura. Además, para su apertura necesitan de un cofactor, el lípido de membrana fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) (Sun & MacKinnon, 2020; Taylor & Sanders, 2017; Zaydman & Cui, 2014). El VSD de estos canales contiene en el S4 argininas cargadas positivamente, cada una separada por residuos no polares, esos residuos básicos periódicos detectan el potencial de membrana (Jepps et al., 2021). El VSD sufre cambios conformacionales en respuesta a cambios en el potencial de membrana. A su vez, S1 y S2 dentro del VSD contienen residuos ácidos que protegen a S4 tras la despolarización de la membrana (Abbott, 2020).

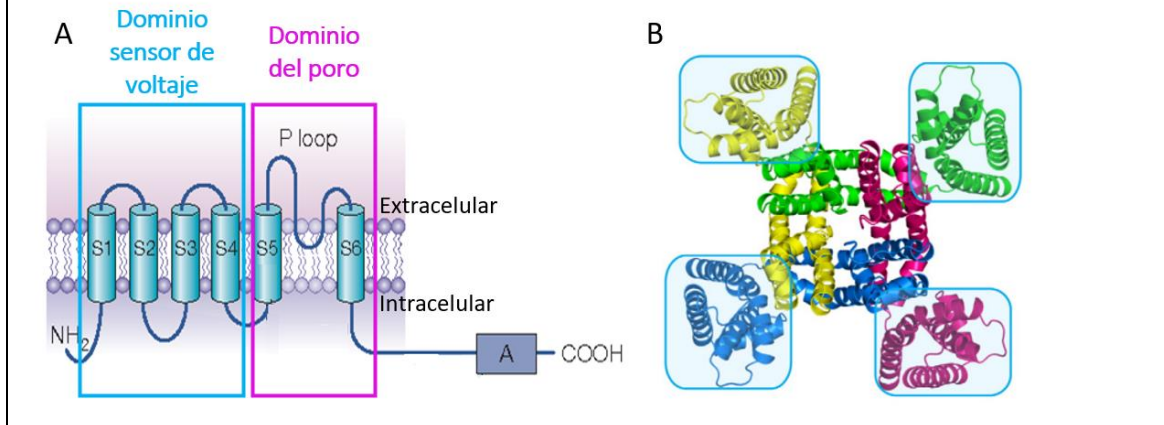
Los KCNQ son canales con una cinética de activación lenta. Se activan a potenciales de membrana negativos, similares al potencial de membrana en reposo de la mayoría de las células. Debido a que su umbral de activación es bajo, una despolarización leve aumenta su probabilidad de apertura (David A. Brown & Passmore, 2009). Estos canales existen en dos estados conformacionales: abierto y cerrado. Se abren ante un cambio en el potencial

de membrana, y eso permite el flujo de iones. Luego se cierran, impidiendo el paso de iones, y así vuelven al estado de reposo, y están disponibles para una posterior activación (Xiong et al., 2008).

La apertura de los canales KCNQ ocurre en tres pasos principales: activación del VSD, acoplamiento entre el VSD y el PD y apertura del poro. El VSD detecta los cambios en el potencial de membrana y sufre un cambio conformacional ante una despolarización. Así, el VSD pasa del estado de reposo, al estado activado. Durante este proceso, la región citoplasmática de los segmentos S6 de las cuatro subunidades se mueve, y el poro se abre, permitiendo el paso de iones K^+ (Abbott, 2020; Taylor & Sanders, 2017). No se conoce completamente como ocurre el acoplamiento entre el VSD y el PD, aunque hay evidencias que indican que PIP2 estaría involucrado en ese proceso, facilitando la apertura del canal y, a su vez, estabilizando su conformación en estado abierto (Barrese, Stott, & Greenwood, 2018; Zaydman et al., 2013; Y. Zheng et al., 2022). De hecho, en ausencia de PIP2 se ha demostrado que estos canales permanecen cerrados (Zaydman et al., 2013).

Los canales KCNQ, al igual que otros canales K_v , también responden a ligandos. Por un lado, dado que requieren de PIP2 para activarse, se ha considerado que esta molécula actuaría como un ligando que abriría el poro del canal (Abbott, 2020; Zaydman et al., 2013). A su vez, los KCNQ neuronales son sensibles al anticonvulsivante retigabina, y en presencia de este fármaco aumenta la corriente de estos canales sin necesidad de que cambie el voltaje de membrana (Abbott, 2020; Y. Huang et al., 2023). Con el mismo criterio, metabolitos endógenos como el cuerpo cetónico β -hidroxibutirato (BHB), también pueden activar a los canales neuronales, generando un efecto inhibitorio sobre la actividad neuronal, de allí su uso como antiepiléptico (R. W. Manville et al., 2020). Ambas moléculas poseen un grupo carbonilo que les otorga un potencial electrostático negativo en su superficie, que es lo que les da la capacidad de interactuar con los residuos del canal para activarlo. Siguiendo este razonamiento, el neurotransmisor GABA también sería un ligando capaz de activar los canales KCNQ neuronales, sin embargo sólo se ha visto que GABA es capaz de aumentar la corriente de potasio mediada por ciertas subunidades KCNQ, una vez que estas ya fueron activadas (Abbott, 2020; R. W. Manville et al., 2018).

Figura 1: Estructura de los canales de potasio KCNQ. A) Subunidad α del canal. B) Vista desde arriba del canal KCNQ, formado tras el ensamblaje de cuatro subunidades α . En celeste se observan los segmentos que conforman el dominio sensor de voltaje. En rosa se observan los segmentos que conforman el dominio del poro. Inspirada en (Taylor & Sanders, 2017).



o Localización de las subunidades KCNQ

La subfamilia de canales Kv7 está conformada por 5 subunidades KCNQ, KCNQ1 a 5, que están codificados a su vez por 5 genes *KCNQ* (*KCNQ1-5*). Particularmente, *KCNQ2-5* son los canales neuronales, mientras que *KCNQ1* se encuentra por fuera del Sistema Nervioso (Singh et al., 2022; J. J. Wang & Li, 2016).

Mientras que todas las subunidades pueden ensamblarse en canales homoméricos, la capacidad de heterómeros es muy variable. Particularmente, *KCNQ3* se ensambla conjuntamente con varios otros subtipos de *KCNQ*, mientras que *KCNQ1* y *KCNQ2* no lo hacen. Dentro de los heterómeros más encontrados se encuentra el formado por subunidades *KCNQ2* y *KCNQ3*. Asimismo, *KCNQ3* se ensambla con *KCNQ4*, que a su vez puede formar heterómeros con *KCNQ5* (Bal et al., 2008). La comprensión de las diferentes composiciones de subunidades de los canales *KCNQ* es importante porque afectan las propiedades eléctricas de los canales. Por ejemplo, la expresión de *KCNQ2* y *KCNQ3* individualmente produce sólo pequeñas corrientes de potasio, mientras que los heterómeros *KCNQ2/3* producen corrientes 10 veces mayores.

Por otro lado, estos canales KCNQ suelen estar asociados a las proteínas KCNE en diferentes tipos celulares, y esto puede tener varios efectos sobre la función de los canales de potasio. Las proteínas KCNE pueden afectar la cinética de activación e inactivación de los canales KCNQ, alterando así la forma en que los canales responden a los cambios en el voltaje de la membrana. También pueden afectar la sensibilidad de los canales KCNQ a ciertos ligandos, lo que puede modular su actividad. La presencia de proteínas KCNE puede influir en la conductancia iónica de los canales KCNQ (Xiaoming Zhang & Hughes, 2013). El caso más conocido es el de KCNQ1, que se ensambla con las subunidades β de KCNE1 para formar corrientes de potasio en el corazón y el oído (Bal et al., 2008; Robbins, 2001).

– *Subunidades extra neuronales*

KCNQ1 (Kv7.1) se ha localizado en cardiomiocitos, donde participa en la repolarización del potencial de acción cardíaco (M. Sanguinetti et al., 1996). También se ha reportado su expresión en el oído interno (Hibino et al., 2010), en el tracto gastrointestinal (Than et al., 2014; Thompson et al., 2021) y en el músculo liso vascular (F. L. Ng et al., 2011).

KCNQ1 se ha encontrado en miocardio asociado a la proteína KCNE1 como subunidad auxiliar. Esta interacción ralentiza la cinética de activación, aumenta la probabilidad de apertura de KCNQ1, aumenta el número de canales en la membrana, y aumenta la conductancia del canal (Lundby et al., 2010; M. Sanguinetti et al., 1996; Wu & Larsson, 2020). KCNQ1, en asociación con las proteínas KCNE1, es responsable de la corriente rectificadora lenta de potasio (I_{Ks}) observada durante la fase de repolarización tardía del potencial de acción ventricular. Por lo tanto, contribuye a regular el intervalo QT (Nerbonne & Kass, 2005; Wu & Larsson, 2020). En condiciones normales, la I_{Ks} tiene un papel menor en la repolarización ventricular y en la determinación de la duración del potencial de acción. Sin embargo, su participación se vuelve relevante durante el aumento de la frecuencia cardíaca. Cuando existen alteraciones en la I_{Ks} , se prolonga la duración del potencial de acción cardíaco, lo que predispone a arritmias (Barrese, Stott, & Greenwood, 2018; S. Kato et al., 2012). Este concepto se explicará detalladamente en un apartado posterior.

A su vez, KCNQ1, también asociado a KCNE1, se ha identificado en el oído interno, y allí interviene en la recirculación del potasio. Se encuentra altamente expresado en las células marginales de la *stria vascularis*, donde participa del transporte unidireccional de potasio desde dichas células hacia la endolinfa, siendo así indispensable para generar el potencial endococlear y garantizar la correcta función de las células ciliadas de la cóclea (Hibino et al., 2010; M. Sanguinetti et al., 1996; J. J. Wang & Li, 2016).

– *Subunidades neuronales*

A nivel del sistema nervioso se encuentran expresadas las subunidades KCNQ2 a KCNQ5 (Kv7.2 a Kv7.5), que se localizan en células neuronales y sensoriales (Singh et al., 2022; Soldovieri et al., 2011). Una amplia variedad de neuronas en el SNC, así como neuronas periféricas, expresan las subunidades KCNQ2, 3 y 5, las cuales generan la denominada corriente M (I_M) neuronal (Delmas & Brown, 2005; Jentsch, 2000; J. J. Wang & Li, 2016).

KCNQ2 y KCNQ3 se han identificado en diversas áreas cerebrales, en las cuales colocalizan. Se encuentran principalmente en neuronas piramidales corticales e hipocámpales, donde se encargan de modular la excitabilidad de las células (Peters et al., 2005; Soh et al., 2014). Se estima que la I_M clásica está mediada principalmente por los heterómeros KCNQ2/KCNQ3 (Etxeberria et al., 2004).

Particularmente, KCNQ2 y KCNQ3 han sido identificados como componentes funcionales de los segmentos iniciales de los axones de neuronas excitatorias, y en los nodo de Ranvier (Devaux et al., 2004; Fidzinski et al., 2015), estructuras involucradas en la generación y conducción de potenciales de acción, respectivamente. Estos canales generan una corriente lenta de potasio no inactivante (la I_M), la cual permite la generación de un potencial de acción, pero previene disparos repetitivos (Battefeld et al., 2014; Soh et al., 2014). Ambos canales son entonces importantes en la regulación de la excitabilidad neuronal, y mutaciones en los mismos están asociadas con epilepsia neonatal (Hu et al., 2023; N. Du Yang et al., 2022) y desórdenes psiquiátricos (Barrese, Stott, & Greenwood, 2018).

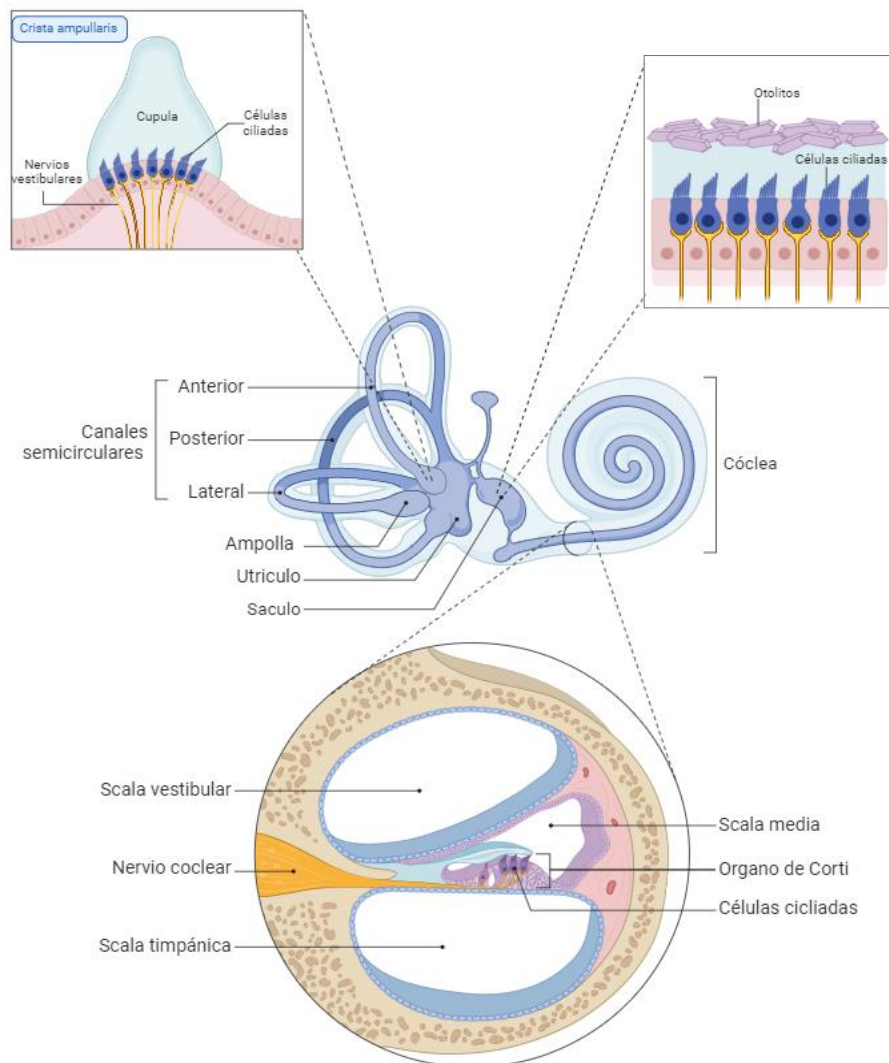
Se ha demostrado la presencia de KCNQ3 en el hipocampo, más prominentemente en el subículo, fibras musgosas, en el ventrículo lateral y en células piramidales de las áreas CA1 y CA2 (A. V. Tzingounis et al., 2010), mientras que KCNQ2 se localiza principalmente en neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3, y en el giro dentado (Klinger et al., 2011). Tanto las interneuronas del área CA1 como las del giro dentado del hipocampo exhiben una localización somatodendrítica de KCNQ2/3, que se encargan de regular el intervalo entre gatillados (Carver et al., 2020). Además, KCNQ2 y KCNQ3 se expresan en neuronas del núcleo central de la amígdala (CeA), una región cerebral involucrada en la regulación de la actividad simpática eferente, y así en la presión sanguínea (Sheng et al., 2022). En ratas se encontró que la regulación a la baja de estos canales incrementa los gatillados de las neuronas del CeA, y en consecuencia los animales presentaban hipertensión (Barrese & Tagliatela, 2022; Sheng et al., 2022).

En cuanto a KCNQ4, se expresa en el sistema auditivo en el polo basal de las células ciliadas externas de la cóclea, en las células ciliadas internas (**Figura 2**), en neuronas del ganglio espiral, en el núcleo coclear ventral anterior y posterior, el complejo olivar superior lateral y medio, y en algunos núcleos del lemnisco lateral y del colículo inferior (Beisel et al., 2005; Carignano et al., 2019; Kharkovets et al., 2000; Kubisch et al., 1999). En la cóclea, el canal KCNQ4 permite la salida de iones K^+ de las células ciliadas, para mantener la homeostasis de este ion, y previene así la despolarización sostenida de dichas células (Kharkovets et al., 2000).

KCNQ4 también ha sido identificado en el sistema vestibular del oído interno (Lysakowski et al., 2011; Spitzmaul et al., 2013). Las principales estructuras del sistema vestibular son los canales semicirculares, donde se encuentran las crestas ampulares, y el utrículo y el sáculo, que contienen a los otolitos (**Figura 2**). El epitelio vestibular contiene células sensoriales ciliadas de tipo I y II, cuya función principal es el control del equilibrio corporal y la posición de la cabeza (Spaiardi et al., 2022). La membrana basolateral de las células ciliadas de tipo I está envuelta por neuronas aferentes que tienen forma de cáliz; este cáliz vestibular es postsináptico (Lysakowski et al., 2011). Dado que la superficie apical de estas células está rodeada de endolinfa, una sustancia con alta concentración de potasio, al recibir un estímulo, el K^+ ingresa a la célula ciliada y la despolariza, y esto desencadena la

liberación de vesículas sinápticas de glutamato hacia terminales aferentes que envuelven a estas células ciliadas. KCNQ4 ha sido identificado en las regiones estriolar central y yuxtastriolar adyacente del utrículo. Asimismo, KCNQ4 se encontró en las zonas central, intermedia y periférica de las crestas ampulares (Spitzmaul et al., 2013). Particularmente, KCNQ4 se localiza en la membrana interna de los cálices aferentes, que está en contacto con el polo basal de las células ciliadas de tipo I (Lysakowski et al., 2011; Spitzmaul et al., 2013), en donde contribuiría a modular la excitabilidad del terminal aferente.

Figura 2: Anatomía del oído interno: la cóclea y el sistema vestibular.



La expresión de KCNQ4 en SNC se encuentra más limitada, a diferencia de las otras subunidades neuronales. Hasta el momento se lo ha encontrado, además de los núcleos cerebrales que integran el sistema auditivo antes mencionados, en los núcleos trigeminales (Delmas & Brown, 2005; Kharkovets et al., 2000), en ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Heidenreich et al., 2011), y núcleos que integran el sistema activador reticular (RAS), como los núcleos del rafe y el área tegmental ventral (VTA) (Hansen et al., 2008; Kharkovets et al., 2000; Koyama & Appel, 2006).

Además de su expresión dentro del Sistema Nervioso, los canales KCNQ4 se han identificado en el músculo liso de arterias, donde modulan el tono vascular, y median respuestas a vasodilatadores endógenos (Haick & Byron, 2016; Stott et al., 2016; Zavaritskaya et al., 2013). Estos canales se expresan específicamente en las arterias renales donde, al regular el diámetro arterial, podrían modular la activación del sistema renina-angiotensina (Barrese, Stott, & Greenwood, 2018; Barrese & Tagliatela, 2022). Además, se ha observado expresión y función reducidas de Kv7.4 en modelos murinos de hipertensión, posiblemente debido a mecanismos postranscripcionales provocados por la hiperactivación del sistema renina-angiotensina (Barrese, Stott, Figueiredo, et al., 2018; Jepps et al., 2011).

Los miocitos cardíacos expresan KCNQ4, el cual está localizado en la membrana interna mitocondrial y contribuye a la regulación de potencial de membrana mitocondrial (Testai et al., 2016). KCNQ4 también está localizado en membrana mitocondrial de neuronas, donde regula el potencial de acción mitocondrial (Paventi et al., 2022).

Por último, la subunidad neuronal KCNQ5 se encuentra altamente expresada en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (A. V. Tzingounis et al., 2010), donde contribuye en la fase de hiperpolarización (AHP, del inglés *afterhyperpolarization*) del potencial de acción neuronal. La AHP puede dividirse en tres fases: rápida (fAHP), mediana (mAHP) y lenta (sAHP), en función de la velocidad y duración de la hiperpolarización. La fAHP facilita la rápida repolarización de la membrana neuronal luego de que se dispara un potencial de acción. La mAHP es de duración intermedia y ocurre más rápidamente después del potencial de acción, mientras que la sAHP es más lenta y puede persistir durante un período más largo después del potencial de acción. Ambos tipos de AHP, tienen

implicaciones en la regulación de la excitabilidad neuronal y en la capacidad de las neuronas para generar potenciales de acción sucesivos, por lo que está involucrada en la determinación de la frecuencia de disparo de una neurona (Madison & Nicoll, 1984). La fAHP se ha demostrado que es generada por la apertura de canales de potasio dependientes de calcio BK (Matthews et al., 2009; J. F. Storm, 1987). KCNQ5 contribuye a la mAHP y sAHP en células piramidales del área CA3 del hipocampo (A. V. Tzingounis et al., 2010). Por otro lado, los canales de potasio KCNQ2 y KCNQ3 participan en la sAHP en células del giro dentado del hipocampo (Laker et al., 2021; Anastassios V Tzingounis & Nicoll, 2008).

A su vez, KCNQ5 desempeña un rol en la regulación de la inhibición sináptica en el hipocampo. Este canal de potasio se localiza en el sitio postsináptico de las sinapsis inhibitorias (GABAérgicas y glicinérgicas) en las células piramidales y en interneuronas (Fidzinski et al., 2015). Se ha demostrado que en ausencia de subunidades KCNQ5 funcionales, dichas células hipocámpales presentan una mayor excitabilidad, dado que aumentaría la inhibición sináptica (Fidzinski et al., 2015).

KCNQ5, al igual que KCNQ4, se expresa en sistema vestibular en los terminales del cáliz que envuelven a las células ciliadas de tipo I. Sin embargo, no colocalizan. Se encuentra principalmente en la extrastriola del utrículo, y en las zonas intermedias y periféricas de las crestas ampulares, que corresponden a los cálices generados por las neuronas aferentes dimórficas del ganglio vestibular (Spitzmaul et al., 2013). KCNQ5 se encuentra también en neuronas que integran los núcleos cocleares, así como también en neuronas presinápticas del núcleo medial del cuerpo trapezoide, específicamente en el cáliz de Held (H. Huang & Trussell, 2011).

KCNQ5 ha sido identificado en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) de monos y ratas, aunque no se conoce específicamente el rol de este canal en la retina. Se detecta en dichas células una corriente de potasio de tipo M (Caminos et al., 2015; Pattnaik & Hughes, 2012). KCNQ5 se localiza en la capa nuclear externa de la retina, que contiene los somas de los conos y bastones (fotorreceptores), y en la capa nuclear interna, que incluye los cuerpos de células amacrinas y de Müller (Xiaoming Zhang et al., 2011).

Finalmente, KCNQ5 también se localiza por fuera del Sistema Nervioso. Ha sido identificado en las células musculares lisas de arterias pequeñas, en donde sirve como intermediario en la regulación del tono vascular (Yeung et al., 2007). Particularmente, la activación de este canal provoca la hiperpolarización de la membrana de las células y desencadena la relajación del músculo liso vascular, lo que permite regular la presión sanguínea (Tsvetkov et al., 2024).

○ Corriente M

Los KCNQ neuronales generan la denominada corriente M (I_M), una corriente de potasio no inactivante, que se abre a potenciales por debajo del voltaje umbral para el gatillado de potenciales de acción. La I_M recibe su nombre porque es inhibida por la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina (ACh) (D. A. Brown & Adams, 1980; C. C. Hernandez et al., 2008). Esta corriente permite elevar el umbral de gatillado de potenciales de acción, de esa manera limita el gatillado de las neuronas, y así pone un freno a la sobreactividad neuronal (David A. Brown & Passmore, 2009; Delmas & Brown, 2005; Greene & Hoshi, 2017).

La I_M contribuye a la mAHP y sAHP del potencial de acción (B. Y. J. F. Storm, 1989; Anastassios V Tzingounis & Nicoll, 2008), y esa disminución del potencial de membrana por debajo del nivel de reposo conduce a una disminución de la frecuencia de gatillado, afectando la tasa de activación neuronal (Bordas et al., 2015; Madison & Nicoll, 1984). Se ha demostrado que la supresión de la I_M baja el umbral del potencial de acción, llevando a un incremento de la excitabilidad celular (Delmas & Brown, 2005; Shapiro et al., 2000). En su ubicación presináptica, esta corriente controla la liberación de vesículas sinápticas (H. Huang & Trussell, 2011).

La I_M es generada por conjuntos heterotetraméricos y homotetraméricos de subunidades KCNQ, siendo los heterómeros KCNQ2/3 la forma más abundante (Robbins, 2001), mientras que KCNQ4 y KCNQ5 sólo contribuyen mínimamente a dicha corriente de potasio (Delmas & Brown, 2005; Jentsch, 2000).

Patologías vinculadas a canales KCNQ

Existen numerosas mutaciones que afectan funcionalmente a los canales de potasio KCNQ, que han sido vinculadas con diversas patologías.

Se han identificado mutaciones en el gen *KCNQ1*, que producen canalopatías con pérdida de función, que llevan a alteraciones en la I_{Ks} , se prolonga la duración del potencial de acción cardíaco, lo que predispone a arritmias (Barrese, Stott, & Greenwood, 2018; S. Kato et al., 2012), y más específicamente se han asociado con el síndrome de QT-alargado (SQTL) tipo 1 (Al-Ahmad & Wilde, 2014; Fosmo & Skraastad, 2017; Peroz et al., 2008). Las mutaciones genéticas en *KCNQ1* también afectan la función de la *stria vascularis*, y pueden así alterar la homeostasis de la endolinfa, y en consecuencia causar pérdida auditiva (Li Zhang et al., 2020).

El síndrome de Jervell y Lange-Nielsen es una enfermedad autosómica recesiva, y está asociado a mutaciones en ambos alelos del gen *KCNQ1*, que resultan en un mal funcionamiento del canal. Esto lleva a una severa prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma, lo que aumenta el riesgo de arritmias cardíacas y muerte súbita a edades tempranas, y además causa sordera bilateral (Al-Ahmad & Wilde, 2014). La combinación de la prolongación del intervalo QT y la hipoacusia en el síndrome de Jervell y Lange-Nielsen sugiere la importancia de la función normal de *KCNQ1* en ambos sistemas, el cardiovascular y el auditivo. Existe otra canalopatía en el cual los pacientes presentan SQTL que no se acompaña de sordera congénita, conocido como síndrome de Romero-Ward, que se hereda de forma autosómica dominante (sólo un alelo alterado) (Zehelein et al., 2004).

Los canales *KCNQ2* y *KCNQ3* son importantes en la regulación de la excitabilidad neuronal, y mutaciones en los mismos están reportadas como causantes de epilepsia neonatal benigna y encefalopatía epiléptica (EE). Ambas implican el padecimiento de convulsiones neonatales, pero la primera remite espontáneamente sin mayores daños, mientras que la segunda genera deterioro intelectual (Hu et al., 2023; M. Kato et al., 2013; E. C. Kim et al., 2020; Miceli et al., 2023; Miceli, Soldovieri, et al., 2022; N. Du Yang et al., 2022). Se han identificado variantes genéticas en *Kcnq2* cuya presencia se asocia con una reducción en

la expresión y funcionalidad del canal KCNQ2, lo que resulta en una supresión de la I_M neuronal, que se manifiesta como un cuadro epiléptico (Chokvithaya et al., 2023; P. Nappi et al., 2020; Peters et al., 2005). Justamente, KCNQ2 interviene en la regulación de la AHP en el hipocampo, y mutaciones en el mismo provocan una hiperexcitabilidad neuronal (Soh et al., 2014; Anastassios V Tzingounis & Nicoll, 2008). Particularmente, en los últimos años, KCNQ2 ha sido vinculado también con desórdenes del neurodesarrollo, caracterizados por déficit cognitivo y conductual (Baculis et al., 2020; Barrese, Stott, & Greenwood, 2018).

A diferencia de los demás KCNQ, la función de la subunidad KCNQ5 sigue siendo desconocida, y sólo recientemente se ha encontrado que variantes en el gen *KCNQ5* podrían estar vinculadas al desarrollo de determinadas patologías. Debido a que en estudios poblacionales realizados en China se han encontrado numerosos polimorfismos en el gen *KCNQ5* en pacientes con anomalías oculares, de allí que *KCNQ5* comenzó a asociarse a miopía severa (Liao et al., 2017). Aunque se desconoce el rol que ocupa este canal en dicha patología, se sospecha que las alteraciones del canal KCNQ5 podrían afectar la homeostasis del potasio en la retina y a la corriente tipo M que se localiza allí, y que esos factores estarían asociados al desarrollo de miopía (Q. Yang et al., 2021).

A su vez, se han identificado mutaciones en *KCNQ5* que interfieren con la función del canal, y desencadenan trastornos congénitos del neurodesarrollo con fenotipos de discapacidad intelectual no sindrómica o EE (Lehman et al., 2017; M. Nappi et al., 2022).

Aunque aún no existen mutaciones en humanos en el gen *KCNQ5* que se asocien con hipertensión, en modelos animales KO para dicho gen se ha detectado la elevación de la presión arterial media en los ratones, a través de un mecanismo que no se relaciona con una perturbación del barorreflejo. Este efecto se debe a la ausencia del canal KCNQ5 en células musculares lisas de arterias pequeñas, en las que entonces no puede actuar en la vasodilatación mediada por oxilipinas derivadas del tejido adiposo perivascular (Tsvetkov et al., 2024).

○ Mutaciones en *KCNQ4*

Las mutaciones en el gen *KCNQ4* llevan a una pérdida auditiva no sindrómica autosómica progresiva, conocida como DFNA2, caracterizada por la degeneración de las células ciliadas externas y, en menor medida, de las células ciliadas internas de la cóclea (Carignano et al., 2019; Kubisch et al., 1999; Nie, 2008). A partir de estudios poblacionales, se han reportado numerosas variantes patogénicas de *KCNQ4*, dentro de las cuales la mayoría corresponde a mutaciones con pérdida de sentido, situadas en la región cercana al poro del canal (Van Camp et al., 2002; Xiaolong Zhang et al., 2021).

En esta patología existe una correlación entre el genotipo y el fenotipo, es así que, el fenotipo asociado a la pérdida auditiva es diferente de acuerdo a la variante patogénica involucrada (Xiaolong Zhang et al., 2021). Por un lado, la mayoría de estas mutaciones tienen un fuerte efecto dominante negativo, con la formación de una gran mayoría de canales disfuncionales, y la reducción de alrededor de un 90% de la conductancia de los canales. Por otro lado, el fenotipo anormal podría ser el resultado de una mutación inactivante, donde la combinación de este alelo nulo con uno normal genera una reducción del 50% de la cantidad de canales *KCNQ4* funcionales (haploinsuficiencia) (De Leenheer et al., 2002; Smith & Hildebrand, 2018). Se ha reportado en individuos con DFNA2 un aumento del reflejo vestibulo-ocular en aproximadamente el 30% de los casos (Marres et al., 1997).

Ratones transgénicos que expresan la mutación humana en el gen *Kcnq4*, que carecen entonces de canales *KCNQ4* funcionales (*KCNQ4* KO), se han utilizado como modelos de la enfermedad (Carignano et al., 2019; Kharkovets et al., 2006). Además, esta mutación altera las funciones somatosensoriales debido a la ausencia de *KCNQ4* en los corpúsculos de Meissner, que son receptores sensitivos localizados en dermis, responsables de la sensibilidad al tacto (Heidenreich et al., 2011). A su vez, se ha visto que los ratones heterocigota (sólo un alelo mutado) no manifiestan síntomas de sordera. Esto implica que al menos el 50% de los canales funcionando es necesario para una audición normal (Kharkovets et al., 2006; Nie, 2008).

Recientemente se han desarrollado nuevos modelos murinos transgénicos a partir de mutaciones humanas de *Kcnq4*, que desarrollan una pérdida auditiva progresiva asociada a la degeneración de las células ciliadas externas de la cóclea (Cui et al., 2022; Noh et al., 2022), y se han empleado para el estudio de los mecanismos patológicos detrás de DFNA2, y para evaluar posibles tratamientos farmacológicos que mejoren la audición, así como también el uso de edición genética por CRISPR/Cas9 para aumentar la viabilidad de las células ciliadas externas (Noh et al., 2022).

El canal KCNQ4 ha sido identificado en diversos vasos sanguíneos, donde interviene en la regulación del tono vascular. Particularmente, se ha visto que, tanto en ratones como en tejido humano, aumentos en los niveles de expresión de este canal agrava la respuesta inflamatoria vascular que se desencadena ante una injuria, lo que promueve la formación de aneurismas aórticas. Empleando el modelo animal transgénico *knock-out* (KO) para KCNQ4, se demostró que la ausencia del canal inhibe la formación de aneurismas (Fan et al., 2022).

○ **KCNQ4 en SNC: núcleo pedúnculo pontino**

La subunidad KCNQ4 se localiza en escasos sitios dentro del SNC, como los núcleos cerebrales que integran el RAS, y no se conoce claramente qué rol cumple en cada uno de ellos (Hansen et al., 2008; Kharkovets et al., 2000; Koyama & Appel, 2006). Algunos de los núcleos del tronco encefálico KCNQ4-positivos constituyen también áreas colinoceptivas (Kharkovets et al., 2000; Woolf & Butcher, 2011).

Particularmente, el núcleo pedúnculo pontino (PPN) es uno de los núcleos que integran el RAS (**Figura 3A**) (E. Garcia-Rill et al., 2019; Edgar Garcia-Rill, 1991). Se lo considera un núcleo colinérgico, sin embargo, también cuenta con neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (H. L. Wang & Morales, 2009). El PPN no sólo es fuente de fibras colinérgicas, sino que también recibe estímulos colinérgicos del núcleo tegmental dorsal (LDT), del PPN contralateral y axones colinérgicos colaterales locales (**Figura 3B**) (Honda & Semba, 1995; Mena-segovia et al., 2008; Perez-Lloret & Barrantes, 2016).

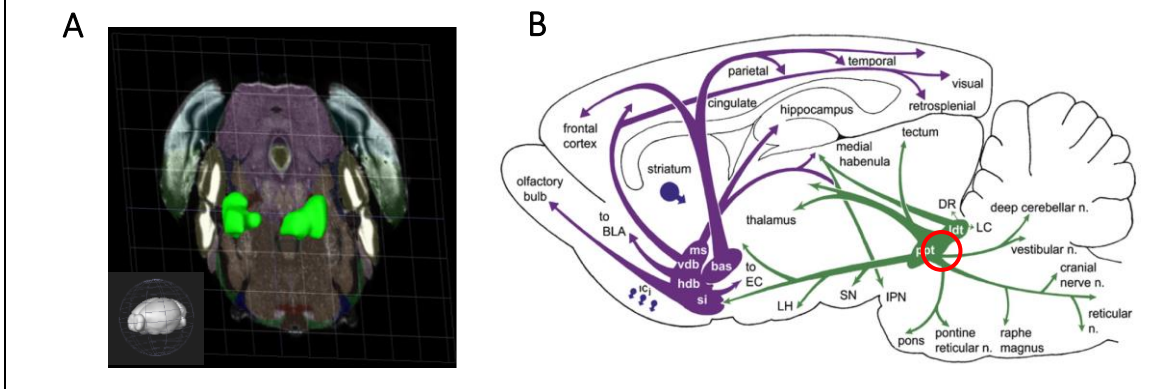
Los sistemas colinérgicos del cerebro de los mamíferos comprenden varias vías (**Figura 3B**), que incluyen neuronas motoras colinérgicas en la médula espinal y el cerebro posterior, y un agregado de neuronas de proyección colinérgicas en la región mesopontina, que liberan ACh como neurotransmisor en otras áreas cerebrales. También existe un pequeño grupo de neuronas colinérgicas en la habénula medial y en el prosencéfalo basal (Perez-Lloret & Barrantes, 2016; Woolf, 1991). Las neuronas colinérgicas generalmente se localizan entremezcladas con neuronas monoaminérgicas. En particular, coexisten con las neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe, con las noradrenérgicas en el locus coeruleus y, con las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y el VTA. Aunque las neuronas colinérgicas no son numerosas, su alcance de influencia es enorme, prácticamente cada región del cerebro y objetivo periférico recibe una entrada colinérgica (Dautan et al., 2020; Woolf, 1991; Woolf & Butcher, 2011).

Se ha demostrado que las neuronas colinérgicas del PPN poseen I_M , mientras que las no colinérgicas carecen de ella (Bordas et al., 2015). Esta corriente es responsable de la hiperpolarización posterior al disparo de un potencial de acción y de establecer el potencial de membrana en reposo, entre otras (Madison & Nicoll, 1984). Sin embargo, no es mucho lo que se conoce sobre la importancia fisiológica de la I_M en las neuronas colinérgicas del PPN. Dado que la señalización colinérgica modula la I_M , es posible entonces que esta vía esté involucrada en la regulación de la excitabilidad neuronal en estas áreas cerebrales (David A. Brown & Passmore, 2009; Delmas & Brown, 2005).

El PPN contribuye en la modulación de los ciclos de sueño-vigilia, así como también en la transición entre sueño no REM y REM (Mena-Segovia & Bolam, 2017). Los subtipos de neuronas del PPN muestran diferentes patrones de actividad durante los estados cerebrales globales: están sincronizadas durante el sueño de ondas lentas (no REM), pero el nivel de sincronización se reduce durante el sueño REM y la vigilia (Mena-Segovia & Bolam, 2017; Petzold et al., 2015), aunque los mecanismos de sincronización no han sido descritos. Las neuronas colinérgicas son las que facilitan la transición al estado de vigilia y al sueño REM (Van Dort et al., 2015), y su descarga sostenida contribuiría a mantener el estado de vigilia (Petzold et al., 2015). A su vez, la subpoblación de neuronas glutamatérgicas tienen su actividad incrementada durante la vigilia y durante el sueño

REM, de hecho la activación farmacológica de las neuronas glutamatérgicas del PPN prolonga el estado de vigilia (Kroeger et al., 2017). Las distintas subpoblaciones neuronales del PPN parecen actuar de forma coordinada en los ciclos sueño-vigilia, y de allí que el PPN ha sido vinculado con el estado de excitación (*arousal*) (Homma et al., 2002; Mena-Segovia & Bolam, 2017).

Figura 3: Núcleo pedúnculo pontino (PPN). Tomada de (Perez-Lloret & Barrantes, 2016) y (Woolf & Butcher, 2011). A) Imagen 3D del PPN (verde) en un cerebro de ratón, diseñada en la plataforma *Allen Brain Atlas* (<https://connectivity.brain-map.org/>). B) Representación esquemática de las neuronas colinérgicas y sus conexiones en el SNC de roedores, donde se observa el PPN (círculo rojo) identificado como un núcleo colinérgico (allí se concentran los somas de las neuronas), que se proyecta hacia el tálamo, los ganglios basales, el prosencéfalo basal y la corteza cerebral.



El canal KCNQ4 se expresa en núcleos del tronco encefálico que se encuentran vinculados con el procesamiento del reflejo de sobresalto (*startle reflex*). Este consiste en la contracción rápida de músculos flexores del cuerpo y el rostro como una respuesta motora ante estímulos sensoriales repentinos e intensos, como un sonido fuerte (Koch, 1999; J. Zhang et al., 2022). En este reflejo, los núcleos cocleares reciben la información sensitiva a través del nervio auditivo tras un estímulo auditivo fuerte y repentino, y transmiten esa información a otros núcleos del tronco encefálico, como el núcleo reticular pontino caudal (PnC), que se encargan de enviar la respuesta de sobresalto a través de motoneuronas espinales (Koch, 1999; Yeomans & Frankland, 1995) (Figura 4).

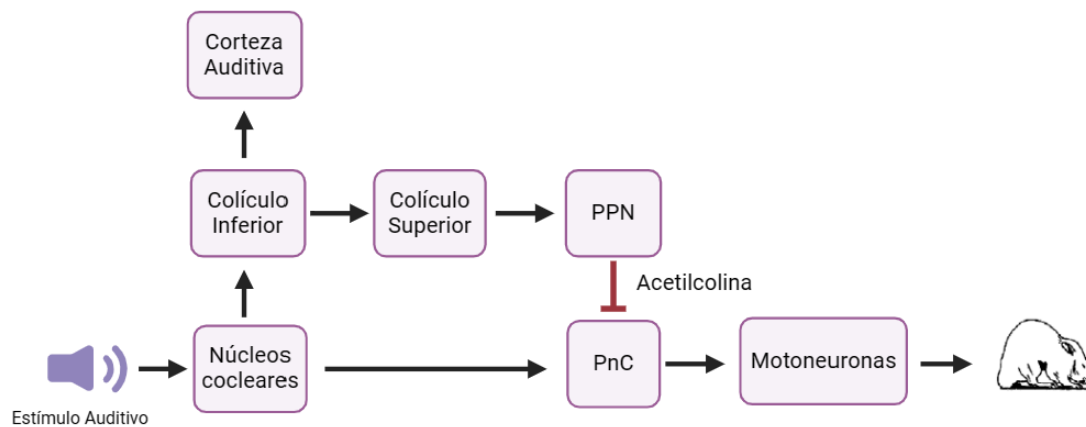
El reflejo de sobresalto es proporcional a la intensidad del estímulo, y es plástico, es decir que un individuo puede habituarse al cambio ambiental repentino que lo desencadena (Davis et al., 1982). A su vez, el reflejo de sobresalto ante un determinado estímulo repentino se reduce cuando el mismo está precedido por un estímulo menos intenso, fenómeno neurofisiológico conocido como inhibición por prepulso (PPI, del inglés *prepulse inhibition*) (Fendt et al., 2001). En otras palabras, la presentación de un estímulo suave antes de un estímulo más fuerte atenúa la respuesta de sobresalto que normalmente se observaría (*sensorimotor gating*) (Gómez-Nieto et al., 2020; Leumann et al., 2001). Este mecanismo se encuentra afectado en ciertos desórdenes psiquiátricos, como la esquizofrenia y autismo (L. Li et al., 2009; J. Zhang et al., 2022). La ausencia o disminución de dicha PPI vuelve a los pacientes que padecen de los mencionados trastornos altamente sensibles a cambios ambientales, e incrementa sus síntomas negativos (J. Zhang et al., 2022). En individuos autistas se ha visto una hipersensibilidad a estímulos auditivos débiles, mostrando una mayor magnitud de la respuesta de sobresalto con estímulos menores a aquellos con los que responden los individuos con un neurodesarrollo típico (Kohl et al., 2014; Takahashi et al., 2014).

Se han propuesto múltiples vías que median la activación del PPI, que involucra numerosas estructuras del mesencéfalo. Una de ellas sugiere que los prepulsos auditivos, es decir, sonidos que se encuentran debajo del umbral que desencadena un sobresalto, ascienden por la vía auditiva hacia el colículo inferior, que activa al colículo superior y este luego al PPN (**Figura 4**) (Fendt et al., 2001; Gómez-Nieto et al., 2020; Leumann et al., 2001). Las neuronas colinérgicas del PPN pueden regular la respuesta de sobresalto mediante una modulación sobre PnC, ya que la ACh inhibe las respuestas de este núcleo a estímulos auditivos, así las neuronas colinérgicas del PPN facilitan la PPI, y reducen el reflejo de sobresalto (**Figura 4**) (E. Garcia-Rill et al., 2019; Leumann et al., 2001).

Se demostró que ratones KO para *Kcnq4* presentan un incremento de este reflejo acústico, comparándolos con animales WT de la misma edad. Además de que se exagera su respuesta en el reflejo, se vio que los animales KO prácticamente no mostraban habituación (Maamrah et al., 2023). Esta respuesta se podría estar asociada al daño acústico que genera la pérdida de KCNQ4, pero también a cambios en la excitabilidad

neuronal a lo largo de la red involucrada en este reflejo. Aunque la primera hipótesis es menos probable, ya que a la edad que tenían los animales empleados en este ensayo (10 semanas), estos presentan pérdida auditiva sólo en las regiones de alta frecuencia (Carignano et al., 2019).

Figura 4: Vías que regularían el reflejo de sobresalto. Inspirada en (Leumann et al., 2001).



Autismo

El término autismo hace referencia a un grupo de desórdenes denominados Trastornos del Espectro Autista (TEA), que según el Manual Diagnóstico y Estadístico de trastornos mentales (DSM-5) se encuentran catalogados dentro de los Trastornos del Neurodesarrollo (American Psychiatric Association, 2013). Los TEA se caracterizan por déficit en la comunicación y en la interacción social en diversos contextos, patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades, y déficit en la reciprocidad afectiva y en la comunicación no verbal (American Psychiatric Association, 2013; Fombonne, 2005). Estos síntomas pueden combinarse de diversas maneras, y comienzan a aparecer temprano en el desarrollo, aunque la manifestación completa suele darse alrededor de los 4 años de edad, cuando comienzan las demandas sociales (American Psychiatric Association, 2013).

Leo Kanner publicó en 1943 un libro que sentó las bases del autismo, en el cual describió los síntomas de 11 niños cuya condición difería completamente de todo lo hasta el momento descrito (Kanner, 1943), y a partir de allí el interés por el autismo comenzó a aumentar. Los avances en la investigación sobre autismo han ido creciendo, incluso se han logrado grandes avances en políticas internacionales. Desde 1980 se incorporó el diagnóstico del autismo infantil en el DSM-3, enfocado exclusivamente a niños durante el desarrollo temprano de los niños (American Psychiatric Association, 1980). Luego de numerosas modificaciones en función de las investigaciones reportadas (Volkmar & McPartland, 2014), en 2013 se establecieron los criterios del DSM-5 para el diagnóstico del autismo que aplican actualmente.

Los TEA suelen tener afecciones que acompañan el cuadro, como epilepsia, depresión, ansiedad y trastorno por déficit de atención e hiperactividad, así como conductas desafiantes, dificultad para dormir y autolesiones. El nivel de funcionamiento intelectual entre las personas autistas varía ampliamente, extendiéndose desde un deterioro profundo hasta niveles superiores (World Health Organization, 2023).

Se estima que 1 de cada 100 niños (1%) en el mundo integra el espectro, aunque no se conoce con precisión la prevalencia del autismo en países subdesarrollados (Zeidan et al., 2022). Según el último reporte del CDC (del inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*) de Estados Unidos, se estima que 1 de cada 36 niños de 8 años es autista (Autism Spectrum Disorder (ASD), 2023). Se han utilizado además los estudios epidemiológicos para inferir sobre factores etiológicos relacionados con el autismo. Por ejemplo, un aumento en la prevalencia a lo largo del tiempo se considera un reflejo del cambio en exposición a factores ambientales de riesgo (Hewitt et al., 2016). De todas maneras, se discute si el aumento en la prevalencia del autismo se debe verdaderamente a un incremento en la frecuencia de este trastorno o a un mejoramiento en el diagnóstico (Fombonne, 2008).

El diagnóstico de TEA se basa en criterios clínicos, principalmente conductuales, no existiendo marcadores moleculares que faciliten su diagnóstico precoz y posterior seguimiento terapéutico (American Psychiatric Association, 2013; Loth et al., 2016). No es mucho lo que se conoce hasta el momento acerca de la etiología y la neuropatología

de los TEA, no hay una estructura cerebral ni un mecanismo molecular que se haya vinculado directamente con el autismo. La evidencia científica disponible sugiere que se trata de un trastorno multifactorial, probablemente existan muchos factores que hacen que un individuo sea más propenso a ser autista, incluidos factores ambientales y genéticos. Esto explica que no se haya descrito una etiología unificadora que se adecúe a los antecedentes de todos los pacientes.

Hoy existe consenso acerca de la existencia de numerosos genes que confieren susceptibilidad, y que pueden ser influenciados por sus interacciones con otros genes (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019), así como también con el ambiente (agentes tóxicos, infecciosos o metabólicos) (M. Ng et al., 2017; Persico & Bourgeron, 2006). La patogénesis del autismo permanece incierta, sin embargo, existen varias teorías importantes que buscan explicar cómo se desarrollan los TEA, que incluyen: 1) crecimiento temprano excesivo del cerebro, con un aumento del número de neuronas elevado, que termina por afectar la conectividad neuronal, 2) desbalance en la actividad neuronal excitatoria-inhibitoria, 3) morfología dendrítica anormal, con un mayor número de espinas dendríticas, largas y delgadas, 4) alteraciones neuroinmunes, 5) señalización del calcio alterada, que promueve una sinaptogénesis disfuncional (Watts, 2008)

Como ya se mencionó, se sugiere la existencia de un componente genético como causa del autismo. Sin embargo, un amplio estudio realizado con gemelos sugiere que, aunque los factores genéticos desempeñan un papel importante, son de magnitud sustancialmente menor al rol fundamental del ambiente pre y postnatal (Hallmayer et al., 2011). Dado que los primeros síntomas del autismo surgen sobre el final del primer año de vida, y que los gemelos comparten el ambiente prenatal y postnatal temprano, algunos factores ambientales podrían estar impactando durante este período crítico sobre un contexto genético susceptible a desarrollar TEA.

El sexo biológico ha sido uno de los factores de riesgo vinculados con la prevalencia de TEA, siendo los niños más susceptibles que las niñas. Sin embargo, los casos de autismo en niñas parecen presentar un cuadro más severo (Elsabbagh, 2020; Elsabbagh et al., 2012; Ochoa-Lubinoff et al., 2023). También se han vinculado con el desarrollo de autismo factores de riesgo no genéticos como la edad de los padres, el bajo peso al nacer, partos

múltiples, infecciones maternas durante el embarazo, entre otros (Gardener et al., n.d.; B. K. Lee et al., 2015; Schendel & Bhasin, 2008). Al mismo tiempo, se han propuesto una gran variedad de contaminantes ambientales como agentes etiológicos de los TEA, tales como metales pesados (plomo, mercurio, cadmio, arsénico), pesticidas, fármacos administrados in útero (ácido valproico, talidomida, misoprostol), y productos de limpieza (Landrigan, 2010). Más recientemente, y sobre todo en función del aumento de su presencia en el ambiente, se ha asociado a los microplásticos como contribuyentes para el desarrollo de TEA (Amran et al., 2022; Stein et al., 2023; Zaheer et al., 2022).

Se ha vinculado el aumento en la incidencia de autismo con brotes de enfermedades infecciosas y la exposición prenatal a diferentes virus durante el primer trimestre del embarazo (Atladóttir et al., 2010; Hornig & Lipkin, 2001; Libbey et al., 2005). Particularmente, las infecciones virales (rubeola, herpes simple, citomegalovirus, viruela y meningitis viral) han sido consideradas como la principal causa no genética del autismo (Ciaranello & Ciaranello, 1995), y cada vez hay más evidencia de que factores inmunológicos pueden contribuir a la patogénesis de los TEA (Hornig & Lipkin, 2001). Los estudios epidemiológicos y el trabajo en modelos animales indican que, la activación del sistema inmune materno puede ser un factor de riesgo para los TEA, principalmente en individuos genéticamente susceptibles (Che et al., 2022; Libbey et al., 2005). En el caso de desórdenes del neurodesarrollo, como es el caso de los TEA, el sistema inmune podría estar afectando no sólo el funcionamiento del SNC sino también su desarrollo (Goines & Van de Walter, 2010; Meltzer & Van De Water, 2017).

La inmunización infantil es un factor que ha sido vinculado en sucesivas ocasiones como una causa ambiental de TEA. Las vacunas y el autismo fueron vinculados por primera vez a finales de la década de 1990 en el Reino Unido, Estados Unidos y otros países, donde se reportaron casos de aparición de autismo en los días inmediatamente posteriores a la vacunación (Landrigan, 2010). En general, las acusaciones se centraron en el timerosal, un conservante a base de etilmercurio, que se emplea en vacunas multidosas para prevenir la contaminación bacteriana. Aunque la evidencia epidemiológica no ha respaldado la hipótesis de una relación causal entre las vacunas que contienen timerosal

y el autismo, continúa la preocupación sobre la exposición pediátrica al mercurio a través de la administración de vacunas (Hurley et al., 2010).

En cuanto a la terapéutica, el tratamiento depende de la gravedad y las comorbilidades, y pueden incluir entrenamiento conductual, uso farmacológico y suplementos dietéticos. Los tratamientos orientados al comportamiento incluyen una serie de programas que tienen como objetivo desarrollar habilidades vocacionales, sociales, cognitivas y de vida (Lordan et al., 2021). Aunque las terapias de estimulación temprana han resultado en el mejoramiento de algunos de los síntomas del autismo, no existen hasta la fecha terapias farmacológicas efectivas que puedan revertir completamente el desorden, los únicos tratamientos propuestos son paliativos para mejorar los síntomas que acompañan los TEA (Loth et al., 2016).

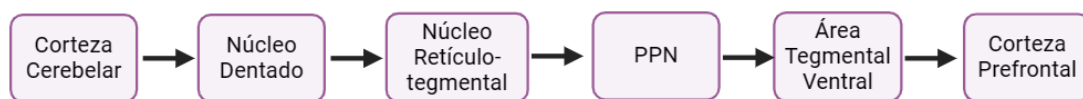
○ **Posible rol del PPN en los TEA**

El cerebelo ha sido generalmente vinculado a la función motora, sin embargo, existe evidencia que indica que también está involucrado en la función cognitiva (Schmahmann & Caplan, 2006). El cerebelo es una de las regiones encefálicas que ha sido vinculada con los trastornos del espectro autista (Fatemi et al., 2012; Mapelli et al., 2022; Rogers et al., 2013). Mediante estudios de Resonancia Magnética se ha visto que niños autistas en desarrollo presentan el volumen del vermis cerebeloso reducido (Webb et al., 2009). Estudios postmortem de personas autistas, revelaron anomalías neuropatológicas en la arquitectura del cerebelo; principalmente se observaron alteraciones morfológicas y una reducción del número de células de Purkinje. Numerosos hallazgos recientes sugieren que, tanto por causas genéticas como ambientales, se producen cambios neuropatológicos en el cerebelo en individuos con TEA. Se han identificado mutaciones genéticas asociadas con un desarrollo cerebeloso anormal en pacientes y modelos animales de autismo (Pangrazzi et al., 2022; Rogers et al., 2013); así como también en modelos de autismo generados por exposición a factores ambientales.

Estos cambios impactarían en la conducta y deterioro cognitivo de los individuos autistas. Una de las hipótesis que lo explicaría propone que la pérdida de células de Purkinje

durante el neurodesarrollo cerebeloso ocasiona una desconexión entre el cerebelo y otras estructuras encefálicas, que termina por afectar la conectividad funcional (Geschwind & Levitt, 2007). Particularmente, se genera una neurotransmisión de dopamina aberrante hacia la corteza prefrontal (Cx), que justamente es un área asociada al desarrollo de funciones cognitivas como memoria, planeamiento y la toma de decisiones. El circuito neuronal propuesto se origina en la corteza cerebelosa, donde las células de Purkinje proyectan hacia el núcleo dentado; desde allí se genera la activación de neuronas del núcleo retículo tegmental, que se proyecta hacia el PPN. Este núcleo estimula a las neuronas dopaminérgicas del VTA, que son las que se proyectan hacia la Cx (Figura 5) (Mapelli et al., 2022; Rogers et al., 2013).

Figura 5: Circuito neuronal involucrado en la modulación cerebelar, propuesto como afectado en el neurodesarrollo en los TEA.



o Contribución de los canales KCNQ en los TEA

Los canales KCNQ2 y KCNQ3 se expresan en la neocorteza y el hipocampo del cerebro humano desde antes del nacimiento (<http://hbatlas.org/>). El cerebro neonatal depende en gran medida de estos canales de potasio para la inhibición neuronal (Peters et al., 2005).

Se han identificado numerosas mutaciones *de novo* que contribuyen a diversos trastornos del neurodesarrollo, como la discapacidad intelectual y los TEA, así como también en la EE, y que estas mutaciones incluso son comunes a los tres trastornos, lo que confirma la estrecha interconexión genética entre ellos (Allen et al., 2013; Novarino et al., 2013). Particularmente, las mutaciones en los genes *KCNQ2* y *KCNQ3* están reportadas como causantes de epilepsia neonatal benigna y EE, ambas implican el padecimiento de

convulsiones neonatales, pero la primera remite espontáneamente sin mayores daños, mientras que la segunda genera deterioro intelectual (Hu et al., 2023; M. Kato et al., 2013; E. C. Kim et al., 2020; N. Du Yang et al., 2022).

Por ejemplo, se ha descubierto que, mutaciones en residuo R213 del dominio S4 del canal KCNQ2 ocasionan epilepsias neonatales con un fenotipo heterogéneo, que abarca desde epilepsia benigna hasta EE refractaria a anticonvulsivantes, con retraso neurocognitivo y macrocefalia (Miceli et al., 2013). En todos los casos se pudo ver un incremento de la frecuencia de gatillado de potenciales de acción neuronales (Miceli et al., 2013), dado que estas mutaciones afectan la sensibilidad a los cambios en el potencial de membrana, ya que reducen la estabilidad del VSD. De la misma manera, mutaciones en el residuo R230 del VSD del canal de potasio KCNQ3 han sido identificadas en pacientes con EE (Miceli et al., 2015; Rauch et al., 2012). De allí que se ha propuesto el desarrollo de activadores del canal KCNQ2 como un posible anticonvulsivante (Gunthorpe et al., 2012). Ensayos funcionales han revelado que en neuronas que presentan las mutaciones en *KCNQ2/KCNQ3* que desencadenan epilepsias neonatales benignas hay una reducción de la conductancia de la I_M de potasio, siendo esa reducción responsable de incrementar la excitabilidad neuronal a valores epileptógenos (Jentsch, 2000).

En un 30% de los casos, coexisten epilepsia y TEA (Tuchman & Cuccaro, 2011). Particularmente, *KCNQ2* y *KCNQ3*, así como han sido asociados con epilepsias neonatales, integran la amplia lista de genes que han sido vinculados a los TEA, dado que se han encontrado mutaciones en ellos en pacientes diagnosticados conductualmente (Cheng et al., 2021; Geisheker et al., 2017; SFARI GENE, n.d.; Siracusano et al., 2022).

Para el caso de *KCNQ3*, se evaluaron 11 pacientes que padecían deterioro del neurodesarrollo, y presentaban variantes heterocigotas en el gen *KCNQ3*. Todos los pacientes exhibieron un retraso global en el desarrollo dentro de los primeros 2 años de vida, y el 45% de ellos se diagnosticó con TEA. Curiosamente, la mayoría de los pacientes no tuvieron convulsiones, y ninguno de ellos tuvo convulsiones en el período neonatal. Los ensayos de *voltage-clamp* de los canales *KCNQ3* mutantes revelaron efectos de ganancia de función (Sands et al., 2019).

En cuanto a KCNQ2, se vio que la pérdida de función de este canal de potasio durante el neurodesarrollo puede contribuir a la aparición de conductas observadas en los TEA. En un modelo murino heterocigota para KCNQ2 (*Kcnq2^{+/-}*) se ha demostrado que en estos animales aumenta su comportamiento repetitivo y estereotipado, y disminuye el interés social (E. C. Kim et al., 2020). Además en este modelo se mostró que las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo presentan una mayor excitabilidad, y que entonces la pérdida de función de KCNQ2 lleva a un incremento en la susceptibilidad a sufrir convulsiones (E. C. Kim et al., 2020).

Por otro lado, se ha estudiado un grupo de 20 pacientes, todos portadores de variantes patogénicas en la posición R144 del VSD del canal de potasio KCNQ2. Se analizaron a su vez mediante registros de *whole-cell patch-clamp* las propiedades funcionales de las subunidades mutadas, revelando un efecto de ganancia de función (Miceli, Millevert, et al., 2022). En dicho ensayo, ninguno de los pacientes presentó convulsiones neonatales. El 67% de los mismos presentó un fenotipo autista, a menudo acompañado de epilepsia al inicio de la niñez, retraso en el desarrollo y dificultad en el lenguaje (H. F. Liu et al., 2022; Miceli et al., 2015; Miceli, Millevert, et al., 2022). Este estudio confirmó que existe un fenotipo distinto para las variantes de *KCNQ2* con ganancia de función respecto al de los pacientes que portan variantes de pérdida de función de KCNQ2, donde la epilepsia neonatal temprana es una característica clínica unificadora (Miceli, Millevert, et al., 2022; Niday & Tzingounis, 2018).

○ **Modelo murino de autismo**

Existen numerosos modelos de autismo, tanto transgénicos como generados por exposición a factores ambientales (Bey & Jiang, 2014). Los genéticos (<https://www.sfari.org/resource/mouse-models/>), si bien proveen información valiosa sobre los causales del autismo, son limitados por ser monogénicos, siendo que en el desarrollo de los TEA no hay un único gen alterado (Hulbert & Jiang, 2016). Por otro lado, los inducidos por factores ambientales están limitados por la ausencia de susceptibilidad genética que presentan los individuos, lo que modifica los síntomas que se visualizan en

cada caso (T. M. Kazdoba et al., 2016; Tatiana M Kazdoba et al., 2016; Moy & Nadler, 2008).

Uno de los agentes ambientales más estudiados como factor de riesgo para los TEA es el ácido valproico (AVP), un fármaco que se utiliza como antiepiléptico, analgésico y antimaníaco (Balfour & Bryson, 1994; Chapman et al., 1982). El AVP actúa principalmente facilitando la acción del neurotransmisor GABA, para ello, estimula la síntesis de GABA mediante la activación de la enzima ácido glutámico-descarboxilasa (GAD), y bloquea su degradación por inhibición de la enzimas ácido succínico-deshidrogenasa y GABA-transaminasa (Flórez, 2013). El AVP es altamente teratogénico, y se ha demostrado que su administración durante el embarazo aumenta la probabilidad de que el neonato padezca TEA (Rouillet et al., 2013).

El consumo de AVP durante el primer trimestre del embarazo puede ocasionar el llamado *síndrome de valproato fetal*. Este se caracteriza por anomalías fenotípicas del rostro, defectos del cerebro y de la medula espinal, anomalías respiratorias y cardiovasculares, labio leporino y/o paladar hendido, anomalías genitales, malformaciones de los miembros, y retraso del desarrollo (FVS, 2023). Puede haber también problemas de aprendizaje y de comportamiento. Curiosamente, muchos niños que padecen este síndrome presentan un fenotipo conductual similar al observado en TEA, con problemas en el habla y el lenguaje, intereses restringidos y comportamientos repetitivos y estereotipados, además de la disminución en la comunicación y la interacción social (Williams et al., 2001).

La administración de AVP en roedores durante la preñez genera progenie en las cuales se observan varios de los fenotipos de los TEA identificados en humanos, por lo cual es uno de los modelos animales de este trastorno más estudiados (Bambini-Junior et al., 2014; Chomiak et al., 2013; Guerra et al., 2023; Mabunga et al., 2015; Rodier, 1996). La exposición prenatal a AVP provoca no sólo disminución en la interacción social, sino que también genera alteraciones en conductas asociadas a los TEA, como ser un mayor comportamiento relacionado con la depresión y la ansiedad (Mehta et al., 2011). Curiosamente, estos efectos son observados sólo al realizar la inyección en el GD12,5. Sin embargo, si se administra el AVP en otro estadio gestacional no se ven dichos efectos,

demostrando que existe una ventana crítica en la que el fármaco afecta el comportamiento social (Kataoka et al., 2013; Rouillet et al., 2013). De la misma manera, los efectos sólo se observan con la dosis de 600 mg/kg (Lucchina & Depino, 2013).

El mecanismo a través del cual el AVP actúa en estos casos no está establecido, aunque se sugieren entre los mecanismos de acción una interferencia en la función de neurotransmisores, apoptosis neuronal, modificación de la plasticidad sináptica (J. Christensen et al., 2013; Mabunga et al., 2015), y la desregulación de la expresión de genes en la corteza cerebelar, durante el neurodesarrollo postnatal y la formación sináptica (Guerra et al., 2023).

Pero además de todos estos efectos, ha sido demostrado que el AVP genera modificaciones epigenéticas. Particularmente, es un inhibidor selectivo de la actividad de las enzimas histona deacetilasas (HDAC) de clase I y IIa. Por lo tanto, el tratamiento con AVP aumenta los niveles de acetilación de histonas, afectando la expresión de una gran cantidad de genes (Göttlicher et al., 2001; Krämer et al., 2003). En humanos, se han identificado 18 enzimas HDAC, que se clasifican en HDAC de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8), clase II (HDAC4, 5, 6, 7, 9, y 10), y clase IV (HDAC11), y las HDAC de clase III, que se conocen como sirtuinas (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Las HDAC, como su nombre lo indica, desacetilan las histonas en los residuos de lisina; la eliminación de los grupos acetilo incrementa la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas por el ADN. Esto condensa la cromatina, y da como resultado una transcripción genética reducida (Tseng et al., 2022; Volmar & Wahlestedt, 2015)

La hiperacetilación del cerebro embrionario inducida por la administración prenatal de VPA juega un rol clave en la generación del fenotipo en este modelo animal. Se ha visto un aumento de la muerte celular por apoptosis en la neocorteza, una disminución de la proliferación celular en la eminencia ganglionar y un retraso en la maduración neuronal cortical (Kataoka et al., 2013; Kawanai et al., 2016), además de un comportamiento social anormal (Moldrich et al., 2013). El rol de los mecanismos epigenéticos en la etiología del autismo es un concepto relativamente nuevo, y el modelo de exposición al AVP resulta particularmente útil para explorarlo.

Modelo de reversión

Como ya se mencionó previamente para el caso de los TEA, en psiquiatría prácticamente no existen tratamientos farmacológicos específicos y eficientes, y en la mayoría de los casos se debe recurrir a la combinación de medicamentos, lo que aumenta los riesgos de interacciones medicamentosas y reacciones adversas. Es por ello que las personas con trastornos psiquiátricos necesitan desesperadamente avances en el tratamiento. Existen también técnicas, complementarias a la terapia farmacológica, empleadas para el tratamiento y reversión de trastornos psiquiátricos, como por ejemplo, la terapia cognitivo-conductual, la terapia interpersonal, la terapia de apoyo y la de grupo (Krystal & State, 2014).

Así como los factores ambientales afectan el neurodesarrollo, e impactan en la función y el comportamiento del cerebro adulto, y por lo tanto puede ser causantes de desórdenes psiquiátricos, también pueden ser un recurso para mejorar el rendimiento o incluso tratar el trastorno y revertir el fenotipo. Justamente, intervenciones tempranas, como el enriquecimiento social, pueden impactar en el desarrollo de niños con riesgo de TEA. Asimismo, se ha visto el rescate de la conducta social en el modelo de VPA a través del enriquecimiento social (Campolongo et al., 2018; Zappala et al., 2023). De hecho, estudios clínicos indican que las estrategias de participación social pueden promover habilidades comunicativas en los niños afectados (Hwang & Hughes, 2000). Así también, el enriquecimiento sensoriomotor se ha visto que mejora los síntomas en niños con TEA (Woo et al., 2015). De la misma forma, en ratones del modelo de exposición prenatal a AVP, el enriquecimiento ambiental mejora el comportamiento asociado a TEA (el déficit social, la ansiedad y el deterioro cognitivo), además de revertir el deterioro morfológico, reduciendo la pérdida de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo (Leger et al., 2015; Yamaguchi et al., 2017). A su vez, se ha demostrado que la manipulación (*handling*) durante el período juvenil puede rescatar los efectos celulares y de comportamiento de la exposición prenatal al AVP (Seiffe et al., 2022).

Se ha visto que en muchos de los desórdenes psiquiátricos los pacientes padecen deficiencias alimentarias, principalmente de ciertas vitaminas, ácidos grasos omega-3 y aminoácidos (precursores de neurotransmisores) (Lakhan & Vieira, 2008). La evidencia

disponible respalda que determinados regímenes dietarios así como la suplementación alimentaria tienen potencial terapéutico en estos trastornos (Grajek et al., 2022; Prakash et al., 2022). Particularmente, la cetosis, inducida por dieta o por la ingesta de cuerpos cetónicos, además de su comprobado efecto beneficioso para el control de las convulsiones en niños y adultos con epilepsia refractaria a fármacos, ha mostrado tener efectos positivos para el mejoramiento de la sintomatología en enfermedades neurodegenerativas, esquizofrenia, trastorno bipolar y TEA (Elamin et al., 2017; G. Morris et al., 2020).

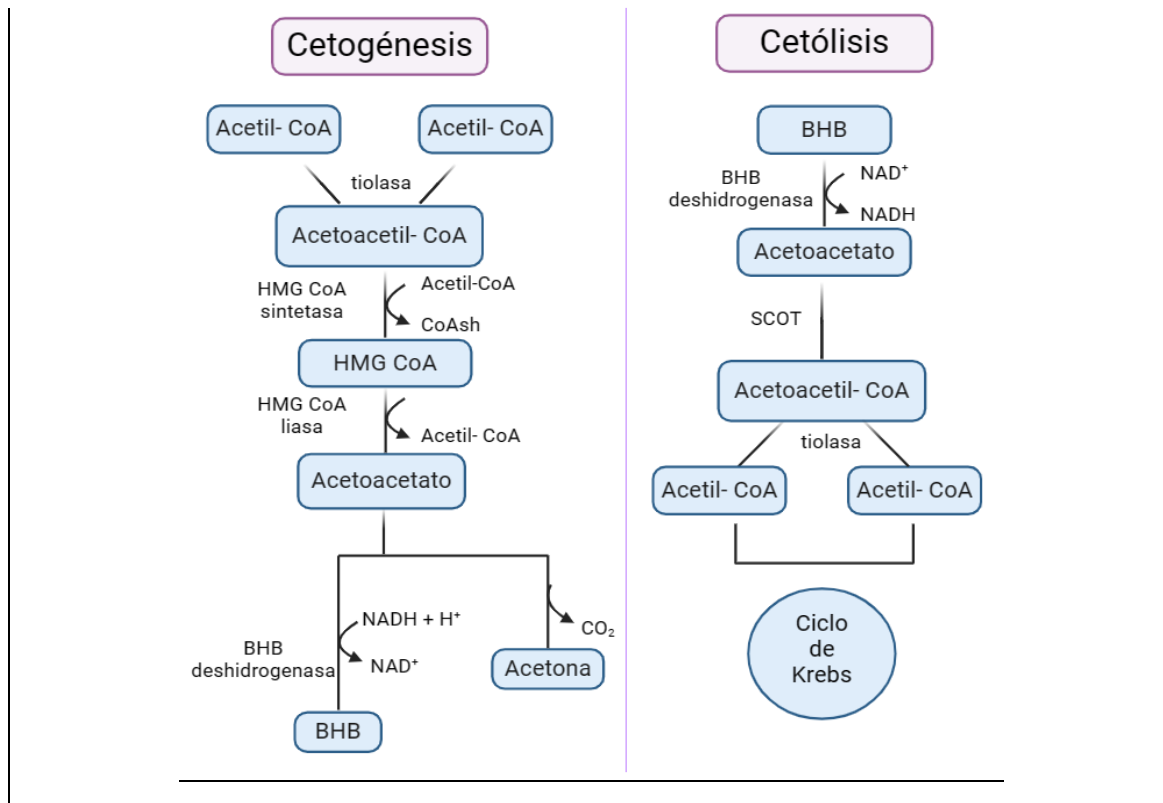
○ Estado de cetosis

La cetosis es un estado metabólico que se caracteriza por la elevación de los cuerpos cetónicos en la sangre, y se alcanza cuando se promueve la cetogénesis. Aunque está principalmente relacionada con la nutrición, el ayuno y el ejercicio aeróbico prolongado, también puede ocurrir durante una diabetes no controlada (cetoacidosis diabética), o en personas que consumen alcohol en exceso o tienen trastornos metabólicos hereditarios que afectan la capacidad del cuerpo para metabolizar adecuadamente los carbohidratos (Calimag et al., 2023; Poff et al., 2020). A su vez, también es posible inducir la cetosis directamente mediante la ingesta de cuerpos cetónicos exógenos, es decir, cetonas que provienen de fuentes externas, como suplementos, sin tener que seguir una dieta estricta baja en carbohidratos. Estos suplementos pueden incluir sales de cetonas, ésteres de cetonas y triglicéridos de cadena media, que se metabolizan en el cuerpo para producir cetonas (Kesi et al., 2016; Lin et al., 2021).

La cetogénesis es un proceso metabólico que ocurre principalmente en el hígado, durante el cual se producen los cuerpos cetónicos (acetoacetato, acetona y BHB), como producto del catabolismo de los ácidos grasos (AG). Este proceso es una respuesta adaptativa del organismo para generar una fuente alternativa de energía cuando los niveles de glucosa son bajos, como durante el ayuno prolongado, una dieta baja en carbohidratos o en condiciones de resistencia a la insulina (Dhillon & Gupta, 2023). Los cuerpos cetónicos proveen fuentes alternativas para la producción de ATP en casi todas las células del organismo, incluyendo las neuronas (Newman & Verdin, 2014a)

Cuando los niveles de glucosa disminuyen, debido a que se consumen los depósitos de glucógeno en el hígado y el músculo, las células comienzan a movilizar los AG almacenados en el tejido adiposo (lipólisis). Éstos entran en las mitocondrias a través de la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) para someterse a la beta-oxidación, un proceso catabólico que descompone los AG en unidades de acetil-CoA. Cuando hay un exceso de acetil-CoA debido a la beta-oxidación de AG, y la capacidad del ciclo de Krebs para utilizar completamente el acetil-CoA es limitada debido a la baja disponibilidad de oxaloacetato (que se consume en la gluconeogénesis), se desvía parte del acetil-CoA hacia la síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado. El acetil-CoA se condensa para formar acetoacetato, que luego se convierte en BHB o se descompone en acetona (**Figura 6**). Estos cuerpos cetónicos se liberan en la sangre y se transportan a los tejidos periféricos, donde son descompuestos nuevamente en acetil-CoA, en un proceso catabólico conocido como cetólisis. Luego, ese acetil-CoA puede ingresar en el ciclo de Krebs para generar ATP (**Figura 6**), proporcionando así una fuente de energía alternativa a la glucosa (Le Foll & Levin, 2016; McGarry & Foster, 1980; Rui, 2014).

Figura 6: Cetogénesis y cetólisis (Grabacka et al., 2016). La **cetogénesis** requiere de la β -oxidación de ácidos grasos previamente, para producir el acetil-CoA, que es el sustrato de este proceso metabólico. El primer paso de la cetogénesis implica la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, en una reacción catalizada por la enzima mitocondrial tiolasa. Luego, con el agregado de una tercera molécula de acetil-CoA se forma el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Este último se transforma en el primer tipo de cuerpo cetónico, el acetoacetato. La mayor parte de este se reduce a BHB, por acción de la BHB-deshidrogenasa. La fracción remanente de acetoacetato se descarboxila espontáneamente en acetona. La **cetólisis** es el proceso opuesto, en el cual se oxidan los cuerpos cetónicos para obtener energía. El acetoacetato, o el BHB convertido en acetoacetato por la enzima hidrogenasa, se convierte en acetoacetil-CoA por acción de la enzima transferasa dependiente de succinil-CoA (SCOT). Luego, por acción de la tiolasa el acetoacetil-CoA se cliva en dos moléculas de acetil-CoA, que puede ingresar al ciclo de Krebs y la cadena respiratoria para la síntesis de ATP.



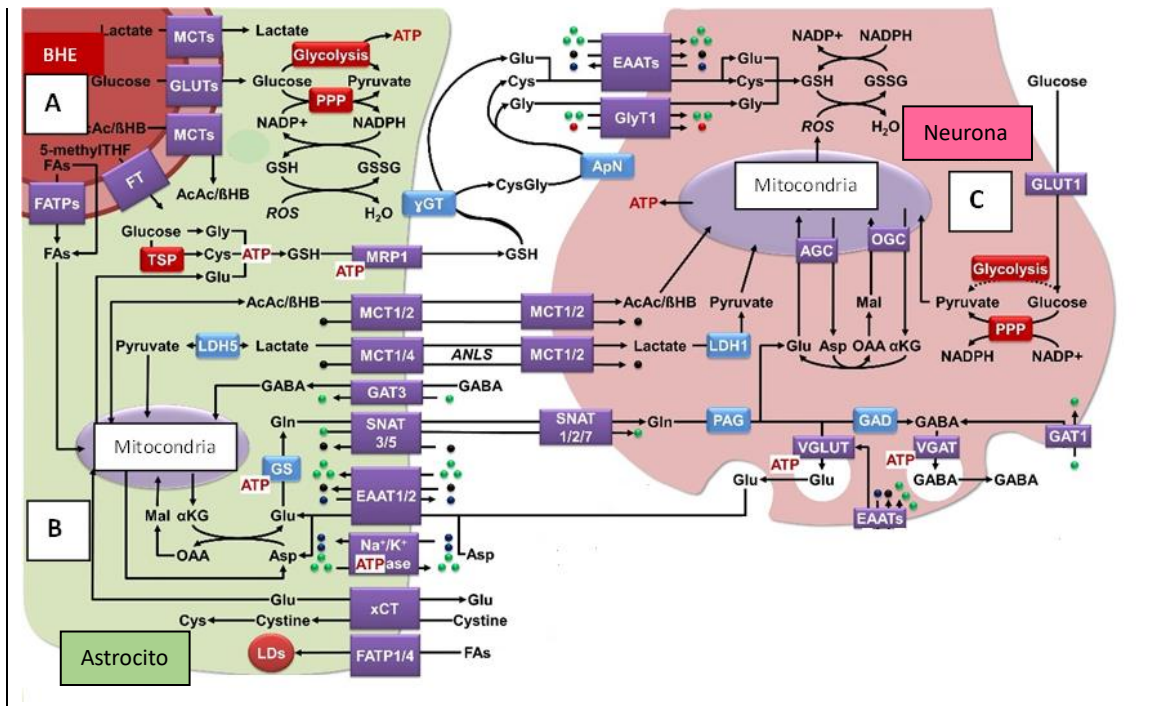
Las neuronas normalmente utilizan glucosa como su principal sustrato energético, sin embargo, pueden adaptarse para utilizar fuentes de energía alternativas, como los cuerpos cetónicos y los AG libres, siendo éstas eficientes en situaciones de bajo suministro de glucosa (Puchowicz et al., 2007). El transporte de lactato a través de la barrera hematoencefálica (BHE) proporciona aproximadamente el 10% de las necesidades energéticas del cerebro en condiciones basales, y se ha estimado que suministra entre el 20% y el 25% de la energía durante actividades que lo demandan (Rose et al., 2020; Van Hall et al., 2009). A medida que aumentan las concentraciones plasmáticas de lactato, la absorción de lactato en el SNC aumenta coincidiendo con una disminución en la absorción de glucosa (Van Hall et al., 2009). Los cuerpos cetónicos pueden atravesar la BHE a través de transportadores de monocarboxilato (MCTs) (A. A. M. Morris, 2005; Rose et al., 2020). A su vez, los astrocitos, principalmente hipotalámicos y corticales, son capaces de producir cuerpos cetónicos a partir de la oxidación de AG en el cerebro (Auestad et al., 1991; Edmond et al., 1987; Le Foll et al., 2014; McKenna, 2012). Al tener acceso directo a la vasculatura cerebral, los astrocitos pueden absorber los nutrientes disponibles en la

sangre y metabolizarlos para satisfacer sus propias necesidades energéticas y entregar intermediarios metabólicos a las sinapsis locales (**Figura 7**) (Morant-Ferrando et al., 2023).

A diferencia de los cuerpos cetónicos, los AG pueden atravesar la BHE mediante difusión pasiva, aunque también pueden ser transportados a través de la BHE por transcitosis; a su vez, en la BHE se expresan proteínas transportadoras de AG (FATPs), que facilitan el transporte selectivo de AG (Bruce et al., 2017; Mitchell & Hatch, 2011; Pifferi et al., 2021; Rose et al., 2020). Los mecanismos de transporte exactos que median la absorción de AG en neuronas o astrocitos aún no están claros. Pero, una vez que ingresan a los astrocitos desde el espacio extracelular, se producen a partir de ellos, en las mitocondrias, cuerpos cetónicos, que se transportan fuera de estas células a través del MCT1, y luego MCT2 los incorpora a las neuronas, donde ocurre la cetólisis, es decir que se metabolizan para producir acetil-CoA, que puede ser oxidado para producir ATP (**Figura 7**) (Chechik et al., 1987; Cotter et al., 2013; Morant-Ferrando et al., 2023).

Los cuerpos cetónicos no sólo son una fuente de energía para el organismo; también se ha demostrado que su producción se utiliza como mecanismo de señalización para regular la ingesta de alimentos (Le Foll & Levin, 2016). A su vez, son capaces de inducir modificaciones epigenéticas, impactando en la expresión de genes que regulan la excitabilidad neuronal, el estrés oxidativo, el comportamiento, entre otros, siendo este el mecanismo por el cual la cetosis favorece el tratamiento de diversas afecciones (Y. He et al., 2023; Ruan & Crawford, 2018).

Figura 7: Cooperación metabólica neuro-astrocítica. Utilización de los cuerpos cetónicos en el Sistema Nervioso. Inspirada en (Rose et al., 2020). **A)** Transportadores localizados en la BHE, entre ellos, los MCTs permiten que el BHB pueda atravesar la BHE. **B)** Astrocitos (célula verde). Allí ocurre la producción de ATP y NADPH para el SNC. Los astrocitos sintetizan y exportan glutatión, lactato, glutamina y cuerpos cetónicos que las neuronas pueden utilizar para la producción de energía y la síntesis de neurotransmisores. El BHB es expulsado del astrocito por el transportador MCT1/2, que a su vez se encarga de incorporarlo en las neuronas. **C)** Neurona presináptica (célula rosada). El BHB producido por los astrocitos es importado en la neurona por el transportador MCT1/2. Las neuronas utilizan el BHB para la producción de ATP.



o Dieta cetogénica

Una dieta cetogénica (KD, del inglés *ketogenic diet*) es un régimen nutricional que se caracteriza por ser baja en carbohidratos y alta en grasas. El objetivo principal de esta dieta es inducir el estado metabólico de cetosis en el cuerpo, gracias que se promueve la cetogénesis a partir de la oxidación de los AG, elevando así los niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos (Figura 6). La KD consiste en consumir alimentos ricos en grasas saludables, una cantidad moderada de proteínas y una baja cantidad de carbohidratos. Esta dieta se ha vuelto altamente popular en los últimos años, principalmente como una estrategia para perder peso (McGaugh & Barthel, 2022; A. Paoli et al., 2013; Wheless, 2008). Sin embargo, la misma fue diseñada y utilizada hace más de 100 años para el tratamiento de epilepsias refractarias (Bough & Rho, 2007; Freeman et al., 2006).

En los últimos años, ha habido una explosión de especulaciones y de investigaciones científicas sobre las posibles aplicaciones de la KD en una variedad de trastornos metabólicos, oncológicos (Klement et al., 2020), neurodegenerativos y psiquiátricos (Barañano & Hartman, 2008; Bough & Rho, 2007; Veech, 2004; Zhu et al., 2022), aunque no se conocen con precisión los mecanismos de acción en cada caso, siendo probable que sean diferentes de acuerdo al trastorno.

La KD se utiliza aún para el tratamiento de pacientes con epilepsia refractaria (Barañano & Hartman, 2008; Wheless, 2008). También se ha reportado que mejora los síntomas de niños autistas (Castro et al., 2015; Evangeliou et al., 2003; R. W. Y. Lee et al., 2018; Napoli et al., 2014), así como también algunos fenotipos de autismo en modelos animales (Castro et al., 2017; Ruskin et al., 2013, 2017).

El BHB tiene la capacidad de inhibir a las HDAC, y esa habilidad de inducir modificaciones epigenéticas impacta sobre la expresión de determinados genes (Newman & Verdin, 2014b). A su vez, los cuerpos cetónicos también actúan como metabolitos de señalización intracelular. Entre otros efectos, el BHB activa los canales de potasio KCNQ2/3, y de esta manera reduce la excitabilidad neuronal (Falsaperla et al., 2023; Hoshi, 2020; R. W. Manville et al., 2020), siendo este uno de los aspectos que valida el potencial terapéutico de la KD en la epilepsia (Jepps et al., 2021).

Individuos que presentan variantes genéticas con pérdida de función en segmento S4 de KCNQ3, padecen epilepsia neonatal, y el déficit funcional causado por las mutaciones podría restaurarse parcialmente mediante la activación farmacológica de la corriente Kv7. En particular, la aplicación de BHB revirtió la disfunción del canal, proporcionando así la justificación para el uso de KD en pacientes portadores de variantes de pérdida de función en Kv7.2. o Kv7.3 (Jepps et al., 2021; Miceli et al., 2020). De manera similar, se ha visto que la KD fue el único tratamiento efectivo para reducir las convulsiones en casos de EE causada por mutaciones en *KCNQ2* (Falsaperla et al., 2023).

Se ha visto que la KD mejora el comportamiento autista, pero se desconocen los mecanismos subyacentes. Se le atribuye un rol neuroprotector a la KD en los TEA, que probablemente esté mediado por mejoras en el metabolismo energético, reducciones en los niveles de estrés oxidativo, control de neurotransmisores, y modulación de la microbiota intestinal (Q. Li et al., 2021; Napoli et al., 2014).

Alteraciones de la conducción cardíaca

Como ya se mencionó previamente, se han identificado mutaciones en el gen *KCNQ1* que predisponen a arritmias cardíacas, y más específicamente se han asociado con el

síndrome de QT alargado (SQTL) (Al-Ahmad & Wilde, 2014; Barrese, Stott, & Greenwood, 2018; Fosmo & Skraastad, 2017; Wilde et al., 2022). El canal de potasio KCNQ1 no se expresa en el SNC, pero si se localiza en los cardiomiocitos, y cumple allí, junto a otros canales, un rol preponderante en la repolarización del potencial de acción cardíaco. Las alteraciones en este canal, así como también en el canal de potasio KCNH2, y en el canal de sodio activado por voltaje $Na_v1.5$, afectan la funcionalidad del corazón, y predisponen a las personas portadoras a sufrir síncope y muerte súbita.

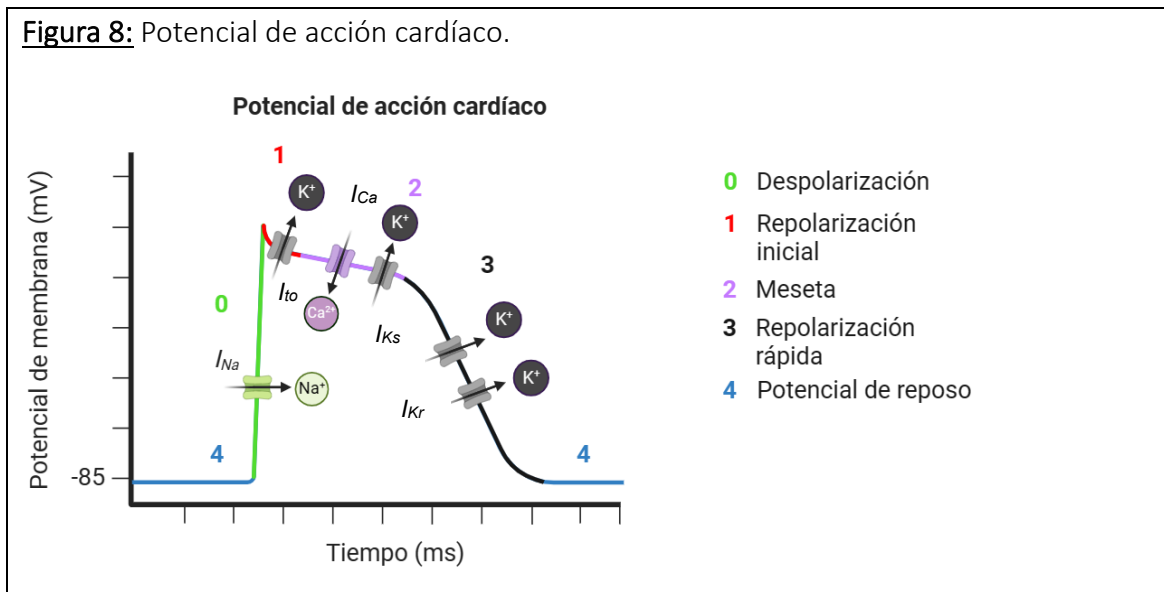
○ Potencial de acción cardíaco

El ciclo cardíaco consiste en una serie de cambios de presión que tienen lugar dentro del corazón, que impulsan el flujo de la sangre a través de las diferentes cámaras del corazón y del cuerpo en general. Estos se originan como cambios en el potencial de acción cardíaco que resultan en la contracción/relajación del miocardio. En las células del nodo sinusal se genera un potencial de acción, que se propaga a través del sistema de conducción del corazón. La fase de despolarización se correlaciona con la contracción de las cámaras, y luego la repolarización del potencial de membrana se refleja como la relajación del miocardio (Pollock & Makaryus, 2022).

El potencial de acción cardíaco consta de varias fases (**Figura 8**), cada una caracterizada por cambios en la polaridad de la membrana celular y la activación de diferentes corrientes iónicas, que son esenciales para la contracción y relajación coordinadas del corazón. La fase 0 consiste en una despolarización rápida, debido a una corriente entrante de iones sodio (I_{Na}) a través de canales de sodio dependientes de voltaje (como $Na_v1.5$). El incremento del potencial de membrana provoca la activación de una corriente de salida de potasio transitoria (I_{to}), que sumada a la inactivación de los canales de Na^+ , da lugar a la fase de repolarización inicial (fase 1). La despolarización de la membrana produce también la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (como $Ca_v1.2$), y se genera así una corriente entrante de Ca^{++} (I_{Ca}). Ese influjo de iones Ca^{++} contribuye a mantener la membrana despolarizada y así ayuda a prolongar el potencial de acción cardíaco. Esta fase de meseta (fase 2) se debe al equilibrio entre la I_{Ca} y una corriente rectificadora de potasio lenta (I_{ks}), que está mediada principalmente por KCNQ1. Luego,

en la fase 3, los canales de calcio se cierran y se mantiene la I_{Ks} , lo que contribuye a la repolarización de la membrana y así a la apertura de nuevos canales de potasio dependientes de voltaje (como $KCNH2$), responsables de la corriente rectificadora de potasio rápida (I_{Kr}), que finalmente permite la repolarización rápida de la membrana celular y la restauración del potencial de reposo (fase 4) (**Figura 8**) (Boron & Boulpaep, 2016; Grant, 2009; Priest & McDermott, 2015; Santana & Cheng, 2010; Titier et al., 2005).

Figura 8: Potencial de acción cardíaco.



○ Síndrome de QT largo (SQTL)

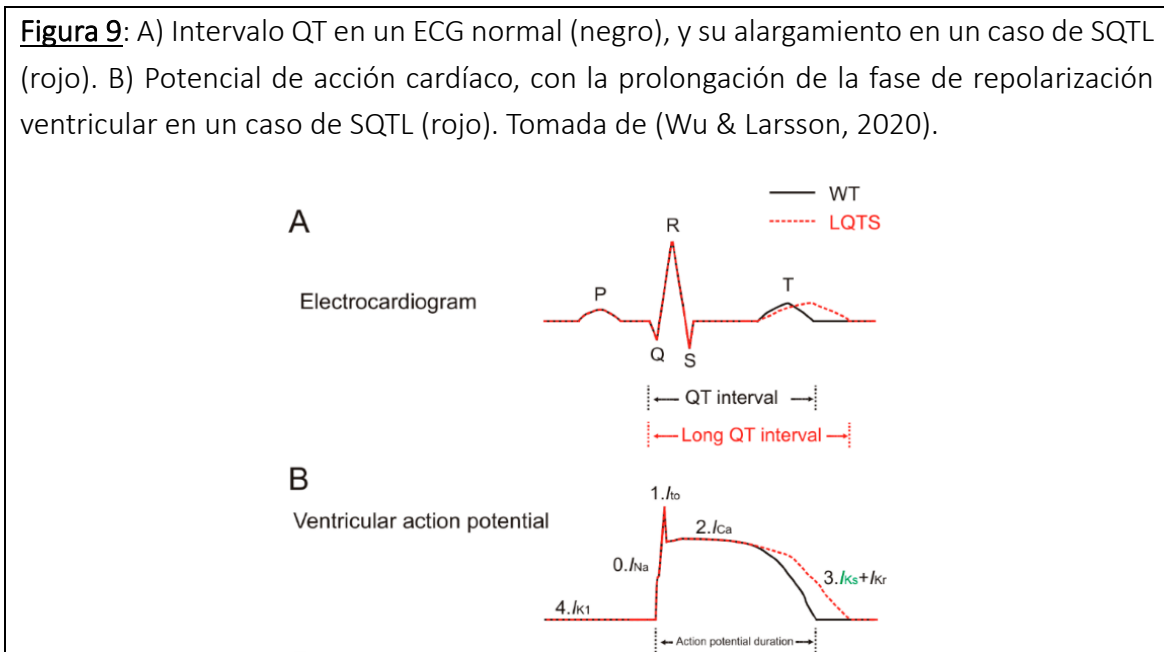
El SQTL es una afección cardíaca que afecta la repolarización ventricular y puede predisponer a arritmias potencialmente mortales, que resultan en síncope, paro cardíaco repentino e incluso la muerte súbita. Este trastorno se caracteriza por un intervalo QT prolongado en el electrocardiograma (ECG), ya sea en condiciones basales o en condiciones particulares como ejercicio, fiebre o un desafío farmacológico (Napolitano et al., 2012).

El intervalo QT es un segmento del ECG que representa la duración total de la actividad eléctrica ventricular, desde el inicio de la despolarización ventricular hasta el final de la repolarización ventricular (Indraratna et al., 2020). En términos más simples, es el tiempo que tarda el ventrículo en contraerse y luego en recuperarse eléctricamente para la

siguiente contracción (**Figura 9A**). El intervalo QT en el ECG es un indicador crucial de la función eléctrica del corazón y puede proporcionar información importante sobre la salud cardíaca de un individuo. Particularmente, el alargamiento del QT en el SQTTL refleja una prolongación en la fase de repolarización ventricular (**Figura 9B**).

El intervalo QT se mide desde el inicio del complejo QRS (que representa la despolarización ventricular) hasta el final de la onda T (que representa la repolarización ventricular). Es importante destacar que la duración del intervalo QT puede variar dependiendo de la frecuencia cardíaca. Por este motivo, para obtener una evaluación más precisa, generalmente se corrige (intervalo QT corregido, QTc). La corrección puede realizarse utilizando diferentes fórmulas, siendo la fórmula de Bazett la más comúnmente utilizada en la práctica clínica. En esta fórmula se divide la duración del intervalo QT por la raíz cuadrada del intervalo RR, que es el intervalo entre dos complejos R consecutivos, por lo que mide la duración del ciclo cardíaco completo, desde una contracción ventricular hasta la siguiente (Boron & Boulpaep, 2016). De todas maneras, la fórmula de Bazett tiene limitaciones, especialmente en frecuencias cardíacas extremas. Puede sobreestimar el QTc en frecuencias cardíacas altas y subestimarlos en frecuencias cardíacas bajas (Indraratna et al., 2020).

Figura 9: A) Intervalo QT en un ECG normal (negro), y su alargamiento en un caso de SQTTL (rojo). B) Potencial de acción cardíaco, con la prolongación de la fase de repolarización ventricular en un caso de SQTTL (rojo). Tomada de (Wu & Larsson, 2020).



El SQTL puede ser congénito, cuando es el resultado de mutaciones genéticas que afectan a los canales iónicos cardíacos. También pueden presentarse casos de SQTL adquirido, donde la prolongación del intervalo QT es causada por factores externos (medicamentos, desequilibrios electrolíticos, trastornos endocrinos) (Ayad et al., 2010), y no está vinculado a mutaciones genéticas inherentes, por lo tanto, puede ser reversible si se eliminan los factores desencadenantes.

Las mutaciones genéticas que producen alteraciones en canales iónicos que participan en el ciclo cardíaco, como los canales de potasio KCNQ1 y KCNH2, y el canal de sodio $Na_v1.5$, desencadenan canalopatías, que suelen asociarse con la aparición de arritmias graves. Las arritmias cardíacas son trastornos del ritmo cardíaco, responsables del 40% de los casos de muerte súbita en personas menores de 40 años. Además, se estima que hasta un 10% de los neonatos con síndrome de muerte súbita infantil pueden ser desencadenados por esta patología (Abrams & Macrae, 2014; Arnestad et al., 2007; Curcio et al., 2017; Ioakeimidis et al., 2017; Napolitano et al., 2012; Schwartz et al., 2012).

Además del SQTL, las canalopatías cardíacas más frecuentes que predisponen a los pacientes a sufrir muerte súbita son el síndrome de QT corto (SQTC) y el síndrome de Brugada (SB) (Fernández-Falgueras et al., 2017). En todas ellas existen varios subtipos de la enfermedad que se deben a mutaciones en distintos canales iónicos. El SB es también un síndrome hereditario, potencialmente mortal, caracterizado por una elevación del segmento ST-T en el ECG. Este síndrome genera arritmia cardíaca principalmente durante el sueño. Afecta predominantemente a varones adultos jóvenes (30-40 años) (Curcio et al., 2017; Napolitano et al., 2012). Entre el 15 al 30% de los pacientes tienen mutaciones con pérdida de función en el gen SCN5A. El SQTC se caracteriza por mostrar arritmias auriculares y ventriculares que pueden conducir a muerte súbita. En este síndrome se encuentran mutaciones con ganancia de función en KCNH2 y KCNQ1 que se traducen en un acortamiento del intervalo QT en el ECG.

Dependiendo de la mutación que lo desencadena, los SQTL se subdividen en 17 tipos (Galić et al., 2021). A su vez, los genes asociados al SQTL se pueden dividir en tres grupos principales: aquellos genes en los que las variantes patógenas reducen las corrientes de salida de potasio, aquellos en los que las variantes patógenas aumentan la corriente de

entrada de sodio, y aquellos en los que las variantes patógenas aumentan la corriente de entrada de calcio (Wilde et al., 2022). Particularmente, el 75% de los casos de SQTl han sido asociados a mutaciones en los canales de potasio KCNQ1 y KCNH2, responsables de los SQTl tipo 1 (SQTl1) y 2 (SQTl2), respectivamente, y en el canal de sodio Nav1.5 responsable del tipo 3 (SQTl3)(Crotti et al., 2020; Shimizu & Horie, 2011; Wilde et al., 2022). Las mutaciones conducen a un alargamiento del intervalo QT a través de la pérdida de función de los canales de potasio (SQTl1 y SQTl2) o la ganancia de función del canal de sodio (SQTl3) (Napolitano et al., 2012).

Los distintos tipos de SQTl se clasifican de acuerdo a las mutaciones que los originan, pero los pacientes que los padecen no presentan características fenotípicas distintivas, aunque si tienen una respuesta variable a los fármacos β -bloqueantes. El ECG es una herramienta importante para la evaluación inicial y el seguimiento de los pacientes con SQTl, sin embargo, a partir del mismo sólo se puede determinar la prolongación del intervalo QT y, en algunos casos, por la forma y tamaño de las ondas T en el ECG, se puede sospechar de algún tipo particular de SQTl (Porta-Sánchez et al., 2017). Sin embargo, la identificación de estas características patognomónicas requiere mucha experiencia. Por ello, el diagnóstico genético ha permitido determinar certeramente la causa molecular de estos trastornos eléctricos congénitos del corazón. Sin embargo, a pesar de la gran importancia que tiene el análisis genético para el diagnóstico, así como para el tratamiento y pronóstico de la enfermedad, en Argentina, el diagnóstico molecular no se realiza de manera rutinaria debido a la escasez de centros especializados y al elevado costo que demanda (Bokil et al., 2010; Schwartz et al., 2013). El diagnóstico inicial del SQTl implica la evaluación clínica del paciente, averiguación del historial médico familiar, el ECG para identificar el alargamiento del intervalo QT y alteraciones en la onda T, y la medición de la frecuencia cardíaca en reposo (Galić et al., 2021; Schwartz et al., 1993; Schwartz & Crotti, 2011). Finalmente, en casos excepcionales, se realizan pruebas genéticas para identificar mutaciones específicas.

Su abordaje terapéutico es complejo debido a que se encuentra condicionado al origen genético de la patología. Los protocolos diagnósticos de rutina no permiten identificar estos aspectos, lo que constituye una seria limitación a la hora de plantear un tratamiento

efectivo. Está reportado que la identificación de la alteración genética permite un diagnóstico certero de la enfermedad y, consecuentemente, un tratamiento más específico y personalizado. Se ha establecido que en algunos subtipos del SQTL, el tratamiento farmacológico adecuado reduce a menos del 1% la probabilidad de sufrir una arritmia maligna. Además, permite brindarle información al paciente sobre los cambios en el estilo de vida que deberá introducir para minimizar el riesgo, ya que los eventos que gatillan la aparición de arritmias son diferentes para cada subtipo del SQTL.

– *KCNQ1*

El gen *KCNQ1* codifica para el canal de potasio KCNQ1. Este, al igual que todos los canales Kv7, es un tetrámero, en el cual cada subunidad presenta seis segmentos transmembrana (S1-S6), donde S1-S4 conforman el VSD, y S5-S6 integran el dominio del poro (**Figura 1**) (Jensen et al., 2007; Yundi Wang et al., 2020). El PIP2 y la calmodulina se encuentran entre las moléculas de señalización que modulan la actividad de este canal (Sun & MacKinnon, 2020). La estructura y propiedades de los canales KCNQ ya fueron descritas con más detalle en una sección anterior (Ver: [Estructura del canal y propiedades biofísicas](#)). Este canal de potasio es responsable de la I_{Ks} , la corriente lenta de salida de potasio que contribuye a la fase 2 del potencial de acción cardíaco (**Figura 8**) (Wu & Larsson, 2020). Mutaciones en este canal, que afectan la funcionalidad del mismo, y alteran entonces la I_{Ks} , se han asociado como responsables del SQTL tipo 1 (Galić et al., 2021).

– *KCNH2*

El gen *KCNH2* codifica para la proteína hERG, un canal de potasio dependiente de voltaje esencial para mantener un ritmo cardíaco normal (M. C. Sanguinetti et al., 1995). Particularmente, este canal es el responsable de la I_{Kr} , la corriente rectificadora de potasio rápida, que interviene en la fase 3 de repolarización del potencial de acción cardíaco (**Figura 8**). De allí que mutaciones con pérdida de función en *KCNH2* están asociadas con SQTL2 (Engelbrechtsen et al., 2018).

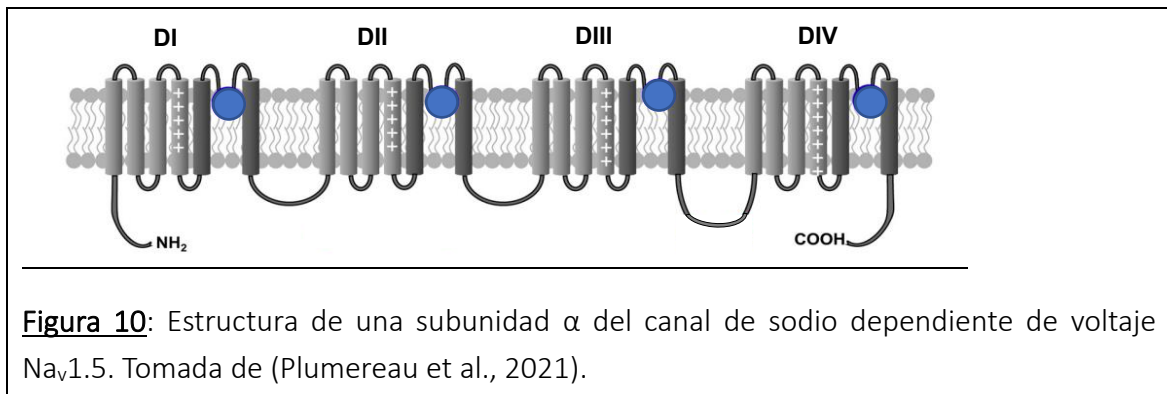
La proteína hERG tiene una estructura típica de los canales iónicos de potasio, que consta de cuatro subunidades dispuestas alrededor de un poro central. Cada subunidad tiene seis segmentos transmembrana (S1-S6), donde los segmentos S1-S4 forman el VSD, mientras que los segmentos S5-S6 forman el dominio de conductancia, que es responsable de la permeabilidad selectiva del canal al ion potasio. Este canal posee también extremos N-terminal y C-terminal citoplasmáticos (Ben-Bassat et al., 2020). Sin embargo, algo exclusivo de la familia de canales KCNH, la región N-terminal contiene un dominio eag, y la región C-terminal contiene un dominio de homología de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD), y ambos dominios forman un complejo intracelular crucial para la función del canal (Coddling et al., 2020).

– *SCN5A*

El gen *SCN5A* codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje $\text{Na}_v1.5$, que juega un papel crucial en la generación y propagación del potencial de acción en las células cardíacas (Grant, 2009). Mutaciones en este gen se han asociado al SQT3, siendo el mecanismo para la prolongación del intervalo QT una corriente persistente o tardía de Na^+ , que conduce a un aumento en la duración de la meseta del potencial de acción cardíaco (George et al., 1995) (**Figura 8**). La mayoría de las mutaciones ligadas al SQT3 se localizan en los exones 23, 26, y 28, que codifican el enlazador III-IV o puerta de inactivación, el dominio sensor de voltaje, y el extremo C del canal de sodio, todos ellos están involucrados en la inactivación rápida del canal. Estas mutaciones generan un aumento en el número de canales que no pueden alcanzar un estado inactivado estable, lo que conduce a un aumento de las corrientes persistentes de Na^+ (Plumereau et al., 2021).

El $\text{Na}_v1.5$ posee una estructura similar a la de los canales de potasio antes mencionados. Es una proteína transmembrana que consta de cuatro subunidades α ensambladas que forman el canal funcional. A su vez, cada subunidad α que integra este canal de sodio está compuesta por cuatro dominios de repetición (DI-DIV); cada uno de ellos consiste en seis segmentos transmembrana (S1-S6), donde S1-S4 forman el dominio de sensor de voltaje, con los S4 cargados positivamente, y S5-S6 forman el dominio de unión al sustrato (**Figura**

10). Los cuatro S5-S6 y los loop-P entre estos segmentos constituyen la región formadora del poro central de la subunidad α , y a su vez contienen un filtro que determina la selectividad iónica del canal (Wenjia Li et al., 2018; Plumereau et al., 2021; Veerman et al., 2015). Los cuatro dominios están interconectados a nivel intracelular mediante cadenas peptídicas. Los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína se ubican en el lado intracelular.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Teniendo en cuenta que las subunidades que conforman los canales KCNQ se expresan en numerosos tejidos, el objetivo general de esta tesis consiste en analizar su participación en diferentes funciones fisiológicas y patológicas, que incluyen:

- ✓ Estudiar cambios epigenéticos en el cerebro en un modelo murino de autismo, y tras la administración de una dieta cetogénica.
- ✓ Determinar la expresión de los canales KCNQ en el PPN, y la funcionalidad de la subunidad KCNQ4 en dicho núcleo.
- ✓ Realizar el diagnóstico genético de pacientes con SQTL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

○ CAPÍTULO 1:

- ✓ **Generar del modelo murino de autismo por exposición prenatal a AVP, y analizar los efectos epigenéticos que alteran el neurodesarrollo.**

El modelo del AVP ha demostrado poseer muchas de las características estructurales y de comportamiento que se observan en el autismo, aunque no reproduce la totalidad de las características identificadas en este desorden. Los objetivos de este capítulo son: 1) inducir fenotipos de autismo en crías mediante el método de exposición prenatal a una monodosis de AVP; 2) realizar ensayos conductuales que evalúan la interacción social, conductas repetitivas y ansiedad, para analizar los fenotipos de los TEA.

○ CAPÍTULO 2

- ✓ **Caracterizar los efectos de una KD sobre la expresión génica y la conducta animal.**

La cetosis induce cambios metabólicos y epigenéticos que favorecen el tratamiento de algunas patologías, tales como epilepsia y autismo. Los objetivos de este capítulo son: 1)

administrar una dieta alta en grasas, moderada en proteínas y baja en carbohidratos, para promover un estado de cetosis en ratones; 2) realizar ensayos conductuales para analizar el impacto de la KD sobre el comportamiento social, ansiedad y memoria de reconocimiento; 3) analizar la expresión de genes involucrados en la modulación de la excitabilidad neuronal, procesos de memoria y aprendizaje, el control del estrés oxidativo, en hipocampo y corteza prefrontal.

○ CAPÍTULO 3

✓ Analizar la expresión de KCNQ4 y su rol en el PPN.

Se ha determinado la presencia de la I_M en neuronas colinérgicas del mesencéfalo. Sin embargo, resta aún conocer las subunidades KCNQ responsables de la misma, su localización celular, y el rol funcional de las mismas en estas neuronas. Por ello, los objetivos de este capítulo son: 1) analizar la expresión de los genes que codifican para las subunidades KCNQ neuronales en el PPN; 2) determinar las propiedades eléctricas de las neuronas colinérgicas y no colinérgicas del PPN en ausencia de KCNQ4 en un modelo murino KO para dicha subunidad; 3) evaluar si KCNQ4 cumple un rol en la modulación de los ciclos de sueño-vigilia, para determinar la importancia fisiológica de la I_M en el PPN.

○ CAPÍTULO 4

✓ Realizar el diagnóstico genético del SQT.

El objetivo de este capítulo es realizar la pesquisa de alteraciones genéticas mediante secuenciación del exoma, a partir de muestras de sangre de pacientes con diagnóstico clínico de SQT. El estudio se enfocará en los genes que codifican para los canales de potasio KCNQ1 (*KCNQ1*) y hERG (*KCNH2*), y el canal de sodio $Na_v1.5$ (*SCN5A*), todos ellos implicados en el desarrollo de distintos tipos SQT, cuyo diagnóstico genético permite optimizar el tratamiento farmacológico en cada caso.

MATERIALES Y MÉTODOS

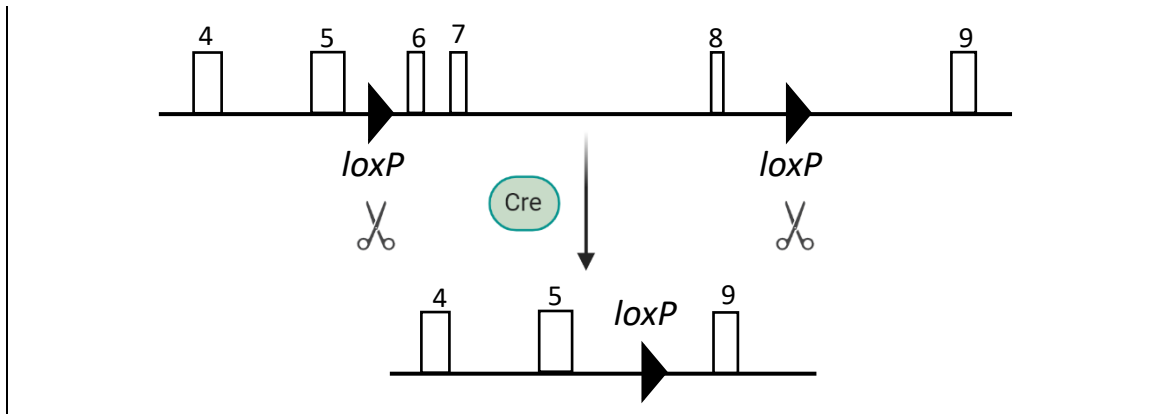
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

Para desarrollar los capítulos 1 y 2 de esta tesis, se emplearon ratones de la cepa C57BL/6 provistos por el bioterio del INIBIBB. Los mismos fueron obtenidos por la técnica de endocría en dicha institución, con el objetivo de mantener la homocigocidad de las crías. Los protocolos realizados con dichos animales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional del Sur (UNS), protocolos N° 125/2018 (Capítulo 1) y N° 176/2021 (Capítulo 2).

Para desarrollar el capítulo 3 de esta tesis se empleó un modelo murino que carece de la expresión del canal de potasio KCNQ4 (KO, *Kcnq4*^{-/-}). Estos ratones fueron donados por el laboratorio del Dr. Thomas Jentsch (MDC, Berlín, Alemania), y se alojaron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB). Los ratones *Kcnq4*^{-/-} fueron creados por recombinación homóloga en células madre embrionarias y posterior tratamiento con la enzima cre-recombinasa (Kharkovets et al., 2006). Como resultado, los exones 6-8 del gen que codifica para el canal KCNQ4 fueron deletados, dando como resultado una proteína truncada al inicio del poro, en el loop P, que resulta no funcional (**Figura 11**). Finalmente, se expresó el alelo *Kcnq4*⁻ en la cepa C3H/HeJ. Como control se utilizaron ratones wild-type (WT, *Kcnq4*^{+/+}), de la misma cepa, que expresan normalmente el canal KCNQ4. Los protocolos realizados con dichos animales fueron evaluados y aprobados por el CICUAE de la UNS, protocolo N° 083/2016.

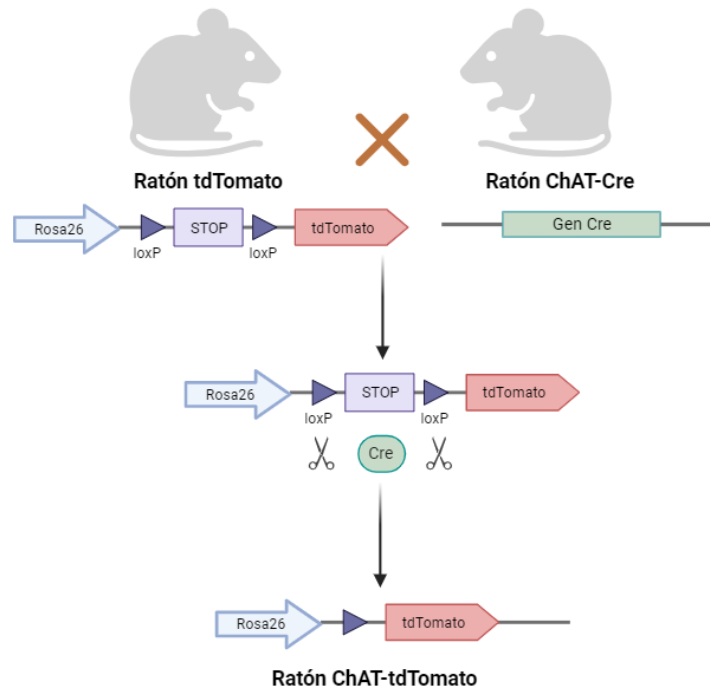
Figura 11: Generación del modelo KO para KCNQ4. Esquema de la secuencia de exones de *Kcnq4* en el ratón, con los puntos loxP insertados en los intrones 5 y 8 que, luego del tratamiento con la Cre-recombinasa, genera un clon en el que la eliminación de los exones 6 a 8 genera una proteína truncada y no funcional. Inspirada en (Kharkovets et al., 2006)



En este capítulo también se emplearon ratones que expresan la proteína fluorescente tdTomato en neuronas colinérgicas (*Chat-tdTomato*). Estos animales fueron proporcionados por el laboratorio dirigido por el Dr. Pal en la Universidad de Debrecen (Hungría). Los mismo fueron obtenidos por el cruzamiento de animales tdTomato [B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}; Jax N° 007905] con otros que expresaban la recombinasa *Cre* en neuronas colinérgicas [B6;129S6-Chat^{tm2(cre)Lowl/J}; Jax N° 006410] (Figura 12). Estos animales fueron criados en el bioterio de la mencionada institución, y utilizados allí en el marco de un proyecto en conjunto. En algunos casos, el tejido necesario para desarrollar las técnicas que se describen posteriormente, fue obtenido en el laboratorio del Dr. Pal y enviado a Argentina para su procesamiento en el laboratorio del Dr. Spitzmaul.

La crianza de los ratones se realizó siguiendo las recomendaciones de la Guía para Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (Institute for Laboratory Animals Research, 2011). Los animales fueron mantenidos condiciones estándar de temperatura (22 ± 4), con un fotoperíodo de 12hs de luz y 12hs de oscuridad (8am a 8pm), y tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento, salvo excepciones experimentales requeridas, que se detallarán donde corresponda. Se mantuvo un máximo de 5 animales por jaula, separados por sexo y edad, y ningún animal fue criado solo para prevenir alteraciones en su conducta. Ratones machos y hembras adultos de 8-10 semanas de edad fueron utilizados en los apareamientos necesarios para obtener los animales experimentales.

Figura 12: Esquema que representa la generación del ratón *ChAT-tdTomato*.



1.1. Identificación de los ratones

Para poder identificar cada animal, se utilizó un patrón universal de numeración, que consiste en realizar diferentes agujeros o cortes en el pabellón auricular de los ratones, cada uno de los cuales simboliza un número diferente. Los agujeros se realizaron con un sacabocados que perfora el tejido realizando círculos de un milímetro de diámetro (FST, #24212- 01). Esta marcación se realizó al momento del destete, en el día postnatal 21. En el caso de los animales de la cepa C3H/HeJ, los fragmentos de tejido obtenidos fueron utilizados para la extracción del ADN genómico, necesaria para realizar el genotipado de los animales. Toda la información referida a la colonia de ratones (número de ratón, genotipo, apareamientos, fechas de nacimiento y de eutanasia, etc.) fue almacenada en una base de datos gratuita (JCMS, The Jackson Laboratory).

1.2. Identificación del genotipo

– Extracción del ADN genómico

El genotipado de los animales se realizó a partir de muestras de ADN genómico (ADNg). El mismo fue extraído a partir de las muestras obtenidas de las orejas al momento de la identificación del animal (Ver: [1.1. Identificación de los ratones](#)), utilizando el método de lisis alcalina. Este consiste en realizar una lisis celular y tisular con 50 µl de una solución de hidróxido de sodio 25mM (NaOH granulado, Anedra), seguida de una incubación a 96 °C por 30 minutos en un baño seco (MK-20, Biotraza). Finalmente se agregan 50 µl de solución neutralizante con Tris-HCl 40mM pH5. Las muestras de ADNg se almacenaron a -20°C, hasta realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

– PCR convencional

Para la identificación de los animales en función de su ADN, y la asignación del genotipo a cada ratón, se realizó PCR convencional o de punto final. Se emplearon para ello cebadores o *primers* específicos que permitieron amplificar fragmentos del gen *Kcnq4* (Tabla 1). Como resultado de la amplificación, se generan dos productos de distinto peso molecular, que permiten diferenciar el genotipo WT del KO. La unión de los *primers* 4908 y 1756 al ADN WT amplifica un fragmento que tiene 342 pares de bases (pb) de longitud. Mientras que, la delección de los exones 6-8 en el ADN del ratón KO, genera el acercamiento de los *primers* 1755 y 1756 y se genera un producto de 460 pb (**Figura 13**). La mezcla de reacción de PCR se realizó con 2 µl de cada muestra de ADNg, 0,2 µl de cada uno de los cebadores 10 µM, 0,4 µl de desoxirribonucleótidos 10 mM (dNTPs, PB-L), 0,2 µl de Taq ADN polimerasa (Taq Pegasus, PB-L), 1,5 µl de buffer de la enzima 10x, 0,45 µl de cloruro de magnesio 50 mM (MgCl₂, PB-L) y agua hasta completar un volumen final de 15 µl. La reacción se realizó en un termociclador (T18, Ivema), siguiendo las condiciones de ciclado expuestas en la Tabla 2. Como control de la reacción y para identificar las bandas, para cada ronda de genotipado se realizó una reacción de PCR conteniendo muestra de ADNg de un animal con genotipo heterocigota.

Tabla 1:

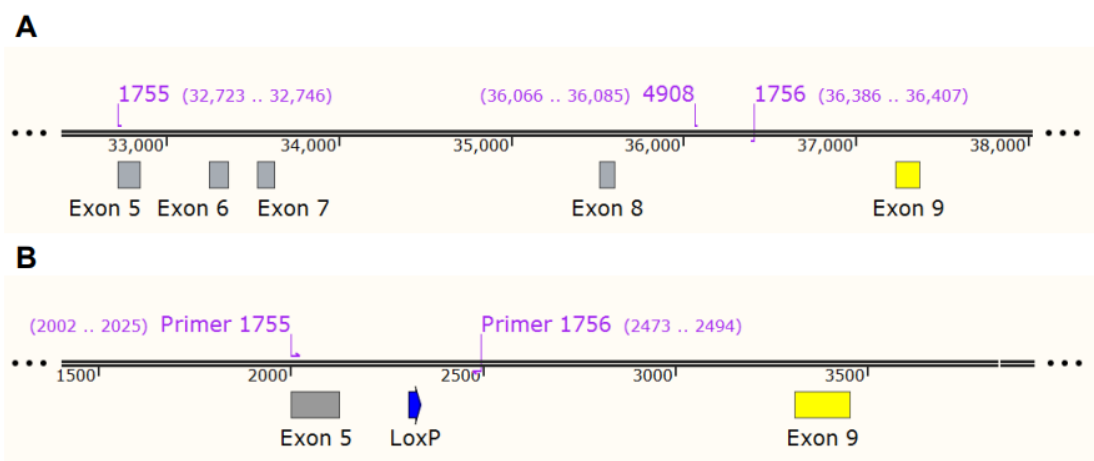
1756	5' GAGCCCCCTTTCCAGACCCTAC 3'
1755	5' AGCTGATCACCGCCTGGTACATCG 3'

4908	5' AGGCTGGGCTGAGACTGAAT 3'
------	----------------------------

Tabla 2:

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
Desnaturalización inicial	1	94 °C	3 minutos	
PCR	30	94 °C	30 segundos	Desnaturalización
		62 °C	30 segundos	Hibridación
		72 °C	30 segundos	Extensión
Extensión	1	72 °C	10 minutos	Extensión

Figura 13: Secuencia génica de los modelos animales. A) Secuencia de ADN de los ratones WT. B) Secuencia de ADN del ratón KO, que presenta la delección de los exones 6,7 y 8. Los números violetas indican el sitio de unión de los primers en el genoma de ambos animales. En ratones WT se produce un amplicón de 342 pb debido a la unión de los primers 4908 y 1756. En ratones KO, la delección de los exones 6-8 genera el acercamiento entre los primers 1755 y 1756, dando como resultado un producto de 460 pb.

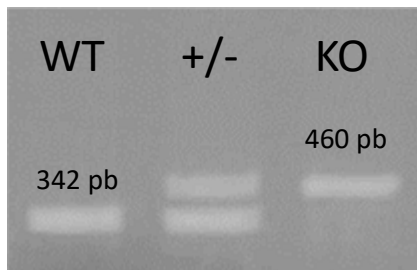


– *Electroforesis en gel de agarosa*

Para visualizar el resultado de la PCR, se utiliza la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se separan los fragmentos de ADN amplificados de acuerdo su peso molecular (**Figura 14**). Se prepara un gel disolviendo la agarosa (ultrapure™ agarose, Invitrogen) al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA) a una temperatura de alrededor de 50 °C. Una

vez disuelta, se agrega bromuro de etidio (10 mg/ml, Inbio highway B0300). Este es un colorante fluorescente que se intercala entre las bases del ADN y permite la visualización de las bandas en el gel. Luego, se agrega buffer de carga a cada una de las muestras obtenidas de la PCR. Este permite otorgarle densidad a la muestra para que sea depositada en el fondo del pocillo del gel y a su vez contiene un colorante que permite controlar el frente de corrida. La electroforesis se realiza en una cuba con buffer TAE 1X acoplada a una fuente de poder. Los ácidos nucleicos poseen cargas negativas conferidas por los grupos fosfato, por ello migran hacia el polo positivo. Una vez terminada la migración de las moléculas de ADN en el gel, se realiza la observación del mismo en un transiluminador UV.

Figura 14: Gel de agarosa donde se visualiza el resultado de un genotipado de ratones.



1.3. Eutanasia

La eutanasia de los ratones se realizó siguiendo las normativas publicadas en la guía de la AVMA (del inglés, American Veterinary Medical Association)(AVMA, 2020). El procedimiento fue realizado por la veterinaria especializada en cuidado de animales de experimentación en el bioterio del INIBIBB, quien utilizó la dislocación cervical para la eutanasia de los ratones.

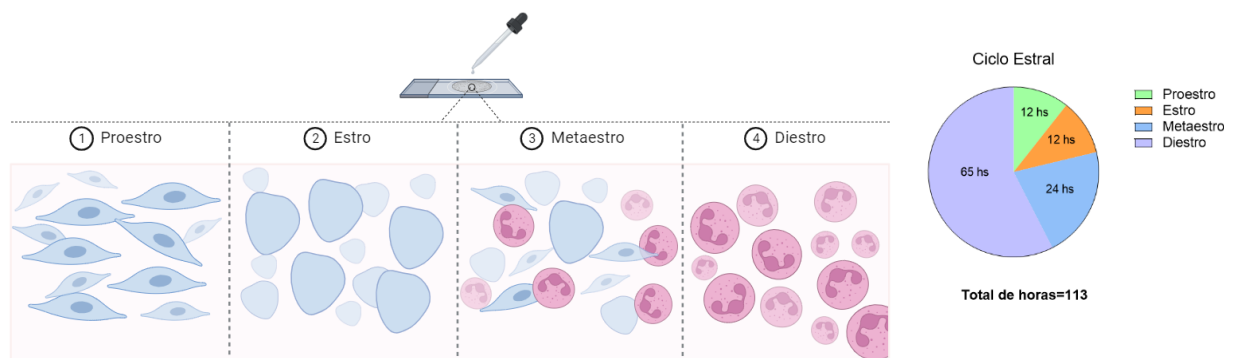
2. Generación del modelo animal de AVP

Se realizaron apareamientos entre machos y hembras nulíparas de 8-10 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Ante la severa dificultad de detectar fehacientemente la presencia de tapón vaginal en las hembras, se optimizaron los apareamientos a través de la

identificación del estadio del ciclo estral mediante citologías a partir de exudado vaginal obtenido por succión con micropipeta y solución fisiológica (Byers et al., 2012). En los ratones, el ciclo estral se divide en 4 estadios cuyas células permiten diferenciarlos: proestro, estro, metaestro y diestro (**Figura 15**), y ese ciclo se repite cada 4-5 días (Green, 1966).

Entonces, fueron apareadas exclusivamente las hembras que se encontraban en estadio estro. Cada hembra fue colocada junto a un macho por la tarde, y por la mañana siguiente se separaron esos apareamientos, y se consideró como el día gestacional 0,5 (GD 0,5). A partir de ese momento se realizó el control de peso diario de la hembra, para confirmar la preñez. Las hembras fueron mantenidas en jaulas conteniendo 4 animales hasta el momento del tratamiento.

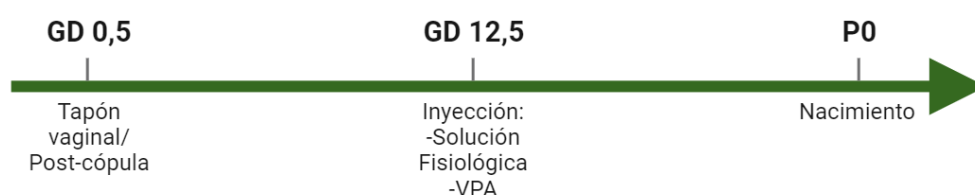
Figura 15: Ciclo estral de ratones hembra. Determinación del estadio del ciclo mediante citología.



En el GD12.5 las hembras fueron aleatoriamente asignadas a un tratamiento y separadas en jaulas individuales. Ese día se administró una inyección subcutánea en el pliegue de la nuca. Un grupo de hembras preñadas recibió una inyección de valproato de sodio (P4543, Sigma) diluido en solución fisiológica, en una dosis única de 600 mg/kg (grupo VPA). Otro grupo de hembras preñadas recibió una inyección de solución fisiológica (grupo control) (**Figura 16**). Se calculó la dosis de acuerdo al peso de la hembra en cada caso, y se administró aproximadamente un volumen de 100 μ L.

El día del nacimiento fue asignado como día postnatal 0 (P0). Durante la primera semana postnatal, no se realizaron cambios de marlo en las jaulas, para evitar alteraciones en el nido y el canibalismo. Sólo se mantuvieron las crías macho. En el P21 se destetaron las crías, fueron separadas de su madre y mantenidas en jaulas conteniendo 4 o 5 animales del mismo sexo y tratamiento hasta su utilización en los experimentos. En cada caso, se emplearon machos provenientes de diferentes camadas.

Figura 16: Esquema de tratamiento prenatal.



3. Elaboración y caracterización de la dieta cetogénica

En el laboratorio del Dr. Spitzmaul, se elaboró una dieta que promueve la cetogénesis en ratones, con el objetivo de que estos alcancen una cetosis nutricional. Esta dieta cetogénica (KD) contiene alta cantidad de grasa (70%), niveles normales de proteínas (25%), y muy baja cantidad de carbohidratos (<1%)(Castro et al., 2017), además de una adecuada suplementación de vitaminas y minerales, como se detalla en la Tabla 3. El alimento obtenido tuvo una textura final pastosa, es decir que se trató de una dieta semisólida. Para realizar este experimento, en paralelo se mantuvo un grupo control de animales, que recibieron el alimento balanceado regular del bioterio (Tabla 4). Cada 100g de KD el aporte energético es de 720 kcal, mientras que el de la dieta normal es de 250 kcal.

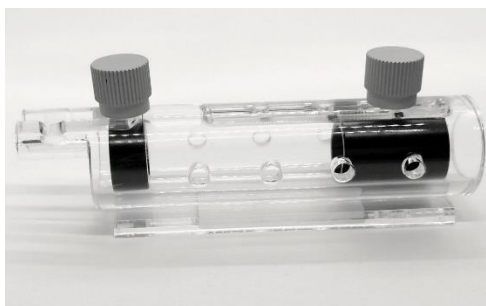
Ambas dietas fueron administradas a animales de la cepa C57BL/6 a partir del destete, en el día postnatal (P) 21. En este experimento se emplearon tanto machos como hembras. La ingesta de las dietas se mantuvo durante 7 días (hasta P28) para un grupo de animales, y hasta P80 en otro grupo de ratones. Los ratones se dividieron en jaulas por sexo, y por tipo de dieta ingerida. Se mantuvo un total máximo de 5 animales por jaula, y nunca se

dejó a ningún animal solo en la jaula, para prevenir alteraciones en su conducta. El alimento se colocó en placas de acrílico en el interior de la jaula, y se renovó diariamente.

Durante ese período se realizó el control de peso diario de los animales, con el objeto de asegurar que los mismos aumentaban su peso corporal. También se controló la cantidad de alimento consumida por los animales por día.

Antes de comenzar la administración de la dieta, se realizó una extracción de sangre por punción de la vena lateral de la cola, para medir la glucemia y cetonemia de los ratones. Posteriormente, se realizó la misma medición cada semana, hasta finalizar el experimento, con el objetivo de determinar el momento en el que los animales que reciben la KD alcanzan el estado de cetosis, y cómo evolucionan luego de ello. Para realizar la cuantificación de glucosa y cetonas en sangre, se colocó al animal en un cepo adaptado para ratones (**Figura 17**), que permite inmovilizarlo, dejando sólo expuesta la cola. Luego, se sumergió la cola en agua a 45°C, para favorecer la vasodilatación. Finalmente, empleando una aguja hipodérmica estéril 25G se realizó la punción de la vena lateral de la cola (Hoff, 2000; NC3Rs, 2021; Parasuraman et al., 2010). De esta forma se puede obtener una gota de sangre de aproximadamente 10 µL, muestra suficiente para realizar la medición de glucosa y cuerpos cetónicos. Para ello se empleó un medidor portátil dual (FreeStyle Optium Neo, Abbott), y tiras reactivas para cetonas (FreeStyle, Optium β-Ketone, Abbott) y glucosa (FreeStyle, Optium, Abbott), que proveen una lectura rápida con poco volumen de muestra (1,5 µL).

Figura 17: Cepo para ratones del INIBIBB.



Con los valores obtenidos de glucemia y cetonemia se calculó el índice glucosa-cetonas (GKI), que se utiliza como biomarcador para analizar el estado de cetosis en el que se encuentra el animal (A. Hernandez et al., 2020; Meidenbauer et al., 2015; Schoeler et al., 2017). Este índice se ha utilizado en humanos y ratones con tumores cerebrales, para realizar el seguimiento del posible efecto terapéutico de una restricción calórica o dieta cetogénica. El GKI puede calcularse empleando la siguiente ecuación (Meidenbauer et al., 2015):

$$GKI = \frac{\text{Glucemia} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right)}{\text{Cetonemia} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right)} = \frac{\text{Glucemia} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right)}{18.016 \left(g * \frac{\text{dL}}{\text{mol}}\right) \text{Cetonemia} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right)}$$

Los valores de GKI obtenidos se interpretaron de acuerdo a la siguiente escala:

GKI >9	No está en cetosis
GKI 6-9	Cetosis leve
GKI 3-6	Cetosis moderada
GKI 1-3	Cetosis profunda

Al finalizar el experimento, en los días P28 y P80, dependiendo del grupo en cuestión, se realizó la eutanasia (Ver: [1.3. Eutanasia](#)) de los animales, y se recolectó una muestra de sangre. A partir de ella se separó el suero, que se empleó para la determinación de parámetros bioquímicos (perfil lipídico, función hepática). Para esto, la muestra de sangre recolectada se dejó en un tubo de 1,5 mL a temperatura ambiente durante 1 h para promover la retracción del coagulo. Luego se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm para separar el suero. Se obtuvieron aproximadamente 150 µL de suero por animal, que se empleó para cuantificar colesterol (Colestat enzimático, Wiener lab.), triglicéridos (TG Color, Wiener lab.), y la enzima hepática aspartato aminotransferasa (GOT/AST, Wiener lab.).

Tabla 3: Componentes de la dieta cetogénica.

Componente	g/100g	Materia prima empleada
Caseína	25,0	Caseinato de calcio (90%), Calcasein, Pulver
Grasa	70,0	Primer jugo bovino
Ácido oleico (omega 9)	0,75	Aceite de oliva extra virgen, La Comarca
Vitaminas:	0,25	
A	0,0012	Suplemento multivitamínico, Supradyn pronatal, Bayer Menadiona bisulfito sódico, Tanvimil K, Raymos D2, Tanvimil D, MegaLabs
E	0,015	
H	0,00020	
B1	0,0016	
B2	0,0018	
B6	0,0026	
B12	0,000004	
B5	0,01	
B9	0,0008	
B3	0,019	
C	0,1	
K	0,0005	
D	0,00065	
Minerales:	4,0	
Sodio	0,5	Suplemento mineral, Supradyn pronatal, Bayer Sulfato ferroso Sulfato de manganeso Fosfato de calcio Sal de mesa
Yodo	0,0004	
Calcio	1,6	
Magnesio	0,2	
Hierro	0,1	
Fósforo	1,6	
Cobre	0,001	
Manganeso	0,02	
Zinc	0,0075	
Carbohidratos	<1	

Tabla 4: Composición del alimento balanceado (Ganave, Grupo Pilar S.A.).

Componente	g/100g
Proteína bruta	25
Extracto etéreo	4
Fibra cruda	10
Humedad	12
Minerales	9

Calcio	1,4
Fósforo	1,2

4. Ensayos conductuales

Los ensayos conductuales en roedores son experimentos diseñados para estudiar el comportamiento de los animales en respuesta a ciertos estímulos o situaciones. Estos ensayos se utilizan frecuentemente, ya que han probado ser herramientas muy valiosas en el estudio de los mecanismos biológicos subyacentes de desórdenes psiquiátricos y enfermedades neurológicas en diversos modelos animales experimentales. También se utilizan para evaluar la eficacia y seguridad de nuevos fármacos en el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos, como ansiedad, depresión, esquizofrenia, entre otros. Durante estos ensayos es indispensable mantener condiciones operacionales estandarizadas, de forma tal que se minimicen factores ambientales cuya variabilidad puede resultar en la falta de exactitud de un resultado (Chesler et al., 2002). Por ello, los ensayos conductuales fueron realizados en el periodo de luz, de 9 am a 7 pm. Previamente, se realizó un período de habituación de 30 minutos en la sala donde fueron llevados a cabo los experimentos, con niveles de luz acordes a los distintos requerimientos de los ensayos. La mayoría de los ensayos conductuales fueron realizados en animales adultos, a partir de las 8 semanas de edad (>P60), a excepción del capítulo 1, donde además se incluyeron animales juveniles (P28).

Los ensayos fueron realizados de manera secuencial, con un intervalo de 7 días entre ensayos (Figura 1). El orden de testeo de las jaulas fue establecido al azar. Las arenas y objetos utilizados en los ensayos fueron limpiados con etanol 20% entre sesiones, de manera de eliminar residuos y olores. Una vez completo el análisis de cada jaula, los animales fueron devueltos a su jaula original. Los ensayos fueron grabados y los videos cuantificados mediante el software de seguimiento digital ANY-maze (Stoelting CO, USA) y un programa de acceso libre publicado por la Universidad de Pensilvania (Patel et al., 2014), que corre sobre MATLAB (R2015, MathWorks).

Los ensayos conductuales se emplearon para confirmar el fenotipo autista (Capítulo 1), mediante la comparación de las respuestas de los ratones AVP respecto a los ratones

control. Del mismo modo, se emplearon para evaluar el impacto de la dieta cetogénica sobre el comportamiento (Capítulo 2), para ello se compararon las respuestas de los ratones KD respecto a los controles.

o 4.1. Ensayo de Campo Abierto (*Open field*)

El ensayo de campo abierto (OF, del inglés *Open Field*) permite evaluar la capacidad de exploración y la ansiedad del animal, en un ambiente novedoso y amplio, con el centro iluminado y desprotegido (condiciones ansiogénicas). Se utilizó una arena blanca de 45x45x30cm, bajo una intensidad lumínica de 200 lux. La arena fue dividida en dos sectores, la periferia, y el centro, ubicado a 12 cm de las paredes (**Figura 18**). Inicialmente se ubica al animal sobre una de las paredes del habitáculo mirando hacia el centro, y se recolecta información sobre sus movimientos dentro del espacio. Se analizan variables exploratorias, como la distancia total recorrida, y parámetros relacionados con la ansiedad, como el tiempo que permanece en el centro del espacio versus el que permanece en la periferia, que se ve reflejado en la tigmotaxia. Para calcular este parámetro se empleó la siguiente fórmula:

$$tigmotaxia = \frac{\text{tiempo en la periferia}}{\text{tiempo en periferia} + \text{tiempo en centro}}$$

Particularmente, en roedores se ha observado que aquellos que presentan niveles elevados de ansiedad tienden a evitar las áreas abiertas o expuestas, y esto puede cuantificarse calculando la tigmotaxia, que relaciona el tiempo que pasa en el centro vs en la periferia de la arena; siendo más ansioso el individuo si la tigmotaxia es mayor dado que revela que prefiere estar cerca de las paredes del aparato para refugiarse.

Se realizó un ensayo de 10 minutos para analizar el fenotipo de los ratones AVP mediante la cuantificación de la distancia total recorrida y la tigmotaxia. Mientras que, para evaluar el impacto de la dieta cetogénica, se realizaron dos OF de 10 minutos en días sucesivos. En los mismos se analizaron la distancia total recorrida como un parámetro de exploración, y la tigmotaxia, para analizar un comportamiento de tipo ansioso. A su vez,

comparando la distancia total recorrida entre el día 1 y el día 2, se evaluó la capacidad de habituación del animal, dado que, si el mismo no reconoce que el espacio es novedoso, no lo explora.

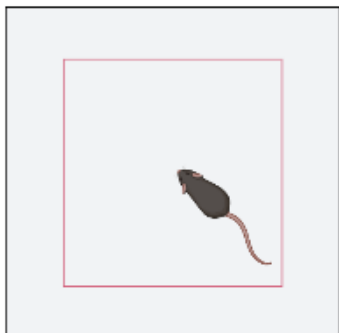


Figura 18: Arena donde se realiza el OF.

El recuadro rojo delimita el centro y la periferia del espacio que el animal explora. Se encuentra a 12 cm de las paredes del aparato.

o 4.2. Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (*NOR test*)

El ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (*NOR test*, del inglés *Novel Object Recognition*) se incluye para analizar memoria de reconocimiento en un habitáculo de 45x45x30cm, en sesiones de 5min (**Figura 19**). En esta prueba, se realiza la habituación al espacio en el día 1. Luego de 24 hs, al ratón se le presentan dos objetos idénticos y se cuantifica el tiempo que permanece con cada uno de ellos (familiarización/entrenamiento). Para ellos se emplearon frascos de cultivo (50 mL) llenos de arena, ubicados en esquinas opuestas del aparato, a 12 cm de la esquina (Leger et al., 2013). Luego a las 6 horas uno de los objetos es reemplazado por una botella de vidrio llena de agua color verde (Kubota et al., 2016) (**Figura 19**). A las 24 horas desde la familiarización se cambia nuevamente el objeto, en este caso por una torre de ladrillos de juguete (**Figura 19**). Los objetos empleados difieren en forma, color y textura, mientras que su tamaño y volumen fueron similares (Baier et al., 2017). En cada caso se calculó un índice de exploración, que relaciona el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso, respecto al tiempo invertido con el objeto familiar. Esta es una estimación de la memoria de reconocimiento. Para calcular este parámetro se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{índice de exploración} = \frac{\text{tiempo explorando objeto novedoso}}{\text{tiempo total (objeto familiar + novedoso)}}$$

Figura 19: Representación del protocolo del NOR test.



o 4.3. Ensayo de Interacción Social

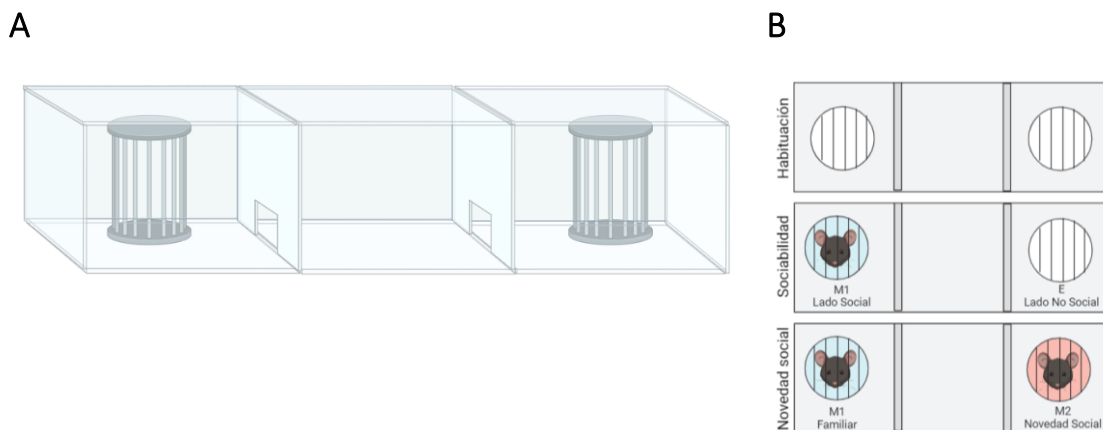
El paradigma de tres cámaras es un ensayo para evaluar sociabilidad y preferencia por la novedad social (Moy et al., 2004; Nadler et al., 2004). En el ensayo el ratón explora una arena de color blanco que se encuentra dividida en tres cámaras de 19x40cm (derecha, central e izquierda), interconectadas por aberturas de 7 cm de ancho. En los compartimentos laterales se colocaron dos cilindros enrejados de 7 cm de diámetro, que permiten que el ratón asome el hocico (**Figura 20A**).

El ensayo consta de una primera fase de habituación de 5 minutos, donde el ratón puede explorar el espacio. Se mide la sociabilidad en un siguiente período de 10 min durante el cual el ratón puede interactuar con un cilindro vacío (E, del inglés *empty*) en una de las cámaras, mientras que en la otra cámara el cilindro contiene un ratón extraño (M1) del mismo sexo y edad que el ratón experimental, de manera tal de evitar interacciones de tipo sexual (**Figura 20B**). Durante ambas fases se cuantificó el tiempo de interacción con cada uno de los cilindros, así como el tiempo de permanencia en cada cámara. Se consideró como exploración activa los momentos en los que el animal se encontró con el hocico entre las rejas del cilindro o dirigido hacia él a una distancia menor a 1 cm.

La preferencia por la novedad se analiza introduciendo un segundo extraño (M2) donde estaba la taza vacía durante otro período de 10 min (**Figura 20B**). Se registra el tiempo que permanece en cada cámara y el tiempo durante el que interacciona con cada ratón extraño.

Para que el ensayo sea válido, es esperable que los controles muestren una conducta social normal, que implica una sociabilidad elevada, es decir que prefieren estar en contacto con el M1 antes que la cámara vacía. También deben presentar preferencia por la novedad social, es decir que deben estar más tiempo con el M2 que con el M1.

Figura 20: A) Aparato donde se realiza el ensayo de interacción social. B) Esquema experimental del ensayo.



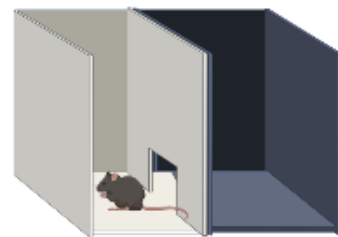
o 4.4. Ensayo de auto-acicalamiento (*Self-Grooming*)

El acicalamiento o grooming es un comportamiento innato de los roedores, es así que la cuantificación de los episodios de grooming se incluye para analizar conductas repetitivas y comportamiento estereotipado en los ratones, un comportamiento que puede poner de manifiesto trastornos del neurodesarrollo así como también la exposición a condiciones estresantes (J. N. Crawley, 2007, 2012). La observación y cuantificación de este comportamiento se realizó durante el ensayo de OF, se analizó el auto-acicalamiento durante 5 min, siendo considerado un episodio de grooming aquel que sigue el siguiente patrón de progresión cefalocaudal: lamido de patas delanteras, lavado de nariz y cara, lavado de cabeza y de cuerpo, lamido de patas traseras, y finalmente lamido de cola/genitales (Kalueff & Tuohimaa, 2004; H. Liu et al., 2021). Se midió la frecuencia de grooming y el tiempo total durante el cual el ratón hizo grooming.

o 4.5. Caja de Luz-Oscuridad

Este ensayo se basa en el comportamiento exploratorio espontáneo de los roedores y en su aversión innata a la luz. El aparato cuenta con un compartimento oscuro y seguro, y un compartimento iluminado aversivo (**Figura 21**). Este ensayo representa un conflicto para el animal, por la contradicción que el instinto de recorrer un espacio nuevo y a su vez la tendencia de evitar lo desconocido, que se conoce como neofobia (Bourin & Hascoët, 2003; J. Crawley & Goodwin, 1980). La cámara iluminada fue una arena blanca de 20x40 cm, bajo una intensidad lumínica de 200 lux, lo suficientemente ansiogénica para que no prefieran dicha cámara, pero asegurando que los controles pasen 25% del tiempo de ensayo en la cámara con luz. Se ubica al animal en la cámara con luz, y se lo deja recorrer el espacio 5 minutos. Se cuantificaron el tiempo que pasó el ratón en la cámara con luz, el número total de entradas a dicho compartimento, y la latencia a ir a la oscuridad.

Figura 21: Esquema del aparato utilizado en el ensayo de la caja de luz-oscuridad.



5. Análisis de expresión génica

o 5.1. Disección del cerebro

Los animales fueron sacrificados de acuerdo a lo previamente explicado (Ver: [1.3. Eutanasia](#)). Se extrajo el cerebro de cada ratón, y se colocó en buffer PBS 1X frío sobre una placa congelada, para preservar el ARN.

Para llevar a cabo los experimentos del capítulo 3, a partir del cerebro de animales WT y KO de la cepa C3H/HeJ, se realizaron dos cortes coronales, entre -4.16 mm del bregma y -4.96 mm (Franklin, K.B., Paxinos, 1997). Una vez obtenida esa sección de cerebro que contiene al núcleo pedúnculo pontino (PPN), con un sacabocados se extrajeron ambos núcleos cerebrales (**Figura 22**).

Para realizar experimentos del capítulo 2, a partir del cerebro de animales de la cepa C57BL/6, se descartó en primer lugar el bulbo olfatorio. Luego se realizó un corte coronal

a 1 mm del Bregma para obtener la corteza prefrontal (Cx). Con el resto del cerebro se realizó un corte sagital, para separar así el hipocampo (HPC) (**Figura 23**).

Figura 22: Disección del PPN.

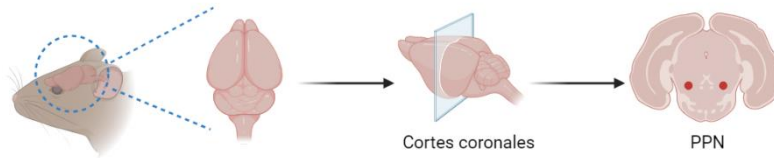
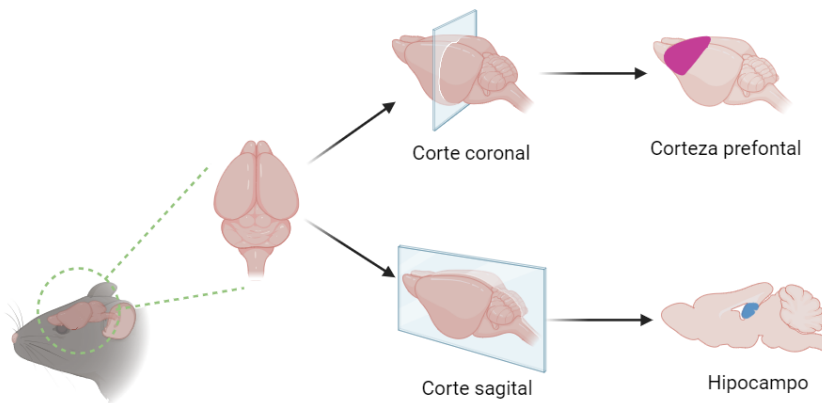


Figura 23: Disección de Cx e HPC.



o 5.2. Extracción de ARN de regiones cerebrales

Cada una de las regiones cerebrales previamente aisladas se colocó en un tubo eppendorf conteniendo 500 μ L de reactivo para extracción de ARN total (Quick-Zol, Kalium Technologies). Primero, las muestras se sometieron al agitador vórtex para favorecer la lisis del tejido. Luego, cada muestra se homogeneizó manualmente con un homogeneizador de polipropileno de punta cónica (Pestle, Biofil). Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente para separar los componentes insolubles. El sobrenadante se separó en un tubo eppendorf de 1,5 mL, para proceder luego a la purificación del ARN. Para ello se emplearon columnas compatibles con reactivos a base de ácido-guanidinio-fenol (Direct-Zol RNA MiniPrep, Zymo Research). El protocolo de purificación consiste en pasos sucesivos de agregado de reactivos de lavado y centrifugaciones. Durante el mismo se realizó un tratamiento con ADNasas, para eliminar

posibles rastros de ADN genómico. Finalmente, se obtiene el eluido que contiene el ARN. La concentración del mismo se midió a una absorbancia de 260 nm utilizando una placa que permite obtener medidas fotométricas a partir de un bajo volumen de muestra (μ Drop™ Plate, Thermo Scientific) en un lector de placas compatible (MultiSkan GO, Thermo Scientific). También se midieron las absorbancias a 280 nm y 230nm, para calcular los coeficientes 260/280 y 260/230, que dan un indicio de la presencia de proteínas y sales, respectivamente, es decir, que así se estimó la pureza de la muestra obtenida. La integridad del ARN se evaluó corriendo un gel de agarosa para visualizar las diferentes bandas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S (**Figura 24**). Las muestras de ARN se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para la extracción de ARN del PPN, debido a la poca cantidad de tejido que representa cada uno de estos núcleos del cerebro medio, se utilizó un pool de 3 animales por cada una de las muestras. En cambio, para hipocampo y corteza prefrontal cada muestra contiene el tejido de un único animal.

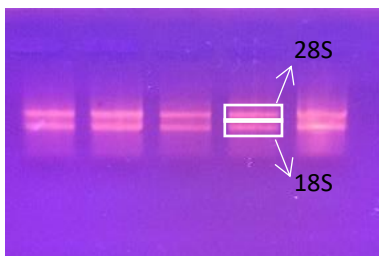


Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa del ARN total extraído. Se observan en cada calle dos bandas, que corresponden al ARNr 18S y 28S, que no muestran degradación, siendo así una manera de constatar que el ARN se logró extraer y se encuentra intacto.

o 5.3. Transcripción reversa

La reacción de retrotranscripción (RT) se utilizó para la síntesis de la primera cadena del ADN complementario (ADNc). Para llevarla a cabo, se utilizó la enzima transcriptasa reversa, que es una ADN polimerasa dependiente de ARN, capaz de sintetizar ADNc a partir de moldes de ARN. El protocolo de la reacción comienza con la incubación a 70°C durante 5 min de 1 μ g de ARN, con 1 μ L de anchored oligo (dT) *primers* y agua libre de ARNasas hasta alcanzar un volumen final de 13.5 μ L. Este paso permite la relajación de la estructura secundaria del ARN. Luego se colocan los tubos durante 2 min en hielo.

Posteriormente, se agregan el resto de los reactivos: 1 μ l de dNTPs 10 mM (Mezcla de dNTPs, PB-L), 1 μ l de enzima transcriptasa reversa (M-MLV Transcripta, PB-L), 4 μ l de buffer 5X, y 0.5 μ l de inhibidor de ribonucleasas 50 U/ μ L (TransGene Biotech). Se incubó a 42 °C por 1 hora. Finalmente, se calienta la reacción a 85 °C durante 10 segundos para la inactivación de la enzima. Como control de la retrotranscripción y para asegurar la ausencia de contaminación con otro tipo de material genético, se realizó una mezcla conteniendo todos los reactivos menos la enzima (RT-) y otra mezcla sin ARN (NTC, del inglés, *no template control*).

o 5.4. Validación de *primers*

Para realizar las PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), se diseñaron específicamente *primers* para dirigir la amplificación a las secuencias de interés (Tabla 5), teniendo en cuenta que los mismos sólo reconocieran ARNm y no amplificaran también ADNg, y así prevenir sobreestimaciones de la cuantificación. Los *primers* se diseñaron empleando diversas herramientas bioinformáticas, como PrimerBLAST, SnapGene, OligoAnalyzer, entre otras.

Previo a su uso con las muestras en estudio, dichos *primers* fueron puestos a punto mediante PCR convencional para optimizar la temperatura de fusión (T_m). Para ello se emplearon controles positivos (Tabla 6), es decir, tejidos donde la expresión del gen de interés ha sido previamente demostrada. Las muestras de los tejidos control positivo fueron obtenidas siguiendo los pasos previamente explicados para la obtención de las muestras de estudio.

La mezcla de reacción de PCR se realizó con 2 μ l de cada muestra de ADNc, 0,2 μ l de cada uno de los cebadores 10 μ M, 0,4 μ l de desoxirribonucleótidos 10 mM (dNTPs, PB-L), 0,2 μ l de Taq ADN polimerasa (Taq Pegasus, PB-L), 1,5 μ l de buffer de la enzima 10x, 0,45 μ l de cloruro de magnesio 50 mM ($MgCl_2$, PB-L) y agua hasta completar un volumen final de 20 μ l. La reacción se realizó en un termociclador (T18, Ivema), modificando la temperatura de hibridación, para optimizar la reacción.

La validación se realizó empleando ADNc obtenido a partir de las muestras de tejidos control positivo. Además, en cada caso, se incluyó un tubo de reacción con ARNm de cada muestra (es decir, sin proceso de transcripción reversa), y también un tubo sin muestra (NTC), para descartar falsos positivos por presencia de ADN genómico y posibles contaminaciones, respectivamente.

o 5.5. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se utilizó para cuantificar la cantidad relativa de ARN mensajero (ARNm) de un gen específico, con el objetivo de estudiar la regulación de la expresión de esos genes en diferentes condiciones. La cuantificación se llevó a cabo en relación a dos genes de referencia o endógenos, que son genes que se encuentran constantemente expresados en una amplia variedad de condiciones y en diferentes tipos celulares, lo que significa que su expresión no varía significativamente. En este caso se utilizaron *Tbp* (codifica para la proteína de unión a la caja TATA), *Gapdh* (codifica para la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y *Hprt* (codifica para la proteína hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa). Para realizar las qPCR, se utilizaron los *primers* que se diseñaron específicamente para dirigir la amplificación a las secuencias de interés (Tabla 5), que fueron previamente puestos a punto.

El protocolo de la qPCR consistió en preparar una mezcla en un tubo de 0,2 mL conteniendo 0.5 µL de cada primer (10 µM, Macrogen, Corea), 2 µL de muestra con ADNc (dilución 1:3) y 5 µL mástermix (Master Mix qPCR 2.0, PB-L) y agua libre de ADNasas y ARNasas hasta completar un volumen final de 15 µL. Esta mástermix comercial contiene SYBR Green I, que es una molécula intercalante del ADN fluorescente, de allí que a partir de esta reacción se puede relacionar el número de ciclos de amplificación y la fluorescencia, que a su vez se correlaciona con la cantidad de ARNm presente en la muestra. Para cada gen de interés, las muestras se evaluaron por triplicado. En cada corrida se incluyó un control sin ADNc (NTC), para detectar posibles contaminantes presentes en la reacción. Las mezclas de reacción se incubaron en un ciclador para PCR en tiempo real (Rotor-Gene 6000, Corbett Research). Las condiciones de la qPCR

empleadas fueron las recomendadas por el fabricante de la enzima (Tabla 7), empleando las Tm óptimas para cada par de *primers*.

El análisis de datos se realizó con el programa Rotor-Gene 6000 1.7 y la expresión relativa de ARNm se obtuvo mediante el método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008).

Tabla 5: *Primers* empleados en qPCR.

Gen	Primer	Secuencia	Amplicón (pb)	Temperatura (°C)
<i>Kcnq2</i>	Forward	GGGGCCCAACAATAACGGAT	101	60
	Reverse	TTTCTCCACCTTCCCAAGCC		
<i>Kcnq3</i>	Forward	CGCGCTTGTGTTCTGATTG	155	62
	Reverse	CAGCCCAGATCCTCAAAGCA		
<i>Kcnq4</i>	Forward	TATGGTGACAAGACGCCACAT	157	60
	Reverse	GCTTCTCAAAGTGCTTCTGCC		
<i>Kcnq5</i>	Forward	GCTCGGCTCTGTGGTTTATG	189	60
	Reverse	TTGTCTCCATAGCCAATGGTTG		
<i>Foxo3</i>	Forward	GAAGGGAAGGAGCCGAGGTAG	179	60
	Reverse	TCCACTTCGAGCGGAGAGAG		
<i>Sod1</i>	Forward	TGGCCGTACAATGGTGGTCC	145	60
	Reverse	CTCAGACCACACAGGGAATGT		
<i>Sod2</i>	Forward	GGACCCATTGCAAGGAACAAC	186	60
	Reverse	TGGCCGTGAGTGAGGTTTC		
<i>Chrna7</i> (<i>alfa7</i>)	Forward	CGTGCCCTTGATAGCACAG	171	56
	Reverse	TTCATGCGCAGAAACCATGC		
<i>Chrb2</i> (<i>beta2</i>)	Forward	CGCAGTGGGCACTTCAGC	208	54
	Reverse	AGTACCCAAAACCCCTGAACA		
<i>Chrna4</i> (<i>alfa4</i>)	Forward	GCTTGTGATTGCTCAGCTC	194	54
	Reverse	CCCGTCCGCGTTGTTGTA		
<i>Hdac3</i>	Forward	GTTGCCCGGTGTTGGACATA	110	60
	Reverse	TGGAGTGTGAAATCTGGGGC		
<i>Hprt</i>	Forward	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGA	120	60
	Reverse	ACCCCGTTGACTGATCATT		
<i>Tbp</i>	Forward	CCTTGTACCCTTCACCAATGAC	119	60
	Reverse	ACAGCCAAGATTCACGGTAGA		
<i>Gapdh</i>	Forward	GAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC	157	60

	Reverse	ATCGAAGGTGGAAGAGTGGG		
<i>ChAT</i>	Forward	AAGTCCCTGCAGTTTGTGGT	175	60
	Reverse	TTCTGGGAGCAGGGAGTTCA		

Tabla 6: controles positivos empleados en la validación de *primers*.

Gen	Tejido control positivo
Kcnq2	hipocampo
Kcnq3	Hipocampo
Kcnq4	Mesencéfalo
Kcnq5	Hipocampo
Foxo3	Mesencéfalo
Sod1	Mesencéfalo
Sod2	Mesencéfalo
<i>Chrna7</i>	Hipocampo
<i>Chrna4</i>	Hipocampo
<i>Chrb2</i>	Hipocampo
<i>hdac3</i>	mesencéfalo

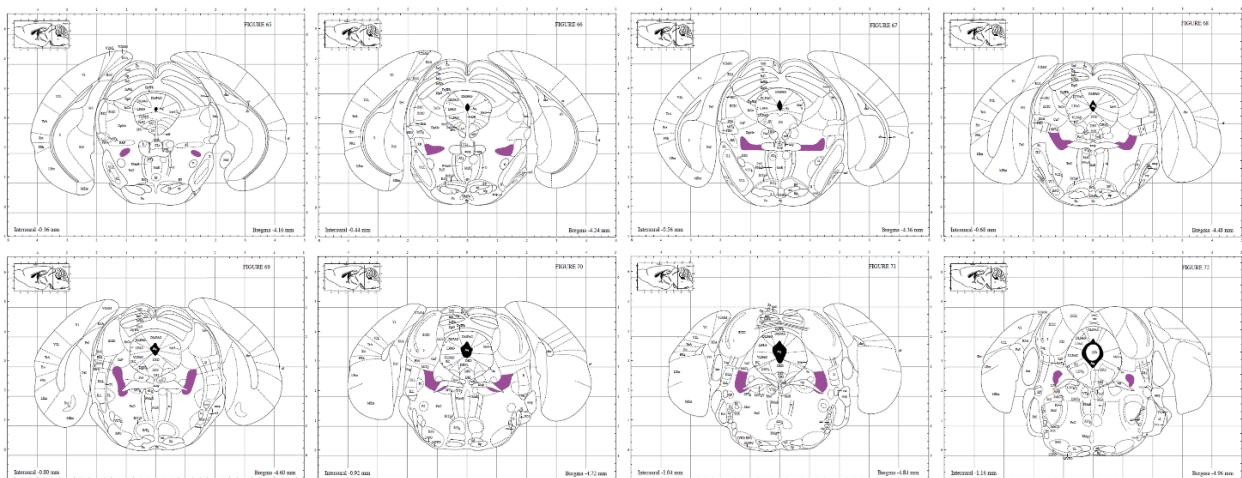
Tabla 7: protocolo de ciclado para qPCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
Desnaturalización inicial	1	94 °C	5 minutos	
PCR	45	92 °C	15 segundos	Desnaturalización
		56-62 °C	20 segundos	Hibridación (T _m)
		72 °C	30 segundos	Extensión

6. Obtención de secciones coronales de cerebro

Los animales fueron sacrificados de acuerdo a lo previamente explicado ([1.3. Eutanasia](#)). Se obtuvo el cerebro entero de cada animal, y se realizó un corte coronal en -1.46 mm del Bregma, descartando la porción frontal, con el objetivo de reducir el tamaño de la muestra experimental, pero a su vez mantener la cantidad de tejido suficiente que facilite la manipulación y posterior nivelación del mismo para conseguir las secciones necesarias. Con el resto del cerebro obtenido, se realizó un lavado en buffer PBS 1X, y se fijó con PFA 4% durante 24hs. Luego se realizó la crioconservación en sacarosa 30% en buffer PBS 1X durante 24hs, con el objetivo de evitar la deformación del tejido y evitar la formación de cristales. Los cerebros se congelaron a -20°C. Al momento de realizar los cortes en crióstato (Leica CM 1860), los cerebros se montaron sobre la platina portamuestras sobre medio de montaje para congelación (Cryoplast, Biopack). Se obtuvieron rebanadas de cerebros de 15 µm de espesor, utilizando una cuchilla para criostato (MB35, Thermo Electron Corporation). Se obtuvieron secciones cerebrales que contenían el núcleo de interés entre -4.16 mm del bregma y -4.96 mm (Franklin, K.B., Paxinos, 1997), empleando el Atlas de Franklin y Paxinos para identificar el área correctamente (**Figura 25**). Las muestras obtenidas fueron conservadas en buffer glicerol-PBS 50% a -20°C para evitar su congelamiento hasta realizar la tinción.

Figura 25: Figuras del Atlas de Franklin y Paxinos. Secciones de cerebro entre -4.16 mm del bregma y -4.96 mm, que contienen el PPN (violeta).



7. Inmunofluorescencia sobre rebanadas de cerebro

En primer lugar, las secciones de cerebro previamente obtenidas se colocaron en pocillos individuales en placas de 24 pocillos. Luego, se realizó una post fijación con PFA 2% durante 1 h. Se lavó tres veces con buffer PBS 1X durante 10 min. Para exponer los epítomos y así mejorar accesibilidad de los anticuerpos a los antígenos y aumentar la sensibilidad de la detección, se realizó un protocolo de recuperación. El mismo implica una incubación a temperatura ambiente con glicina 0.3 M (Merck) durante 30 min, y una posterior incubación de las secciones en buffer citrato de sodio 10mM (pH 6) a 80°C durante 30 min. Se lavó nuevamente tres veces con buffer PBS 1X durante 10 min. Se bloqueó y permeabilizó con una solución compuesta de BSA 2%, NP-40 0,5% en PBS 1X durante 1 h. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos primarios (Tabla 8) y se incubó durante 48 h a 4°C en cámara húmeda. Una vez cumplido el tiempo, se lavó tres veces con buffer PBS 1X durante 10 min. Luego, se agregaron los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos (Tabla 9), y se incubó durante 24 h. Se lavó con buffer PBS 1X durante 10 min. Luego se incubó con DAPI (1:1000, Thermo Fisher) por 10 min, para identificar núcleos celulares. Se realizaron los últimos dos lavados de 10 min con buffer PBS 1X. Finalmente, se procedió al montaje de las secciones cerebrales en portaobjetos, empleando el medio de montaje Fluoromount-G (Southern Biotech) con el objetivo de preservar la señal de fluorescencia de las muestras marcadas con fluorocromos, además de prevenir el deterioro/deshidratación de la muestra con el tiempo.

Tabla 8: Anticuerpos primarios

Antígeno	Especie	N° de Catálogo + Proveedor	Dilución
Colinacetiltransferasa (ChAT)	Cabra	#AB144P, EMD Millipore	1:100
KCNQ2	Conejo	#APC-050, Alomone Labs	1:200
KCNQ3	Conejo	#APC-051, Alomone Labs	1:100
KCNQ4	Conejo	Donado por Dr. Thomas Jentsch (MDC, Berlín)	1:400

KCNQ5	Cobayo	Donado por Dr. Thomas Jentsch (MDC, Berlín)	1:200
-------	--------	---	-------

Tabla 9: Anticuerpos secundarios

Anticuerpo/Fluoróforo	Proveedor	Dilución
Burro anti-cabra 546	Invitrogen	1:1000
Burro anti-conejo 488	Invitrogen	1:1000
Burro anti-cobayo 488	Invitrogen	1:1000

8. Obtención de imágenes de microscopía

La visualización de los preparados se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-600) acoplado a una cámara (K2E Apogee). Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal (Zeiss LSM 900, Airyscan 2). El procesamiento de las mismas se realizó con el software Image J (National Institute of Health) y ZEN 3.7 (Carl Zeiss Microscopy).

9. Electrofisiología en rebanadas de cerebro

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Balazs Pal en la Universidad de Debrecen (Hungria), en el marco del proyecto conjunto MINCyT HU/17/02.

Luego de la eutanasia de los ratones WT y KO de la cepa C3H/HeJ, y animales ChAT-tdTomato, rápidamente se realizó la disección del cerebro. Se colocó el tejido el líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, del inglés *artificial cerebrospinal fluid*) con bajo contenido de sodio helado (aprox. 0 a - 2 °C) en un vibrátomo (Microm HM 650V, Microm International GmbH). Se prepararon cortes coronales de 200 µm de espesor de la región del mesencéfalo que contenía el PPN, entre -4.16 mm y -5.02 mm del bregma (Franklin, K.B., Paxinos, 1997). Los cortes se incubaron en aCSF normal a 37°C durante 1 hora antes de comenzar el registro.

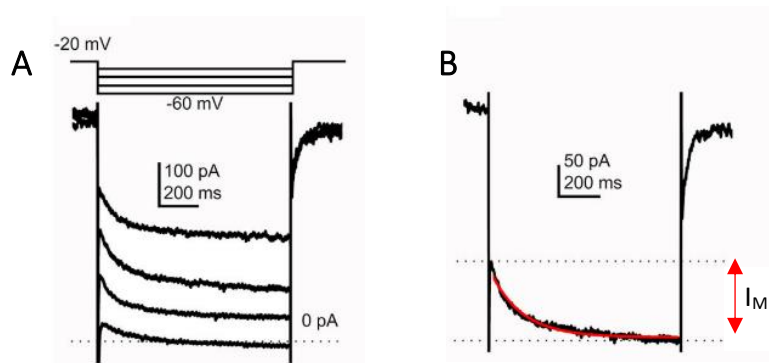
Se realizaron experimentos de *whole-cell patch-clamp* a temperatura ambiente (22–25 °C) sobre somas neuronales, para estudiar la actividad eléctrica de células individuales localizadas específicamente en el PPN. Se utilizaron un amplificador Axopatch 200 A (Molecular Devices), el software Clampex 10.0 (Molecular Devices) para la adquisición de datos, y el software Clampfit 10.0 (Molecular Devices) para el análisis de datos.

Se fabricaron pipetas de vidrio a partir de capilares con una resistencia de 6 a 8 MΩ, y se llenaron con una solución interna de pipeta con la siguiente composición: gluconato de potasio 120 mM, NaCl 5 mM, HEPES 10 mM; fosfocreatinina disódica 10 mM, EGTA 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, magnesio-ATP 5 mM, sodio-GTP 0,3 mM, biocitina 8 mM (pH 7,3). Estas pipetas actuaron entonces como electrodos durante la medición.

En esta técnica, se coloca la punta del electrodo sobre la membrana de la célula para sellar. Luego se aplica una presión negativa (succión) para romper la membrana, permitiendo así el acceso al espacio intracelular. Se logra así que el electrodo esté en contacto con el interior de la célula. El contenido intracelular termina por ser reemplazado por la solución de pipeta, lo que se conoce como diálisis (Segev et al., 2016).

Para obtener los registros de I_M se utilizó una configuración de *voltage-clamp*. Esta técnica electrofisiológica permite medir corrientes iónicas a través de la membrana celular. En estos protocolos, los canales iónicos activados por voltaje se abren y cierran normalmente, pero el aparato compensa los cambios en la corriente iónica para mantener un potencial de membrana constante (*holding potential*). En el protocolo de *voltage-clamp*, las neuronas se mantuvieron a un *holding potential* de –20 mV, en el cual están despolarizadas. De esta manera se logró que se abrieran todos los canales iónicos. Para medir la magnitud de la I_M se empleó una rampa de repolarización de 1 segundo, con voltajes desde –30 a –60 mV, con decrementos de 10 mV (**Figura 26A**). De esta manera, comienzan a cerrarse los distintos canales iónicos, inactivándose todas las corrientes iónicas excepto la I_M , que es una corriente de potasio no inactivante mediada por los canales KCNQ, que corresponde a la fracción de corriente posterior a la corriente instantánea y la corriente estacionaria final (**Figura 26B**). Los registros se realizaron con tetrodotoxina 1 μM (TTX, Alomone Labs), para bloquear la generación de potenciales de acción.

Figura 26: Corriente M. Inspirada en (Koyama & Appel, 2006) y (Bordas et al., 2015).



A) Registros de corriente de neuronas colinérgicas, siguiendo un protocolo de *voltage-clamp* típico para medir la I_M . B) Registro de corriente con un potencial repolarizante de -40 mV. Las líneas punteadas indican la corriente instantánea y la estacionaria, siendo la diferencia entre ellas la magnitud de la I_M .

Para determinar las propiedades del tren de espigas (o *spike train*), que hace referencia a una secuencia de descarga de potenciales de acción de una neurona, se utilizó una configuración de *current-clamp*. Este protocolo permite determinar la diferencia de voltaje a través de la membrana celular mientras se inyecta una corriente en la célula (Nagaeva et al., 2021).

En la configuración de *current-clamp* se utilizó un protocolo de pulsos de 1 segundo corriente cuadrada entre -30 y $+120$ pA, con incrementos de 10 pA. El potencial de membrana en reposo se estableció en -60 mV. A partir de este protocolo se obtuvo el tren de espigas, a partir del cual se calculó el índice de adaptación (AI, del inglés *adaptation index*), utilizando la siguiente fórmula:

$$AI = 1 - \frac{F_{final}}{F_{inicial}}$$

Donde $F_{inicial}$ es la frecuencia promedio de los tres primeros potenciales de acción, y F_{final} es la frecuencia de los últimos dos potenciales de acción (**Figura 27**). El AI permite determinar la adaptación de la frecuencia de gatillado (SFA, del inglés *spike frequency adaptation*) de una neurona, que se refiere a la desaceleración progresiva de la frecuencia de descarga de los potenciales de acción después de una alta frecuencia inicial de picos

durante un período prolongado de excitación (Ha & Cheong, 2017) (**Figura 27**). Este patrón de adaptación de las neuronas se puede observar claramente en presencia de inyecciones sostenidas de corrientes despolarizantes, en este caso de 100 pA. La cuantificación del AI permitió evaluar el efecto de los canales KCNQ sobre las propiedades de la membrana, dado que la reducción de la frecuencia de gatillado que se observa sobre el final del tren de espigas se asocia a estos canales de potasio que, al estar abiertos, hiperpolarizan la membrana celular y dificultan el gatillado de un nuevo potencial de acción.

Sólo se consideraron los registros estables, con corrientes de fuga mínimas. Se incluyeron registros con resistencia en serie por debajo de 20 mΩ para los experimentos de *voltage-clamp* y 30 mΩ para los experimentos de *current-clamp*, con variaciones menores al 10%.

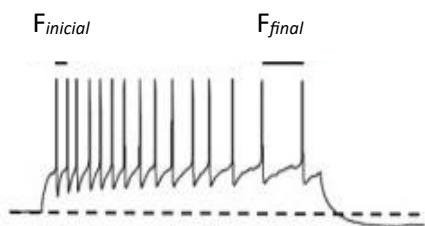


Figura 27: Tren de espigas. Se muestra la desaceleración progresiva de la frecuencia de descarga de los potenciales de acción. $F_{inicial}$ es la frecuencia promedio de los primeros potenciales de acción, y F_{final} es la frecuencia promedio de los últimos dos potenciales de acción. Inspirada en (Ha & Cheong, 2017).

Una vez realizados los experimentos de *patch-clamp*, se determinó la identidad de las neuronas estudiadas con inmunohistoquímica *post-hoc* (Swietek et al., 2016). Las neuronas se marcaron con biocitina durante el registro, dado que formaba parte de la solución de pipeta. Se fijaron las rebanadas de cerebro con PFA 4% durante 24 horas. Luego, se incubaron durante 1 hora con una solución salina tamponada con Tris (Tris base 8 mM, Trisma-HCl 42 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4) suplementada con Triton X-100 al 0,1% y suero bovino al 10%, para la permeabilización y el bloqueo de las proteínas para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.

Para identificar la naturaleza colinérgica de las células, se incubaron las rebanadas 48 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-ChAT (cabra, 1:100, #AB144P, EMD Millipore). Para

el revelado de la biocitina, las muestras se incubaron con estreptavidina conjugada con el fluorocromo Alexa 488 (1:300; Molecular Probes Inc.) durante 90 minutos. También se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra Alexa Fluor 546 (burro, 1:500, Invitrogen).

Luego se obtuvieron imágenes de microscopía con un microscopio confocal (Zeiss LSM 510; Carl Zeiss AG, Alemania). De esta manera, las neuronas registradas se visualizaron en verde, y las neuronas colinérgicas en rojo. Las neuronas registradas se clasificaron entonces en colinérgicas (ChAT-positivas) y no colinérgicas.

10. Estudio genético en pacientes con patologías cardíacas

Se realizó un estudio genético en pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de QT largo, siguiendo el siguiente protocolo (**Figura 28**):

o 10.1. Selección de pacientes

Los pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de síndrome de QT-largo (SQTL) fueron seleccionados por el equipo de cardiólogos del Servicio de Electrofisiología del Hospital Privado del Sur (HPS) de Bahía Blanca. Para ello utilizaron los antecedentes clínicos y familiares, sumados a criterios electrocardiográficos, estableciendo así un puntaje que defina las probabilidades de padecer el SQTL (Schwartz et al., 1975; Schwartz & Crotti, 2011). Para el ingreso al estudio genético los pacientes debieron firmar un consentimiento informado. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del HPS (Expediente Nº 43-30154-2017), siguiendo lo establecido en la Declaración de Helsinki.

o 10.2. Aislamiento del ADN genómico

Una vez seleccionados los pacientes, se obtuvieron muestras de sangre por venopunción. A partir de dichas muestras, se realizó la extracción y purificación del ADN genómico (ADNg) empleando un kit comercial (#K1205, ADN PuriPrep S-kit, Inbio Highway).

o 10.3. Amplificación de los exones. Purificación

El ADNg extraído se utilizó como molde para la amplificación de los exones codificantes de los genes de interés (KCNQ1, KCNH2 y SCN5A) mediante PCR convencional. Para ello, se utilizaron *primers* (Tablas 10, 11 y 12) que fueron diseñados específicamente para hibridar en zonas intrónicas, flanqueando los exones de interés a una distancia aproximada de 100 pb, a fin de amplificar cada exón de forma completa.

La mezcla de reacción de PCR se realizó con 10 µl de muestra de ADNg, 2,5 µl de *primers forward* 10 µM, 2,5 µl de *primers reverse* 10 µM, 1,25 µl de dNTPs 10 mM (dNTPs, PB-L), 2,5 µl de Taq ADN polimerasa (Taq Pegasus, PB-L), 5 µl de buffer de la enzima 10x, 2 µl de cloruro de magnesio 50 mM (MgCl₂, PB-L) y agua hasta completar un volumen final de 50 µl. La reacción se realizó en un termociclador (T18, Ivema), siguiendo las condiciones de ciclado expuestas en la Tabla 13, empleando para cada par de *primers* la temperatura óptima para su hibridación.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% (Ver [Electroforesis en gel de agarosa](#)). En el mismo gel se sembró un marcador de peso molecular (#MA02, Ladder 100pb, PB-L) para constatar que se trataba del producto de amplificación deseado. Tras identificar la banda de interés, la misma se separó del gel y, se procedió luego a la extracción y purificación del ADN a partir de dicha banda mediante un kit comercial (#SA02, Puro Gel Extraction, PB-L).

o 10.4. Secuenciación del exoma

El ADN ya purificado correspondiente a cada exón se envió para su secuenciación por Sanger a un servicio externo (Macrogen Inc., Corea). Se secuenciaron por duplicado cada uno de los exones en sentido 5'→3', y antisentido (3'→5'), empleando los mismos *primers* utilizados en la amplificación por PCR.

o 10.5. Análisis de los datos

Los datos obtenidos tras la secuenciación fueron procesados empleando diferentes plataformas de bioinformática, como SnapGene (V 6.0.5) y Benchling (<https://www.benchling.com/>). En cada caso, las secuencias obtenidas para cada exón

fueron alineadas y comparadas con una secuencia de referencia para cada gen obtenida desde el banco de genes del *National Center for Biotechnology* (NCBI, NIH, USA). Se buscaron posibles variaciones en las secuencias y, una vez identificadas las variantes alélicas, se las clasificó en benigna (B), probablemente benigna (LB), probablemente patogénica (LP), patogénica (P), y de significado incierto (US), siguiendo los criterios de *The American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards et al., 2015). Para la clasificación, cada variante fue investigada en bases de datos internacionales especializadas, como ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) y Varsome (<https://varsome.com/>).

Asimismo, a partir del análisis de los picos en los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación del ADN, se determinó la cigosidad de cada variante genética. Se estableció así que aquellas variantes en las cuales se observó un único pico, que representa a la base nitrogenada que se localiza en esa posición, eran homocigota, es decir que ese individuo posee dos copias idénticas de alelos para ese gen (**Figura 29A**). En cambio, aquellas variantes en las que se observaron dos picos solapados, que representan dos bases distintas en la misma posición, fueron consideradas heterocigota, dado que el individuo posee dos alelos distintos para ese gen (**Figura 29B**).

Figura 28: Protocolo experimental para estudios genéticos.

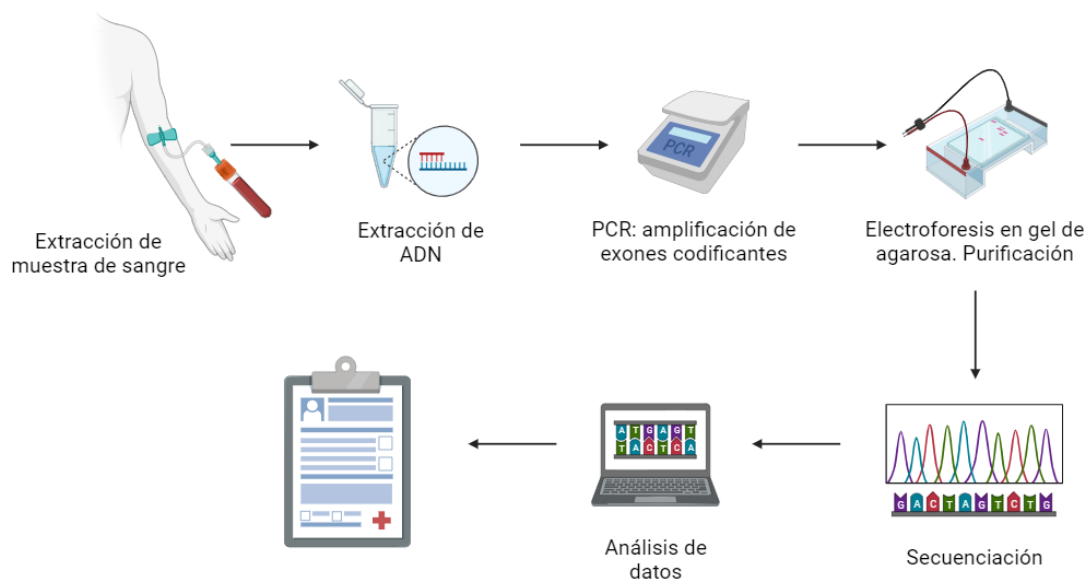


Figura 29: Determinación de la cigosidad de variantes genéticas a partir de electroferogramas. A) Variante homocigota. B) Variante heterocigota.

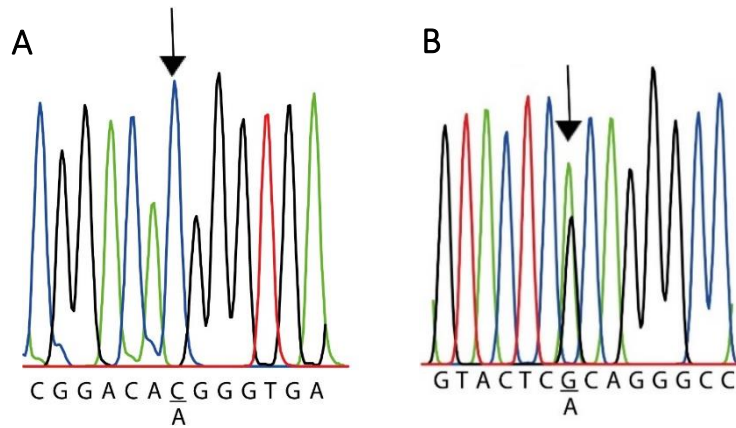


Tabla 10: Lista de *primers* utilizados para amplificar el gen *KCNQ1*

<i>KCNQ1</i>	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Producto (bp)
Exon 1	GGCTAAGCAGGTGGGCTCG	CAGAGCTCCCCACACCAG	853
Exon 2	TCGAAGCACTGTCTGTTCT	GTTCCCCTCAGTCCTTGGTC	433
Exon 3	GCATGGCTGGGTTCAAACAGG	TGCTGAGGGCTGCCAATGC	380
Exon 4	AGACGAGAGCAGGGTGTATG	GCATCTGAGCAAGGTGGATGG	261
Exon 5	CCTGTCGGGATGGACATATAC	CTTGGGCTTGCTCTGAGTC	418
Exon 6	TTAGGCGTCTGCACAGGAG	CAAGCACAGGTTTGTGGACAG	361
Exon 7	ATCAGAGTGGTGGGTTTGG	CTCTGGAGTATAGCACCTTC	340
Exon 8	TTCCAGCACTGACCATACC	CAATGATGGTTCTGACAGGT	304
Exon 9	CATGTCAAGCCTGTGACTCTG	GGACATTGGGATGGCAGGAAC	459
Exon 10	TGTGTGAAGACACTGGAGCTGG	GAAGGCACCTGGAAGGTTTAC	473
Exon 11	ATTGTCAGGGCTGGAGCTTC	GCACTAGGCGAGTAGATAGCAC	479
Exon 12	TGAACACTCTCCTTGTCTGG	CCTTGCAACCCTCCACTATG	306
Exon 13	AACCAGGCTTATGCCATCAC	GGTTGAGAGGCAAGAACTCAG	359
Exon 14	GAGGAAGTCTGAGAGGCAGC	TTCCACACCTAGAGCCTAACC	565
Exon 15	TTTGACTCTCAGCTACCTCC	CAGGAGCTTCACGTTACAC	266
Exon 16A	TGCACTTGCAGAGACGGTTG	GAAGAGGTGGCCTTGCTGAG	548

Exon 16B	TAGTGGTGTCCCCGCTAGG	CCTGTCTGTGTAGGAACCG	1820
----------	---------------------	---------------------	------

Tabla 11: Lista de *primers* utilizados para amplificar el gen *KCNH2*

<i>KCNH2</i>	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Producto (bp)
Exon 2	CACGCACAGCTGCGTTCCG	GCCCTCCTGAAAACCATCTC	626
Exon 3	ATTGAGGGGAGCCATAAGGG	CAAGCCACATCCTCAGGGTA	524
Exon 4	TGGCGGTTTATGATGACTGGA	GCACCCAGGACGTAGTGAAAA	746
Exon 5	GTTTCTTGTGACTCCCCTGG	AGCCCTTTACCAGACCTCTC	584
Exon 6	GGGTGGGCATTCTGATGGAA	GAGCATAGGTTTGCTGGGGT	756
Exon 7	CAGTGTGGGCTTCACTCTT	CCCCCAAACCATGTCACGAT	678
Exon 8	TGGAGCGCAGATGTACAAGG	CATGGGCAAAAAGGGGCAAC	488
Exon 9	CAGGCCTGGAGGTTGAGATTT	AAGGAGAATGTGGGAACCCC	586
Exon 10	ATTGCTTCCCCGTTGTGTG	TCCCTGCCCCCAATGTGATT	538
Exon 11	TAGAGCAGCCTACAAAAGTCCC	GGAAGGGATGGGAAGGTCTGA	402
Exon 12	ATAGAACAAAGGAGGGCCAGG	AGCTGAAAATGTTGGACACTCC	682
Exon 13	CGAGAAGAGCAGCGACACTTG	GAATGGAAGAAGGGGATCCAGC	437
Exon 14	TCCCCTTCTCCATTCTAGCC	GCAGGAACAAGGTTTCAGGGAG	466
Exon 15	TACTTCCCACCTTGGTGCCT	GCTGTGCTTTCGAGTTCCTC	485

Tabla 12: Lista de *primers* utilizados para amplificar el gen *SCN5A*

<i>SCN5A</i>	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Producto (pb)
Exon 2	CTCTCTGCAAATGGTGTCCC	CACCAGTGACTCATTTCCCC	579
Exon 3	TGAGTCTACTGACCTGCCAA	GGAATCAGCGCTACTCTCAC	408
Exon 4	TCTCCTTGAGACCCTGTTT	GGACTGGGAAAGGCAAAAGA	390
Exon 5	TTGATGGCCTCTGTTGAAGG	CTCTCCCCACCAGGATGAG	423
Exon 6	TAAGATGCCCAGGTTTGCCT	TCTGGTGACAGGCACATTCCG	341
Exon 7	GTCTCAAAGCCCAGGAGAAG	TCTAGCCTGGGAAGTCACAA	572
Exon 8	CAGAGGAACAGAAGGAAGGC	CTCCAGAAGCTGTCTCTCT	455

Exon 9	CTGTGGGGCATAAACTGGGT	TGCTGATCCCTTCTCCCTCA	407
Exon 10	TACCCTCCTCCCTAGGCTAT	TCAGCGATACCACATTCA	539
Exon 11	TTGGGGTAGGTGTGCAAGTC	AGGCCATGGGAAACAGGAAG	435
Exon 12	GCCCTCAATGCTCTGAGAAG	TCTGTCTGTCCCCATTAGCA	667
Exon 13	AGGGAGTTGGGAACAGAGAA	AGGCCAGATGTGGGAGTATT	547
Exon 14	CACCTAGCAGCCCTGTCATC	GACCCTGAGATTCCCTCCCT	525
Exon 15	CCAAGCAAACCCCTACTGG	GGTGAAGGCATGACAGATCA	431
Exon 16	TAGTGGGTGCTCTGGGAGAA	TGGACGGATGGGTAGATGGA	620
Exon 17	ATAGCCAAACCTTCCACATT	CATGAGTGGTGGATAGCAG	883
Exon 18	CCTTGAGGGAGGAGTCTTCA	AGAATTTCCATTGGCCCTG	527
Exon 19	TGACAGGCAAAAGTGGCTCT	TCTAAGGCAGGGTGTGGTG	396
Exon 20	CACCCCATCATCGTAGCTC	CCGTGGGGTTGAGAGTTTGT	447
Exon 21	GCAACAGAGCAAGACTGTCT	TACGTCCTCCTTCTCTCTG	448
Exon 22	GCCAGGATACTTTGGGCTT	ACGGCCATAGGACATCAGAA	455
Exon 23	CTCCCTTGAGTGTGGGATCT	GGCACTGTGATCCTCCTATG	557
Exon 24	CTCTGACCACCCAGGCATTT	ACGAGATCTTGCCTTGTGG	335
Exon 25	TGGGCTAGTGACCTTCTCT	TACATCCCTGGACACACCCT	452
Exon 26	GAGAAAGCCAGGAGGTGGTC	AGGCTGGGACCTCTTTCAT	380
Exon 27	GGCTTTGGGCTCACTAGAGG	GAGAGGTGTGTGTGCGTGTA	562
Exon 28A	TGGCTCCTTGCCATATAGAGA	ATACGGAGTGGCTCAGACAG	777
Exon 28B	TGAGTGAGGACGACTTCGAT	GAACTCTGCCTGGTTGATCC	845

Tabla 13: Protocolo de PCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
Desnaturalización inicial	1	94 °C	2 minutos	
PCR	30	92 °C	15 segundos	Desnaturalización
		54-62 °C	15 segundos	Hibridación

		72 °C	30 segundos	Extensión
Extensión final	1	72 °C	5 minutos	

10. Análisis estadístico

Se utilizaron diversas pruebas estadísticas según los requisitos de los datos obtenidos en cada caso. De manera general, los datos experimentales se promediaron y fueron representados como la media \pm desvío estándar de la media (SD, del inglés, *standard deviation*). El número de muestras utilizado para cada experimento (N) se detalló en cada caso. Para realizar comparaciones de una única variable entre dos grupos se empleó el test t de Student a dos colas. Cuando se comparó el efecto de un tratamiento sobre muestras pareadas, se empleó el ANOVA de dos vías, seguido del test *post-hoc* de Bonferroni o Tukey para realizar comparaciones múltiples.

Para el capítulo 1, dado que el tratamiento con el vehículo (Control) o AVP es aplicado sobre la madre preñada, las crías no son unidades independientes. Las crías provenientes de la misma camada se consideran similares entre sí, tanto comportamental como fisiológicamente. Por ello, en los ensayos comportamentales fueron utilizados animales provenientes de distintas camadas, considerando entonces que el número de animales utilizado en cada caso (n) lo determina la cantidad de hembras inyectadas, que dieron origen a las crías analizadas. Se utilizó un sólo animal proveniente de cada camada, por lo que fueron realizados ANOVA, y se utilizó el test *post-hoc* de Tukey para detectar significancias entre los grupos.

En todos los casos, se asumió la significancia estadística cuando $p < 0,05$. Las diferencias estadísticamente significativas se indicaron con asteriscos, en la leyenda de cada figura o en el texto: para valores $p < 0,05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, *** y $p < 0.0001$, ****. Todas las pruebas estadísticas y los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 9.1.2.

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1: Generación de un modelo murino de autismo por exposición prenatal a ácido valproico.

RESULTADOS

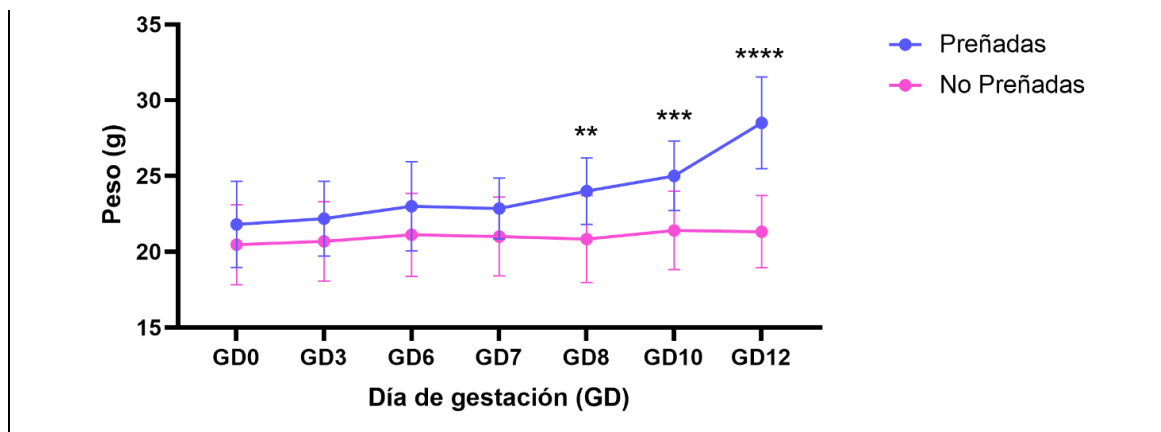
Este trabajo se centró en estudiar un modelo murino autismo, con alteraciones del neurodesarrollo causadas por la exposición prenatal al fármaco AVP. El objetivo aquí fue generar el modelo, para luego determinar su fenotipo mediante ensayos conductuales. Este modelo ha sido extensamente empleado, ya que, aunque no reproduce la totalidad de las particularidades observadas en los TEA, ha demostrado poseer muchas de las características estructurales y de comportamiento que se observan en este desorden.

o Control de peso para la determinación de preñez

El modelo de autismo generado por exposición prenatal a ácido valproico ha sido ampliamente utilizado para el estudio de dicho trastorno. Para su generación es fundamental establecer la fecha exacta de preñez de las hembras, para así administrar la inyección del fármaco o vehículo en el día gestacional (GD) 12,5.

Para determinar el GDO, se realizaron citologías a partir de exudados vaginales, a fin de aparear durante una noche exclusivamente aquellas hembras en estadio de estro, donde la probabilidad que tener un apareamiento efectivo es mayor (Ajayi & Akhigbe, 2020). Una vez separadas las parejas de ratones, se realizó el control de peso diario de las hembras hasta el GD12, previo a realizar la inyección, con el fin de discriminar si se encontraba preñada (Finlay et al., 2015; Heyne et al., 2015). Durante el control de peso se observó que la curva de peso aumentó en las hembras preñadas, siendo este entonces un método no invasivo efectivo para verificar la preñez de las hembras (**Figura 30**).

Figura 30: Control de peso de las hembras luego del apareamiento. El aumento de peso para las hembras preñadas comienza a ser significativo a partir del GD8. En el GD12 la diferencia de peso es significativamente mayor, confirmando con un alto porcentaje de certeza la preñez de las hembras previo a la inyección (prueba t de Student, **p=0.005371, ***p=0.000445, ****p<0.000001, n=20 no preñadas, n=16 preñadas).



En el GD12,5 se administró entonces una única inyección a las hembras preñadas, dividiéndolas al azar en grupo control (inyección de solución fisiológica) y grupo AVP (inyección de valproato de sodio 600 mg/kg). Luego del nacimiento, las crías macho se mantuvieron en la misma jaula con la madre, hasta el día del destete en P21.

o Ensayos de comportamiento

A fin de determinar si la generación del modelo para el estudio del autismo había sido exitosa, se realizaron ensayos conductuales para estudiar comportamientos relacionados con este trastorno. Los síntomas característicos del autismo son los déficits de comunicación e interacción social, y las conductas repetitivas o restringidas; también se ha demostrado que la mayoría de los individuos autistas presentan niveles de ansiedad elevados. Por ello todas esas conductas se usan como principales criterios de diagnóstico (American Psychiatric Association, 2013; Bellini, 2004).

Una de las características principales del modelo trabajado es la reducción en la interacción social en la adultez, fenómeno que puede ser evaluado mediante un test de interacción social como lo es el paradigma de las tres cámaras. Además, hay otras conductas que se asocian con los TEA, como la ansiedad y los comportamientos repetitivos y estereotipados.

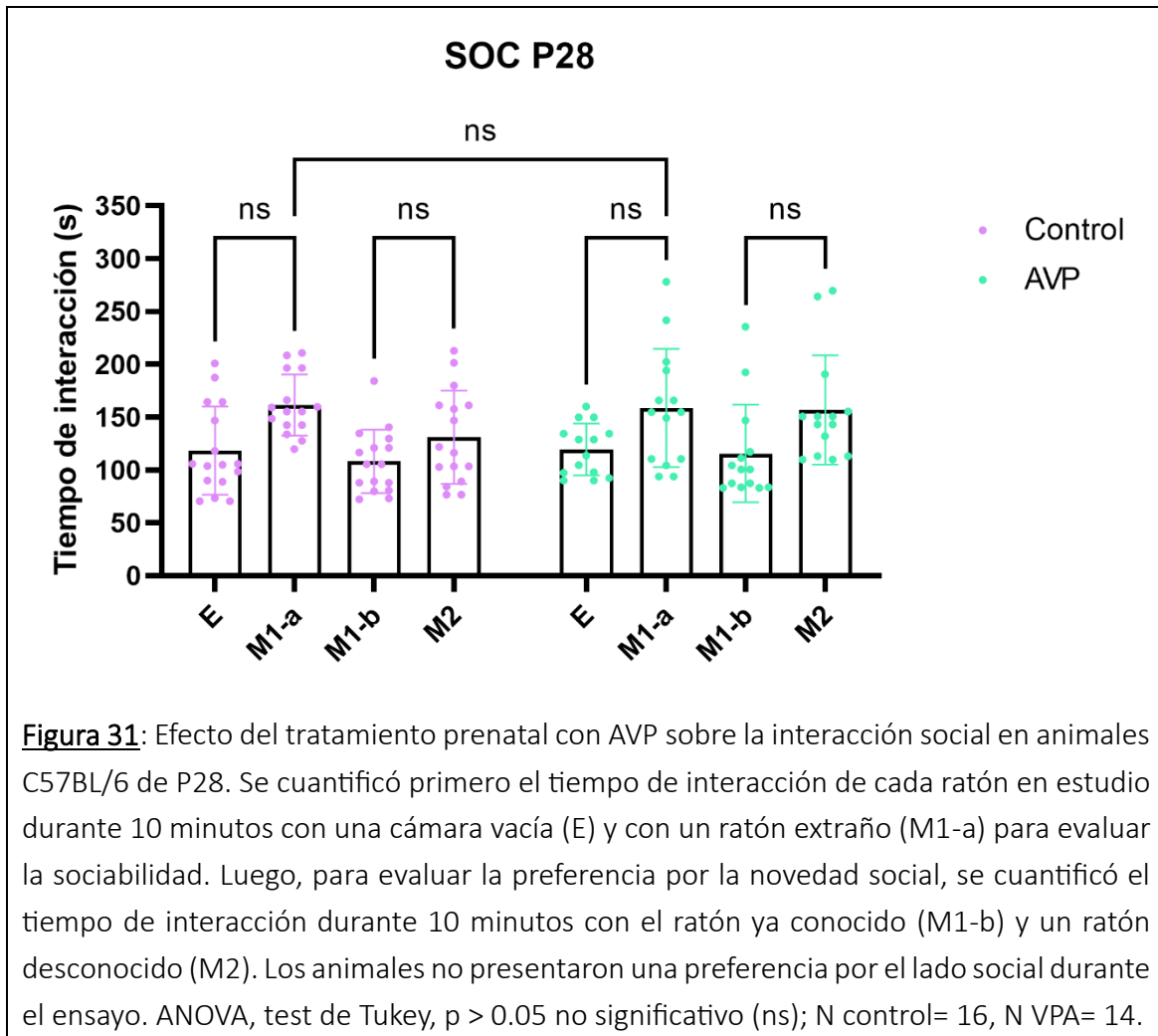
Para la realización de los ensayos conductuales fue necesario primero diseñar y fabricar los aparatos empleados para tal fin, además de acondicionar una sala para poder

realizarlos, que permitiera aislar los sonidos del exterior y poder controlar la intensidad lumínica. Se adquirió también el equipamiento necesario para grabar los videos durante la realización de los ensayos conductuales, y para el posterior análisis de los mismos a través de programas informáticos específicos para tal fin.

Se realizaron los ensayos de comportamiento en dos edades, a P28 y a P70, exclusivamente sobre animales macho. Esta elección se sustenta en que los ratones macho expuestos prenatalmente al VPA muestran anomalías conductuales, celulares y moleculares relacionadas con el TEA (Lucchina & Depino, 2014; Seiffe et al., 2022), mientras que las hembras no presentan los mismos déficits de sociabilidad que los machos, pero sí presentan anomalías celulares y moleculares (Kazlauskas et al., 2019). Los ensayos se realizaron sobre ambos grupos de ratones (AVP y control), mediante el proceso de doble ciego en donde el operador desconocía el tratamiento que haya recibido el animal.

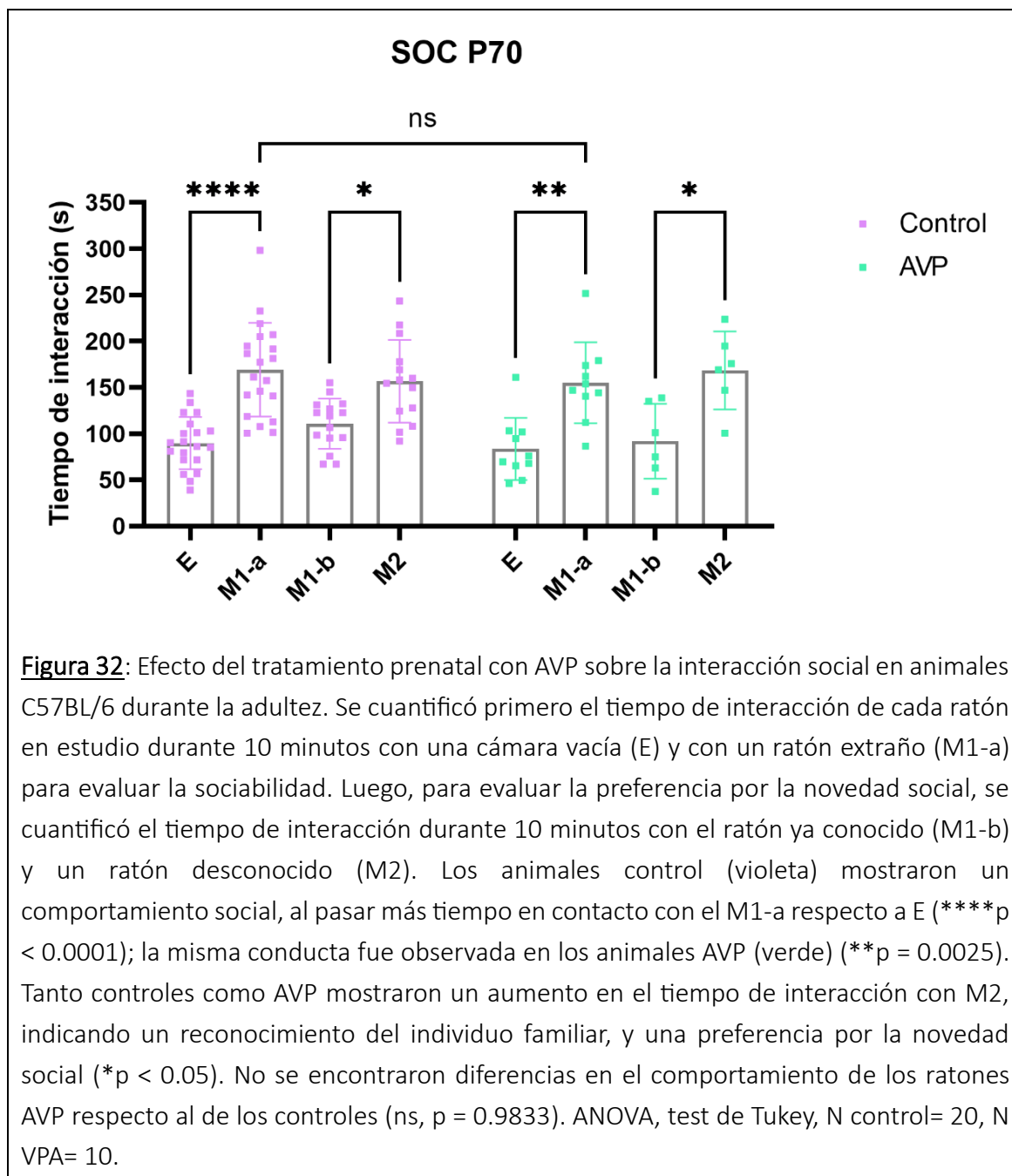
Durante el ensayo de interacción social se cuantificó el tiempo que el animal en estudio estuvo en contacto con un objeto conocido (E) y con un ratón estímulo (M1-a) para evaluar la sociabilidad. Asimismo, luego de incorporar un segundo ratón estímulo se cuantificó el tiempo de contacto con el ratón ya conocido (M1-b) y con la novedad (M2), para evaluar la preferencia por la novedad social. Las cámaras que contienen a M1-a y M2, representan en cada estadio del análisis el lado social del ensayo.

A P28, tanto los animales control como los AVP, no mostraron diferencias significativas en los tiempos de interacción con E y M1-a, ni con M1-b y M2 (**Figura 31**). Entonces, los animales de P28 no revelaron un comportamiento social, ya que no mostraron una preferencia por el lado social en el ensayo, siendo lo esperado, al menos para los controles, que exista una preferencia por interactuar con los ratones extraños.



Dado que dicho comportamiento podía estar asociado a la edad a la cual los ensayos fueron realizados, los mismos se repitieron en ratones adultos a P70. En este caso, los animales control presentaron un mayor tiempo de interacción con el ratón extraño M1-a respecto a E. Además, se determinó que el tiempo de interacción con M2 fue mayor comparado con su respectivo lado no novedoso (M1-b). En consecuencia, durante la adultez temprana en P70, los controles mostraron comportamiento social, tanto a nivel de sociabilidad como en preferencia por la novedad (**Figura 32**), ya que el tiempo de interacción con M1-a y M2 fue mayor comparado con su respectivo lado no social (E y M1-b). Para el grupo AVP se identificó un patrón de comportamiento similar al control para este ensayo. No se encontraron diferencias en el comportamiento de los ratones AVP respecto al de los controles (**Figura 32**), es decir que no se encontró un efecto del

tratamiento prenatal, poniendo en evidencia que la generación del modelo de autismo no estaba resultando según lo esperado.



Para evaluar la conducta de tipo ansiosa en los animales se realizó el ensayo de comportamiento de campo abierto (OF). A partir del mismo se cuantificó la distancia total recorrida (en metros) durante 10 minutos que duró el ensayo, parámetro que permitió evaluar la capacidad de exploración de los animales. También se cuantificó el tiempo que

cada ratón pasaba en el centro de la arena y el tiempo que pasaba en la periferia en intervalos (o *bins*) de 5 minutos, y a partir de estos se calculó la tigmotaxia en *bins* de 5 minutos en dos períodos: 0-5 min y 5-10 min, como un parámetro para analizar conducta de tipo ansiosa (Ver: [4.1. Ensayo de Campo Abierto \(Open field\)](#)).

Tanto a P28 como a P70 no se encontraron diferencias en la distancia recorrida entre los animales control y AVP (**Figura 33**). Los animales a P28 recorrieron una distancia promedio de 33 m durante el ensayo de OF ($33,67 \pm 6,384$ m para los controles, $32,76 \pm 5,037$ para los AVP), mientras que los animales a P70 recorrieron una mayor distancia, en promedio 46 m ($46,14 \pm 8,492$ m para los controles, $47,13 \pm 6,821$ para los AVP).

En cuanto a la tigmotaxia, los animales de P28 no presentaron diferencias entre los intervalos, ni diferencias entre los grupos control y AVP (**Figura 34A**). Los animales se mantuvieron en la periferia de la arena del OF durante la mayor parte del ensayo, sin atreverse a explorar el espacio, por lo cual no se presentaron diferencias significativas en las tigmotaxia.

En cambio, los animales control de P70, como era esperado, mostraron una clara predisposición a ubicarse en la periferia de la arena durante el primer intervalo de 5 min, pero luego mostraron una disminución de la tigmotaxia para el segundo intervalo respecto del primero, indicando que el animal comienza a despegarse de las paredes del aparato para hacer cruces por el centro (**Figura 34B**). Los animales AVP de P70 no mostraron ese comportamiento, sino que mantuvieron sus valores de tigmotaxia sin diferencias entre *bins* (**Figura 34B**). A su vez, los animales AVP partieron de valores de tigmotaxia inferiores a los controles (**Figura 34B**), lo que podría indicar que presentan un nivel de ansiedad menor, ya que prefieren menos los espacios oscuros y a resguardo.

Figura 33: Efecto del tratamiento prenatal con AVP sobre la distancia recorrida en el OF en animales C57BL/6 a P28 (A) y P70 (B). Para ambas edades no se encontraron diferencias significativas en la distancia recorrida por los animales control (violeta) y AVP (verde) (prueba t de Student, ns, $p = 0.6778$ para P28; y $p = 0.7326$ para P70). Los animales adultos exploraron más que los juveniles (**** $p < 0.0001$). n control= 20, n AVP= 12.

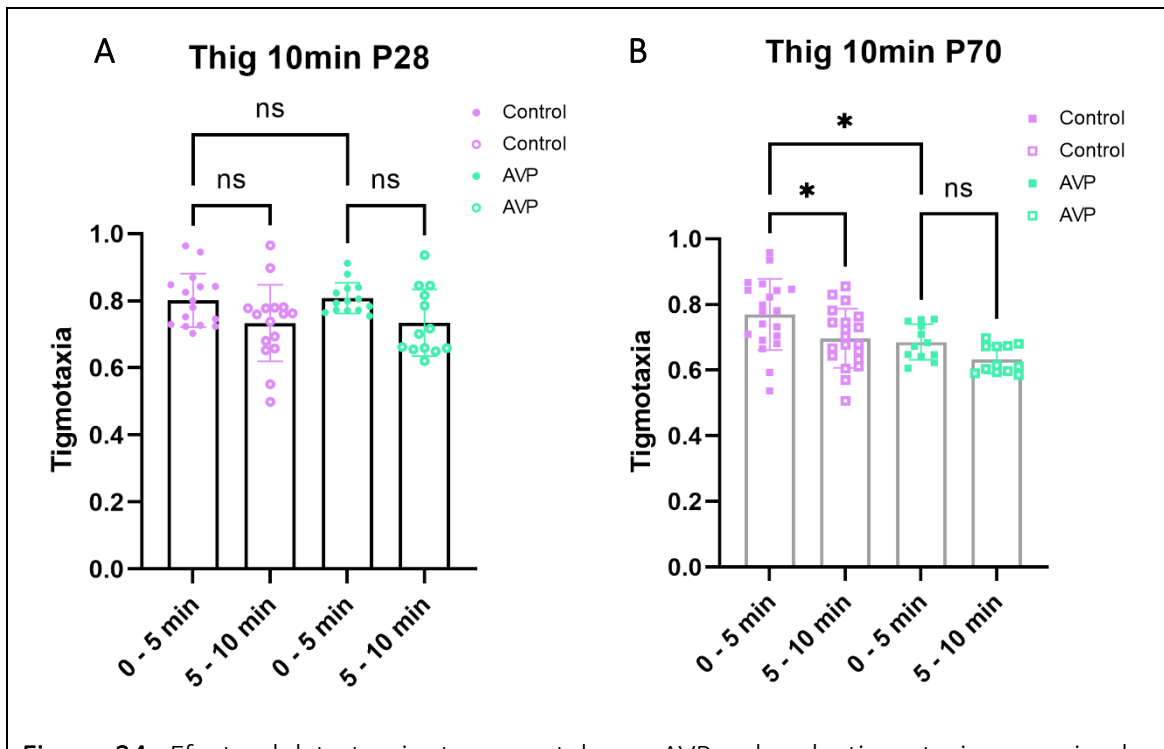
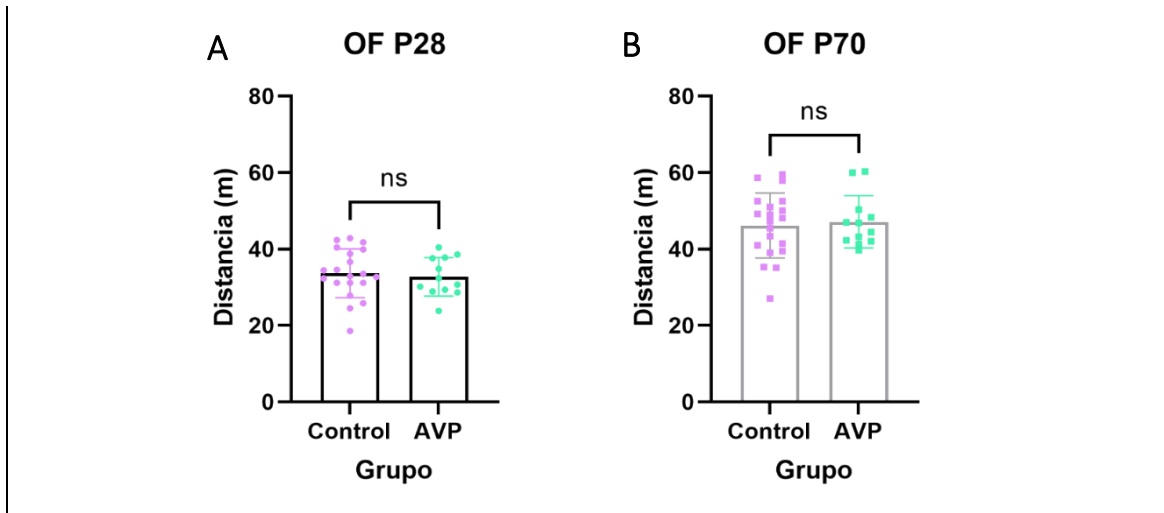
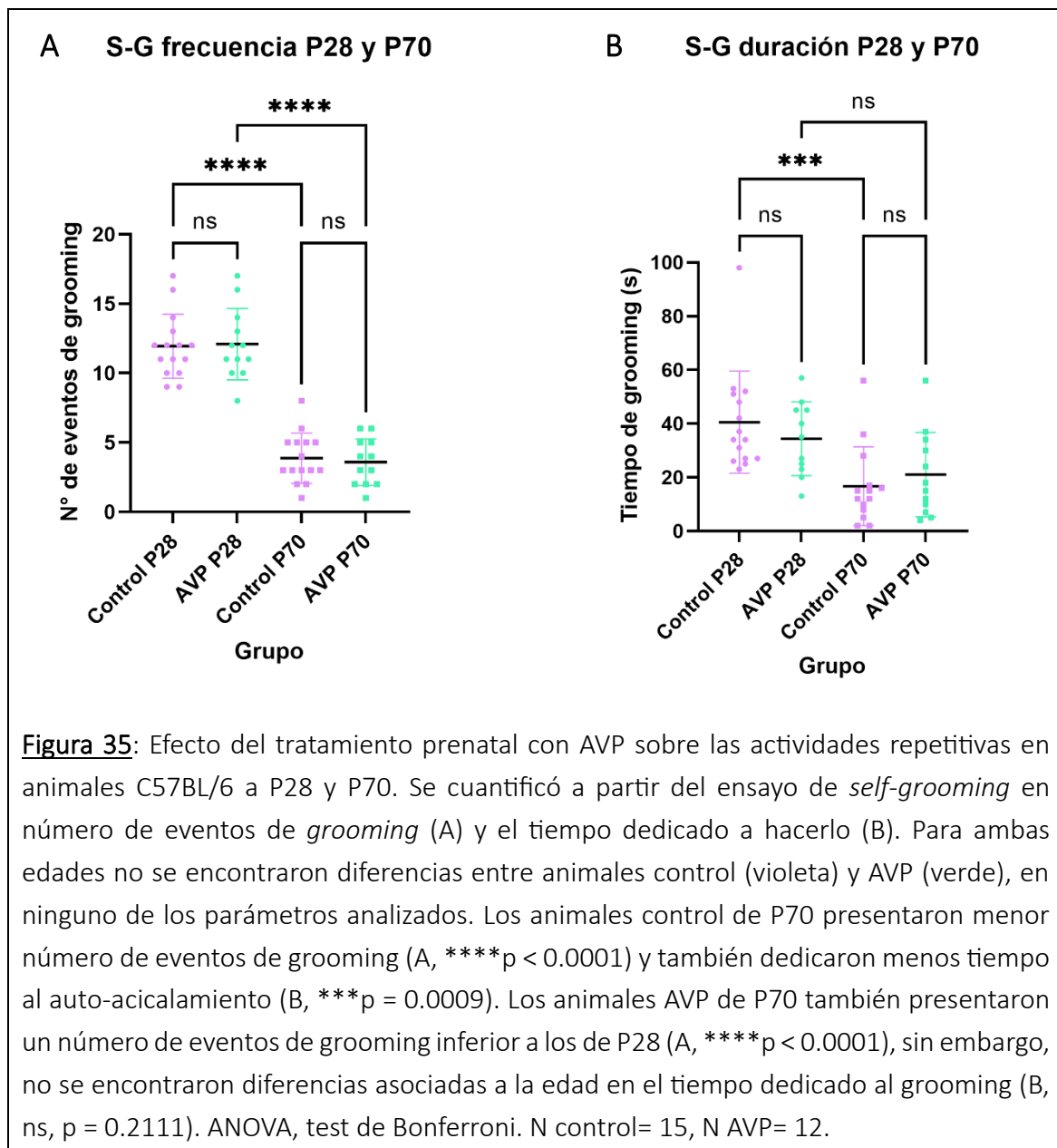


Figura 34: Efecto del tratamiento prenatal con AVP sobre la tigmotaxia en animales C57BL/6 a P28 (A) y P70 (B). Se cuantificó la tigmotaxia en *bins* de 5 minutos en dos períodos: 0-5 min y 5-10 min. A) En animales P28 no se encontraron variaciones en la tigmotaxia a lo largo del ensayo, ni tampoco efecto del tratamiento sobre este parámetro (ANOVA, ns, $p > 0.05$). B) En los animales control de P70 (cuadrado violeta) se encontró una disminución de la tigmotaxia en el tiempo (* $p = 0.0412$; $0,7696 \pm 0,1081$ para 0-5 min y $0,6970 \pm 0,0898$ para 5-10 min). En los animales AVP de P70 (cuadrado verde) no se encontraron diferencias en la tigmotaxia (ns, $p = 0.4264$). La tigmotaxia inicial de los animales AVP fue inferior a la de los controles (* $p = 0.0399$; $0,7696 \pm 0,1081$ para control, y $0,6854 \pm 0,0540$ para AVP). ANOVA, test de Tukey. N control= 20, N AVP= 12.

Mediante el ensayo de *self-grooming* se evaluó el comportamiento repetitivo y estereotipado de los animales (Ver: [4.4. Ensayo de auto-acicalamiento \(Self-Grooming\)](#)). Los animales de P28 presentaron un mayor número de eventos de *grooming* que los animales de P70. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas que puedan atribuirse al tratamiento, ya que no se presentaron diferencias entre animales control y AVP para ambas edades, P28 y P70, tanto en el número de eventos de *grooming* como en el tiempo dedicado por el animal al auto-aseo (Figura 35).



DISCUSIÓN

El propósito de los experimentos de este capítulo fue crear un modelo murino para el estudio del autismo, que sirva de base para analizar los genes y las vías de señalización alterados en los TEA. Para ello se seleccionó el modelo del AVP, que ha sido ampliamente utilizado y se encuentra validado para tal fin (Schneider & Przewłocki, 2005). Este modelo permite estudiar muchos de los procesos complejos que subyacen a los TEA, y avanzar así hacia la búsqueda de terapias que puedan mejorar la situación de personas autistas. A pesar de que el modelo del AVP no reproduce la totalidad de las características observadas en los TEA, ha demostrado poseer muchas de las características estructurales y de comportamiento que se observan en este desorden (Loth et al., 2016). Para la inducción del modelo se emplearon ratones hembras nulíparas de la cepa C57BL/6 de 10 semanas de edad, que una vez preñadas, fueron inyectadas con una monodosis de AVP (Chomiak et al., 2013; Loth et al., 2016; Nicolini & Fahnstock, 2018).

Una vez nacidas las crías, se seleccionaron exclusivamente los machos para continuar con el estudio. Esta elección implica un fuerte sesgo sexual, que se extiende habitualmente a numerosas disciplinas. La elección radica en las diferencias que se manifiestan en las respuestas conductuales asociadas al sexo. Los efectos hormonales son reconocidos como influencias importantes sobre la función neuronal, y también sobre el comportamiento animal. La mayor parte de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas, incluyendo a los TEA, ha sido realizada en animales macho, sustentado en que los ensayos realizados con hembras presentan mayor variabilidad, debido a que son evaluados animales que se encuentran en distintas fases de su ciclo estral (Berkley, 1992; Blanchard et al., 1995; Kelly et al., 1999). Particularmente, los ratones macho expuestos prenatalmente al VPA muestran anomalías conductuales, celulares y moleculares relacionadas con el TEA (Lucchina & Depino, 2014; Seiffe et al., 2022), mientras que las hembras no presentan los mismos déficits de sociabilidad que los machos, pero sí presentan anomalías celulares y moleculares (Kazlauskas et al., 2019). En el caso de los TEA, tanto en el modelo VPA como en otros, la elección de machos es comúnmente justificada debido a la mayor incidencia del desorden en niños que en niñas (K. C. Kim et al., 2013).

Dentro de los ensayos conductuales realizados, el de interacción social es el que más información aporta para diagnosticar el autismo en los ratones. Para el modelo AVP, lo esperado es que los ratones presenten un menor interés por el lado social, respecto a los controles que prefieren pasar más tiempo con el estímulo social (ratón extraño). Por lo tanto, se esperaba una reducción de la sociabilidad para el ratón AVP respecto al control. Sin embargo, los resultados obtenidos en el ensayo de interacción social en este capítulo de tesis no siguen la misma línea que los reportados en otros estudios en ratones macho adultos (P70) (K. C. Kim et al., 2013; Lucchina & Depino, 2014; Mabunga et al., 2015; Nicolini & Fahnestock, 2018; Schneider et al., 2008). Por el contrario, no se encontraron diferencias en el comportamiento de los ratones AVP respecto al de los controles, sino que ambos grupos mostraron una conducta social normal. En conclusión, no se encontró un efecto del tratamiento prenatal, poniendo en evidencia que la generación del modelo de autismo no estaba resultando según lo esperado.

El ensayo de interacción social también fue realizado en ratones macho jóvenes (P28); estos no revelaron un comportamiento social, ya que no mostraron una preferencia por interactuar con los ratones extraños, siendo lo esperado, al menos para los controles, que exista una preferencia por el lado social en el ensayo. Este resultado puede deberse a la juventud de los animales en estudio. Generalmente se eligen animales adultos jóvenes (a partir de P60) para realizar ensayos conductuales. Se considera que el envejecimiento está asociado con cambios progresivos en el cerebro y sus funciones sensoriales, motoras y cognitivas asociadas. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre los cambios de comportamiento desde la edad adulta joven hasta la mediana edad, y aún está por comprenderse el efecto de la edad en el comportamiento durante las primeras etapas de la vida (Hefner & Holmes, 2007; Shoji et al., 2016).

Por su parte, el ensayo de interacción social, además del estudio de la sociabilidad en ratones, permite evaluar la preferencia por la novedad social (J. N. Crawley, 2007). Lo esperado para este ensayo es que los ratones del grupo control pasen más tiempo con el extraño antes que con el ratón conocido, mientras que el AVP no debe presentar una preferencia por ninguno de ellos (Castro et al., 2017). Se esperaba entonces que el índice de preferencia social sea significativamente menor para el ratón AVP respecto al control

(Buffington et al., 2016). Nuevamente, no se encontró un efecto del tratamiento prenatal. Luego, tanto en ratones juveniles como en adultos, se realizó el ensayo de OF y *self-grooming*. Se esperaba para esta cepa identificar un aumento en el número de episodios de *grooming*, disminución en la exploración y aumento de la conducta ansiosa (Moldrich et al., 2013; Nicolini & Fahnstock, 2018). Sin embargo, en dichos ensayos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y AVP, dejando al descubierto que no se había logrado el objetivo propuesto. Por lo tanto, en función de los resultados obtenidos, se puede ver que la generación del modelo de autismo inducido por AVP no resultó, siendo que justamente este modelo se caracteriza por presentar un fenotipo autista que puede ser evaluado mediante ensayos conductuales.

A su vez, el mayor inconveniente que surgió durante la generación de este modelo fue el canibalismo por parte de las hembras, que se comían a sus crías inmediatamente después del parto, haciendo imposible obtener un número de animales adecuado para trabajar. Tras las numerosas repeticiones de episodios de canibalismo, se contactaron a diversos grupos de investigación que emplean el modelo de AVP para el estudio del autismo. Los mismos indicaron que se trata de un modelo altamente sensible a las condiciones ambientales del bioterio, particularmente a la luz, la temperatura, los olores y ruidos. Otra de las recomendaciones consistió en cambiar la cepa de ratones, dado que se ha reportado un mejor rendimiento en los apareamientos para las cepas exocriadas, obteniéndose un mayor número de crías y de mayor tamaño (Tuttle et al., 2018).

Debido a que no era factible realizar el experimento en otras instalaciones, ni a cambiar a una cepa exocriada, se recurrió a hacer modificaciones en el protocolo. Se modificó la vía de administración del AVP de subcutánea a intraperitoneal, sin embargo, las hembras preñadas llegaban a un estado de coma tras la inyección. Teniendo eso en cuenta, y que se había reportado una mejoría en la respuesta de los animales al AVP administrando el fármaco en dos dosis separadas (W. Zheng et al., 2019), se procedió con ese método. Todo ello fue en vano, porque no se logró superar el canibalismo, y por lo tanto no se alcanzó el número de animales necesario para realizar los ensayos posteriores.

CONCLUSIONES

Si bien en este capítulo no cumplió con el objetivo principal del mismo, ya que no se logró la generación del modelo de autismo por exposición prenatal al AVP, su ejecución tuvo el valor agregado de adquirir numerosas técnicas, así como equipamiento. Particularmente, se lograron adquirir las arenas para el desarrollo de los ensayos de comportamiento, así como la cámara para la grabación de los videos y los programas informáticos para su posterior análisis. Además, se acondicionó una sala para el desarrollo de los ensayos conductuales en ratones en el INIBIBB, que hasta ese momento no contaba con ese espacio.

Por otra parte, también permitió profundizar en el conocimiento sobre el manejo de animales de experimentación (manipulación, apareamientos, pesaje), la aplicación de inyecciones y la obtención de muestras biológicas. Tras la asistencia a un curso de postgrado específico dictado en la UBA (Análisis conductual de modelos animales de desórdenes psiquiátricos), se profundizó en el conocimiento para la ejecución y análisis de ensayos conductuales.

Cabe destacar que, este proyecto se inició en el 2018, y los primeros resultados fueron obtenidos sobre finales de ese año. A pesar de haber presentado dificultades, existían opciones para intentar superarlas, sin embargo, la pandemia del Covid-19 iniciada en marzo del 2020, truncó la posibilidad de continuar con el mismo, y a su vez, retomarlo luego de la vuelta a la presencialidad fue imposible, por los tiempos que requería obtener nuevamente animales.

CAPÍTULO 2: **Elaboración y administración de una dieta que promueva la cetogénesis en ratones como modelo de reversión de trastornos del neurodesarrollo.**

RESULTADOS

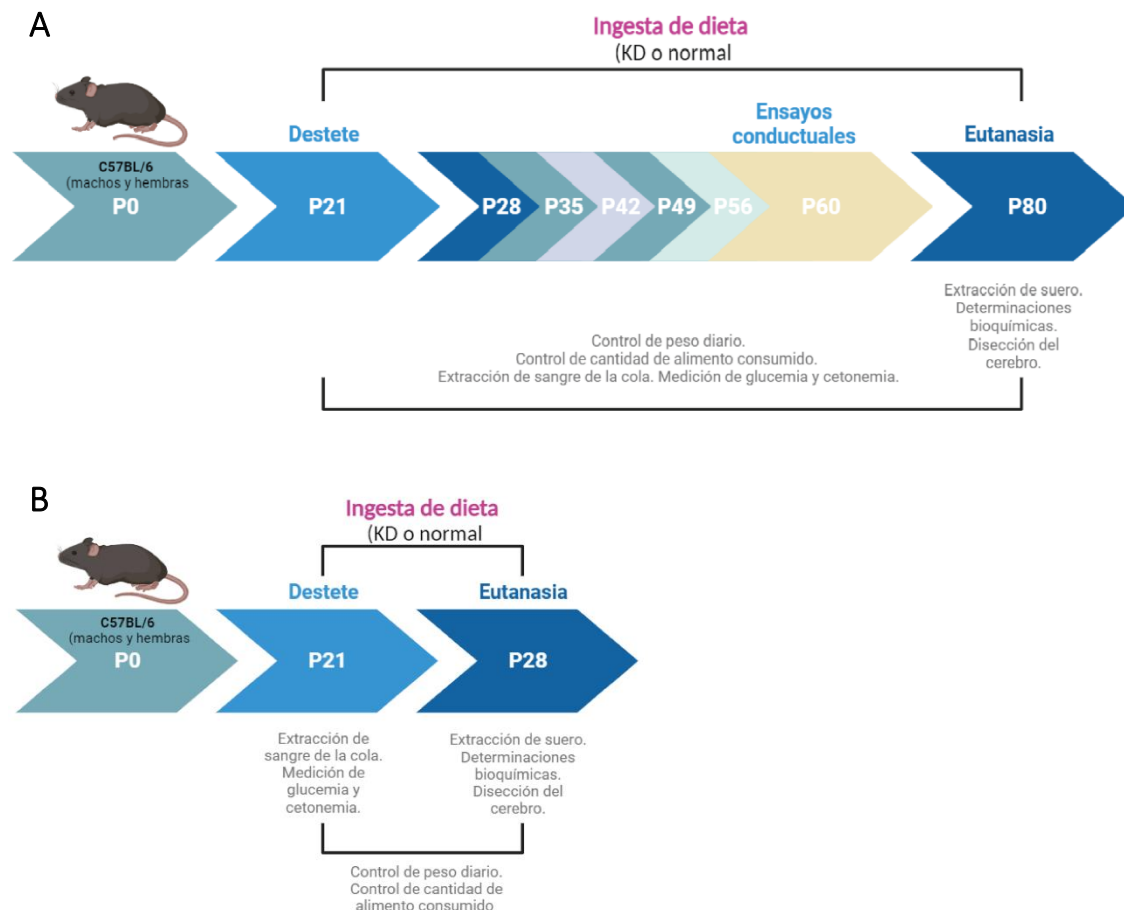
Este trabajo se centró en estudiar un modelo murino con alteraciones del neurodesarrollo, como son los TEA, y en paralelo se diseñó una estrategia de reversión basada en la nutrición de los animales. Para tal fin se eligió la dieta cetogénica (KD), dado que existen numerosos reportes acerca de sus beneficios para el tratamiento de los TEA, así como también de epilepsias refractarias (Barañano & Hartman, 2008; Castro et al., 2015; Napoli et al., 2014).

o Elaboración y caracterización de la dieta cetogénica en ratones C57BL/6

Se elaboró en el laboratorio una dieta con 70% de grasa, 25% de proteínas y <1% de carbohidratos, con el objetivo de promover la cetogénesis en ratones de la cepa C57BL/6. Esta dieta cetogénica (KD) fue administrada a ratones machos (M) y hembras (F) a partir del destete en P21, manteniendo en paralelo un grupo control que recibía la dieta normal. Esta edad fue elegida ya que es el primer momento en el cual puede hacerse una intervención dietaria, y que a su vez influye en el neurodesarrollo.

Para la caracterización de la KD, se analizó el efecto de la KD sobre el crecimiento de los animales, sobre de la cantidad de alimento ingerido y, además, se cuantificaron glucosa y cuerpos cetónicos en sangre extraída por punción de la vena lateral de la cola. Por último, el día final del estudio, se obtuvo una muestra de suero sanguíneo para analizar el perfil lipídico de los animales. Inicialmente, se programó administrar la KD desde P21 hasta la adultez en P80 (**Figura 36A**), sin embargo, debido a los resultados encontrados, se sumó un grupo de animales que recibió la dieta sólo por 7 días, desde P21 a P28 (**Figura 36B**).

Figura 36: Protocolos experimentales para la administración de dieta normal o KD. A) Administración de las dietas hasta P80, es decir, 59 días de tratamiento. B) Administración de las dietas hasta P28, es decir, una semana de tratamiento.

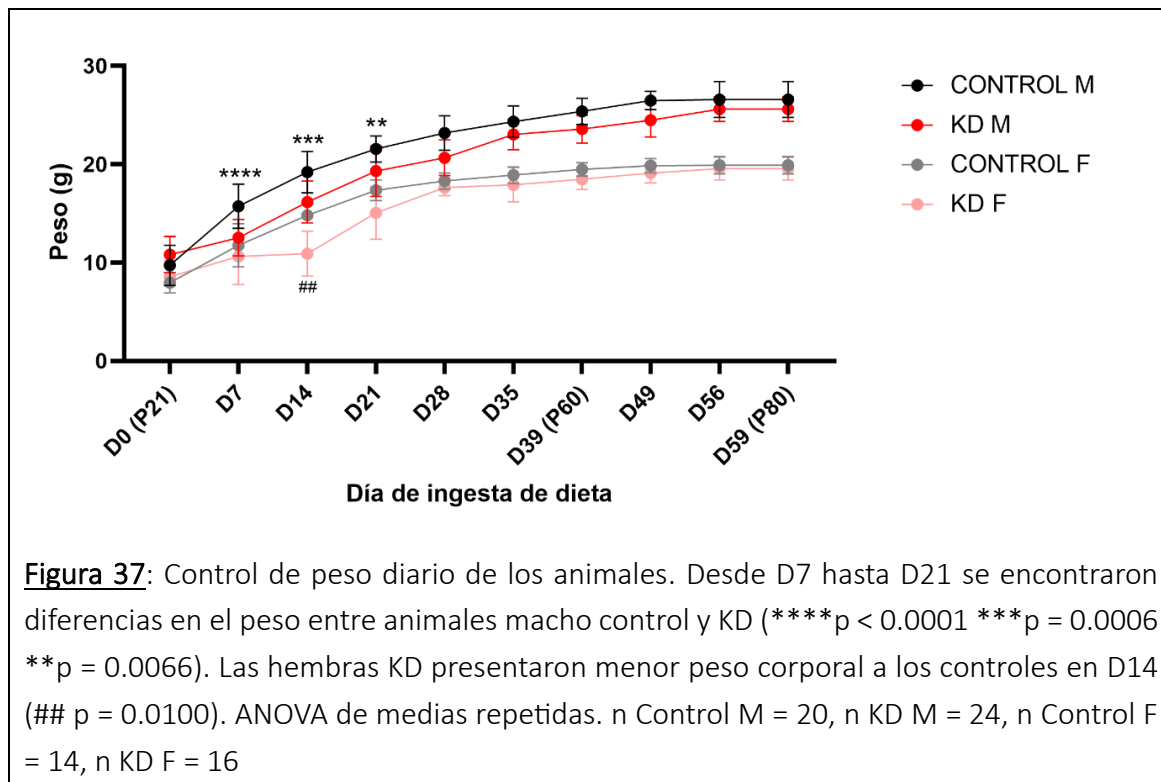


– *Control de peso y de ingesta de alimento*

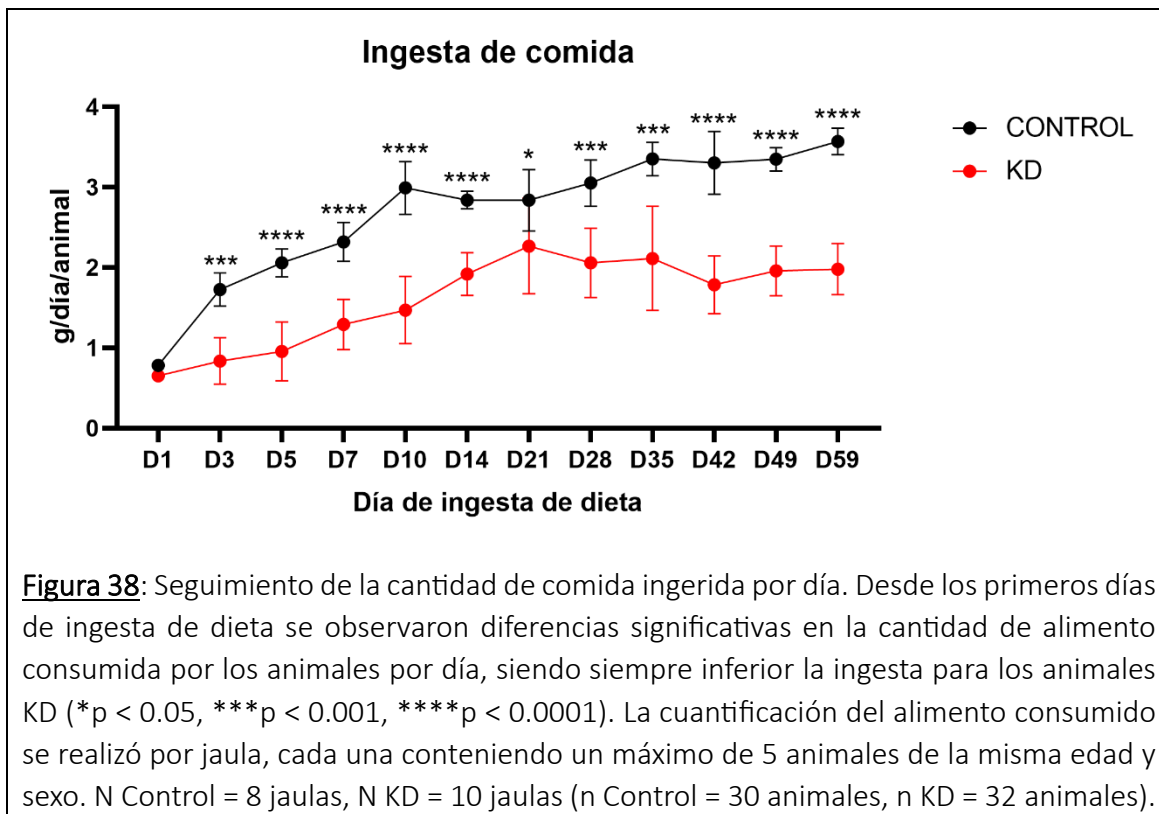
Mediante el control de peso diario de los animales, se analizó el efecto de la KD sobre su crecimiento. Se pesaron los animales desde el inicio de la ingesta de la KD hasta finalizar el ensayo, es decir, desde P21 a P80.

A partir de los valores del peso corporal de los animales, se observaron diferencias en el peso entre machos y hembras, siendo el peso de los primeros siempre un 25% superior. En todos los casos se observó un aumento progresivo del peso con la edad, tanto bajo dieta normal como KD. En el caso de los machos (M), se observaron diferencias significativas en el peso del grupo control respecto al KD desde el D7 hasta D21, momento a partir del cual los KD comenzaron a acercarse al peso de los controles, manteniéndose

de todas maneras el peso promedio de los mismos por debajo del de los controles (**Figura 37**). En las hembras las diferencias de peso sólo se observaron en el D14, dónde las KD se encontraron por debajo del control (**Figura 37**).



En cuanto a la ingesta de alimento, los animales control consumieron mayor cantidad de alimento por día, alcanzando valores de $3,570 \pm 0,165$ g en P80, mientras que los KD ingirieron $1,980 \pm 0,319$ g a la misma edad (**Figura 38**). Cabe destacar que, cada 100g de alimento KD el aporte energético es de 720 kcal, mientras que el de la dieta normal es de 250 kcal. De esta forma, a pesar de consumir aproximadamente la mitad de la cantidad de comida que los controles, las calorías ingeridas por los animales KD no son menores, sino incluso superiores (aproximadamente 900 kcal los controles a P80, y 1440 kcal los KD de la misma edad).



– *Glucemia y cetonemia*

Por punción de la vena lateral de la cola se obtuvieron muestras de sangre para la cuantificación de cuerpos cetónicos y glucosa a lo largo del experimento. La cetonemia de los controles se mantuvo estable a lo largo de las 6 semanas de tratamiento ($0,6450 \pm 0,1669$ mmol/L) (**Figura 39**), mientras que en los animales KD, luego de una semana de ingesta de dieta (D7, P28) se encontró el pico máximo de cuerpos cetónicos en sangre ($2,383 \pm 0,700$ mmol/L). A partir de ese punto la cetonemia en los KD comenzó a descender, aunque siempre manteniéndose por encima de la de los controles (**Figura 39**). Asimismo, en el D7 también se encontraron los niveles más bajos de glucosa en sangre en los animales KD ($89,818 \pm 24,742$ mg/dL). Para los controles, la glucemia se mantuvo estable a lo largo de todo el experimento ($176,594 \pm 26,440$ mg/dL) (**Figura 40**).

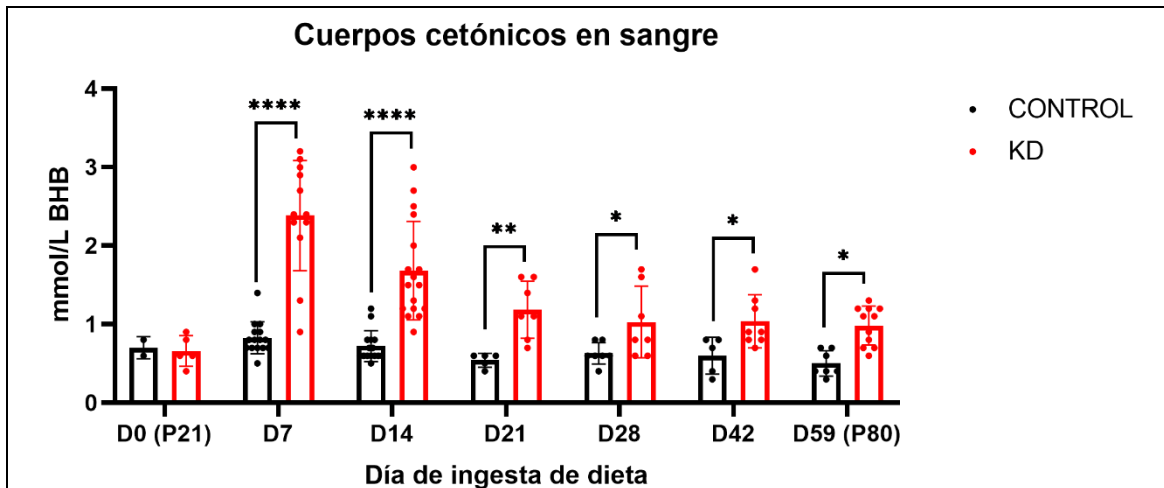


Figura 39: Cuerpos cetónicos en sangre. Luego de una semana de ingesta de dieta (D7) se encontró el pico máximo de cuerpos cetónicos en sangre para los animales KD ($2,383 \pm 0,700$ mmol/L), mientras que los animales control mostraron valores significativamente inferiores ($0,827 \pm 0,205$ mmol/L; **** $p < 0.00001$). A partir del D7 la cetonemia en los KD comenzó a descender, aunque siempre manteniéndose por encima de la de los controles (**** $p < 0.00001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). n Control = 15, n KD = 12.

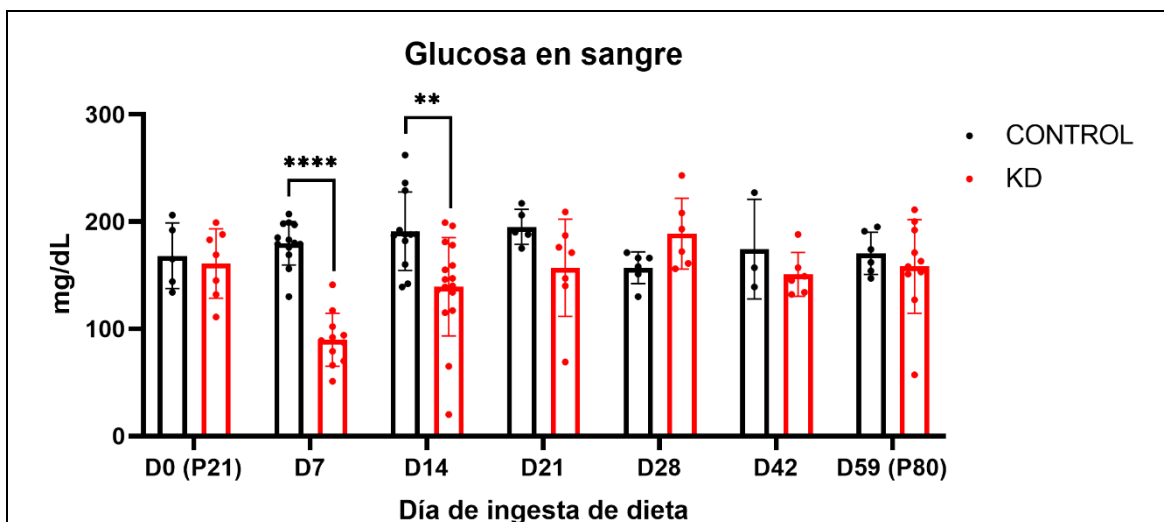
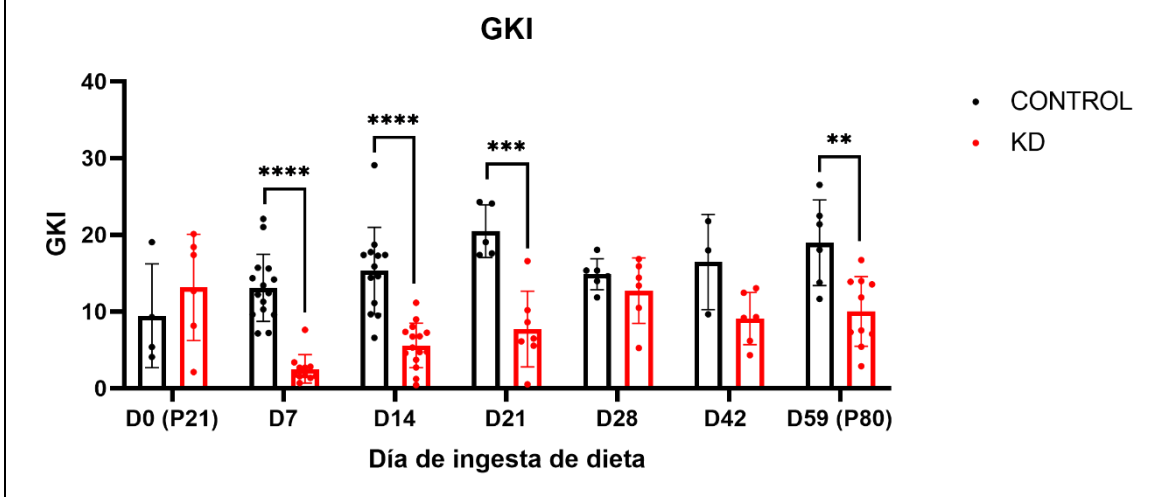


Figura 40: Glucosa en sangre. En el D7 se encontró el nivel de glucemia más bajo en los animales KD, mientras que el de los animales control fue significativamente superior ($179,846 \pm 20,314$ mg/dL para control, $89,818 \pm 24,742$ mg/dL para KD; **** $p < 0.00001$). Aún en el D14 la glucemia de los KD se mantuvo baja respecto a los controles (** $p = 0.0034$), pero luego este parámetro se mantuvo en valores similares para ambos grupos a lo largo del tratamiento. n Control = 12, n KD = 10.

A partir de los valores de glucosa y cuerpos cetónicos en sangre se calculó el índice glucosa-cetonas (GKI). Este índice se utiliza en humanos y animales con tumores cerebrales para evaluar el estado metabólico (Meidenbauer et al., 2015). En este caso, se utilizó para estimar el estado de cetosis en el que se encontraban los animales. Para los controles, a lo largo del todo el experimento, el GKI siempre estuvo por encima de 9 (GKI>9), por lo tanto, se puede inferir que estos animales nunca estuvieron en cetosis. En cambio, los animales KD entraron en un estado de cetosis profunda (GKI 1-3) en el D7 de ingesta de dieta. Luego, en D14 se encontraron en cetosis moderada (GKI 3-6), y en D21 en cetosis leve (GKI 6-9), para luego salir del estado de cetosis a partir de P28 (GKI>9) (Figura 41).

Figura 41: índice GKI como estimación del estado de cetosis de los animales. Prueba t de Student (****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05).



– *Determinaciones bioquímicas en suero obtenido al finalizar el tratamiento*

Al finalizar el experimento, en los días P28 y P80, dependiendo del grupo en cuestión, se realizó la eutanasia, y se recolectó una muestra de sangre. A partir de ella se separó el suero, que se empleó para realizar determinaciones bioquímicas. Particularmente, se cuantificó colesterol y triglicéridos (TG) en suero para analizar el perfil lipídico de los animales tras la ingesta de las diferentes dietas, y también se evaluó la función hepática mediante el análisis de la enzima aspartato aminotransferasa (GOT/AST). Se utilizaron

como valores de referencia para colesterol y TG aquellos reportados para animales de la cepa C57BL/6 por JaX (The Jackson Laboratory, 2022) (Tabla 14).

Tabla 14: Valores de referencia para animales de la cepa C57BL/6.

Colesterol (g/L)		Triglicéridos (g/L)	
Machos	Hembras	Machos	Hembras
0,91 ± 0,11	0,79 ± 0,19	1,04 ± 0,31	1,04 ± 0,33

De acuerdo a los valores de colesterol y TG reportados, dichos parámetros para el grupo control se encontraron dentro del rango de referencia, para ambas edades y sexo (**Figuras 42 y 43**). Los animales KD, en cambio, presentaron valores de colesterol y TG por encima de los controles, y siempre mayores a los de referencia (**Figuras 42 y 43**). A simple vista, el suero de los animales control tenía un aspecto normal, translúcido de color amarillo pálido, mientras que el de los animales KD se veía hiperlipémico, de color amarillento (**Figura 44**).

Estas muestras de sangre fueron extraídas sin realizar ayuno previo, para así prevenir cualquier estrés que pudieran sufrir los animales al momento de la eutanasia, lo cual podría alterar los estudios posteriores, particularmente el análisis de la expresión de genes vinculados al control del estrés oxidativo. Para determinar si el incremento en los valores de colesterol y TG en los KD podría estar asociado a dicha ausencia de ayuno, se incluyó un grupo de estudio al cual se lo sometió a deprivación de alimento 3 horas previas a la toma de muestra de sangre. Se seleccionaron para ello hembras de P28, que había presentado diferencias estadísticamente significativas entre control y KD tanto en colesterol como en TG sin el ayuno previo a la toma de muestra. Para ambos parámetros se encontró que los valores permanecían elevados y por encima del rango de referencia (**Figuras 42 y 43**).

Figura 42: Colesterol en suero sanguíneo. Los animales control de P28 y P80, tanto machos (M) como hembras (F), presentaron valores de colesterol dentro del rango normal para la cepa C57BL/6 (aproximadamente 0,90 g/L en M y 0,80 g/L en F). En las F control de P28 que fueron sometidas a un ayuno previo a la toma de la muestra, el valor de colesterol sanguíneo se redujo respecto a las F sin ayuno, pero se mantuvo dentro del rango de referencia ($0,65 \pm 0,02$ g/L). Los animales KD presentaron valores de colesterol elevados respecto a los controles (aproximadamente 1,30 g/L en M y 1,10 g/L en F). Las F28 del grupo KD que fueron sometidas a ayuno mostraron igualmente niveles de colesterol elevados ($1,23 \pm 0,07$ g/L). Los datos representan la media \pm SD. Prueba t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Control: $n = 5$ y KD: $n = 5$ (para cada edad y sexo). n con ayuno = 3.

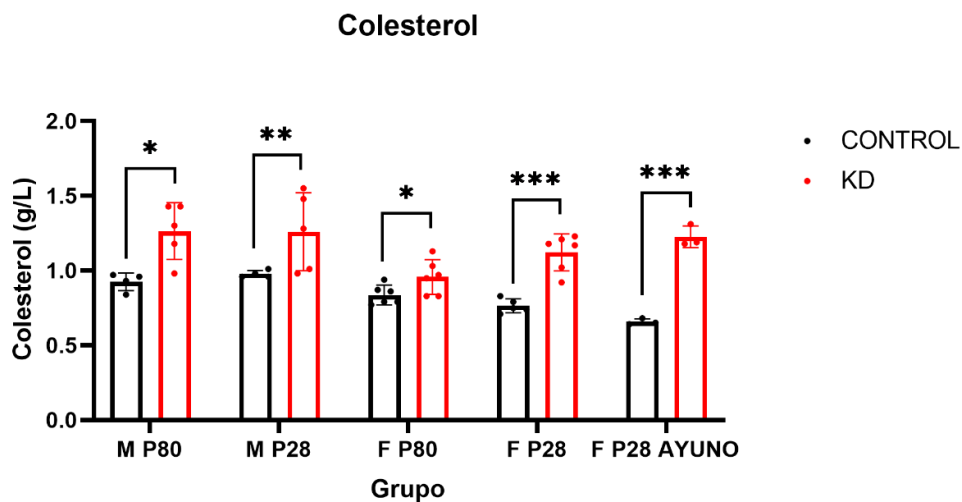


Figura 43: Triglicéridos en suero sanguíneo. Los animales control de P28 y P80, tanto machos (M) como hembras (F), presentaron valores de TG dentro del rango normal para la cepa C57BL/6 (aproximadamente 1,20 g/L en M y 1,35 g/L en F). En las F control de P28 que fueron sometidas a un ayuno previo a la toma de la muestra, el valor de TG sanguíneos se redujo respecto a las F sin ayuno, pero se mantuvo dentro del rango de referencia ($1,01 \pm 0,29$ g/L). Los animales KD presentaron valores de TG elevados respecto a los controles, por encima de 2,50 g/L, siendo este incluso mayor al límite superior del rango de referencia. Las F28 del grupo KD que fueron sometidas a ayuno mostraron igualmente niveles de TG elevados ($2,35 \pm 0,39$ g/L). Los datos representan la media \pm SD. Prueba t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Control: $n = 5$ y KD: $n = 5$ (para cada edad y sexo). n con ayuno = 3.

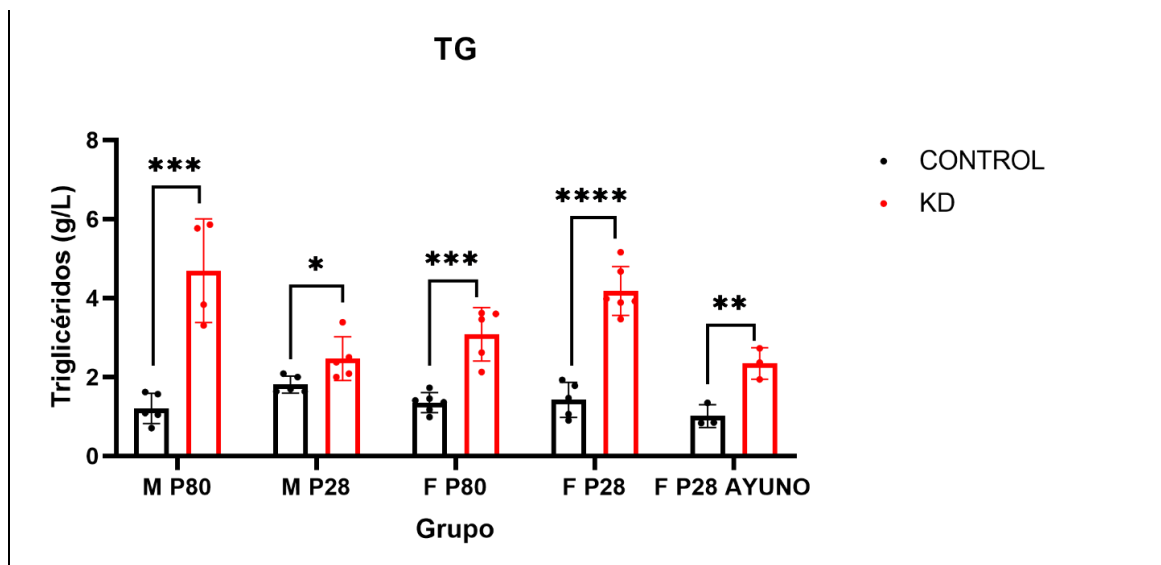
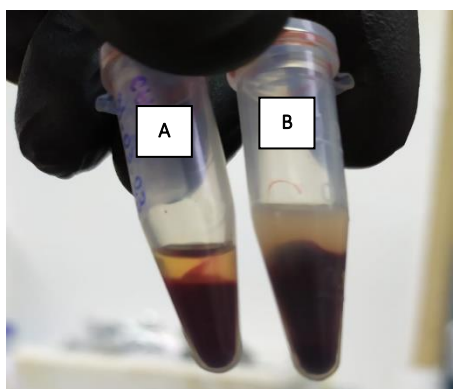
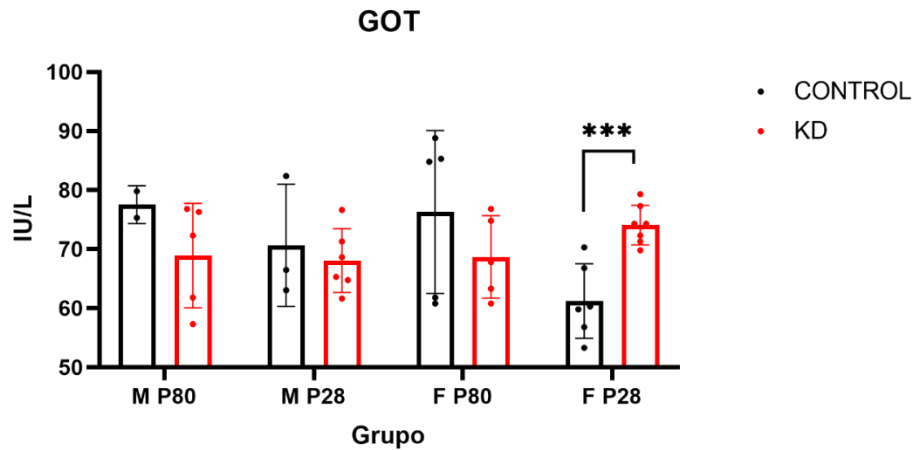


Figura 44: Foto del suero sanguíneo de un animal control (A) y uno KD (B).



En cuanto a los valores de GOT, los mismos presentaron gran variabilidad, que podría deberse a que el análisis no fue realizado sobre muestras frescas sino sobre suero congelado. De igual manera, los valores de GOT suelen ser variables, al igual que el de otras enzimas hepáticas. No se encontraron diferencias significativas en los valores de GOT entre control y KD, excepto en el grupo de F de P28, donde se encontraron elevados para los animales KD ($p = 0.00064$; $61,21 \pm 6,30$ IU/L para las F control, $74,09 \pm 3,34$ IU/L para las KD; $n = 6$ para cada grupo). Este incremento de GOT podría vincularse al estado de cetosis alcanzado por los animales KD a P28, justamente por el incremento del metabolismo de los lípidos y la cetogénesis (**Figura 45**).

Figura 45: Cuantificación de la enzima aspartato aminotransferasa (GOT) en suero sanguíneo. No se encontraron diferencias significativas en los valores de GOT entre control y KD, excepto en el grupo de hembras de P28, donde se encontraron elevados para los animales KD (** $p = 0.00064$). Prueba t de Student, n Control = 5 y n KD = 5 (para cada edad y sexo).



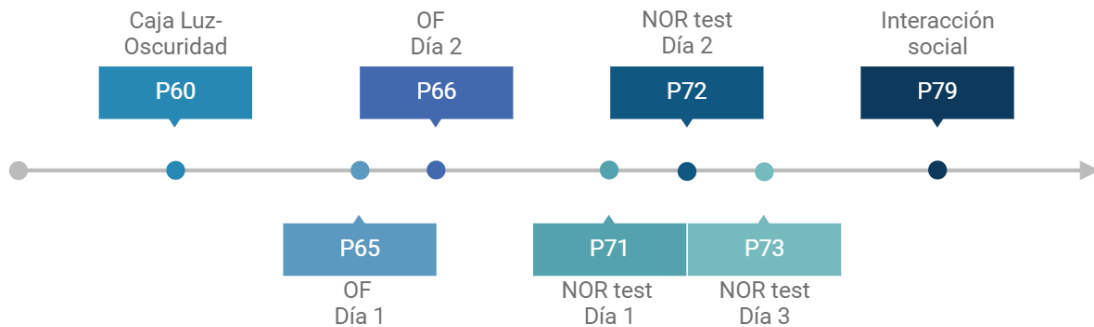
o Alteraciones de la conducta tras la administración de la KD

En roedores, el desarrollo neuronal comienza en el período embrionario con la neurogénesis, seguida luego por la migración y diferenciación neuronal en el período fetal tardío, que continúan hasta las primeras semanas de vida (aproximadamente hasta P21). La sinaptogénesis, que permite la formación de redes neuronales, comienza en etapas tempranas después del nacimiento y se extiende durante las primeras semanas; a partir de P35 comienza la poda sináptica, donde se eliminan selectivamente sinapsis menos útiles y se consolidan las conexiones sinápticas importantes para la función neuronal, alcanzándose los niveles de densidad sináptica adultos en P60. La mielinización de axones en ratones comienza durante las primeras semanas después del nacimiento y se extiende durante los primeros meses de vida; se alcanza la mayor velocidad de mielinización en P21. A partir de P35 comienza a aumentar el volumen de sustancia blanca dentro del sistema nervioso, y a P60 comienza a disminuir el de materia gris (Semple et al., 2013).

Para evaluar el impacto de la dieta cetogénica sobre el neurodesarrollo postnatal, se realizaron ensayos conductuales para estudiar el comportamiento de los animales, y se compararon las respuestas de los ratones KD respecto a los controles. Particularmente,

se eligieron distintos ensayos con el objetivo de estudiar comportamiento social, conductas de tipo ansiosas y memoria de reconocimiento (**Figura 46**). En todos los casos se analizaron M y F simultáneamente.

Figura 46: Batería de ensayos conductuales. Los mismos fueron realizados en animales adultos jóvenes (a partir de P60) M y H bajo dieta normal y cetogénica.



– *Caja de Luz-Oscuridad*

Este ensayo se basa en el comportamiento exploratorio espontáneo de los roedores y en su aversión innata a la luz. Se utiliza para detectar conductas de tipo ansiosas, dado que niveles de ansiedad más elevados se asocian a un menor tiempo en la cámara iluminada (L). Para este ensayo no se encontraron diferencias entre los grupos en ninguno de los parámetros analizados, que fueron el tiempo que pasó el ratón en la cámara con luz, el número total de entradas a dicho compartimento, y duración promedio de cada visita a la cámara iluminada (**Figura 47**).

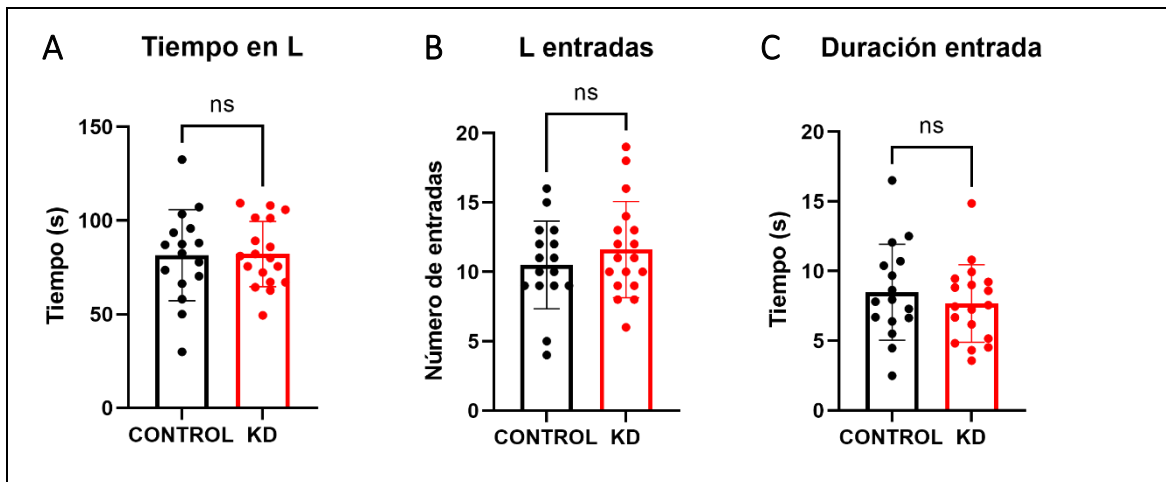


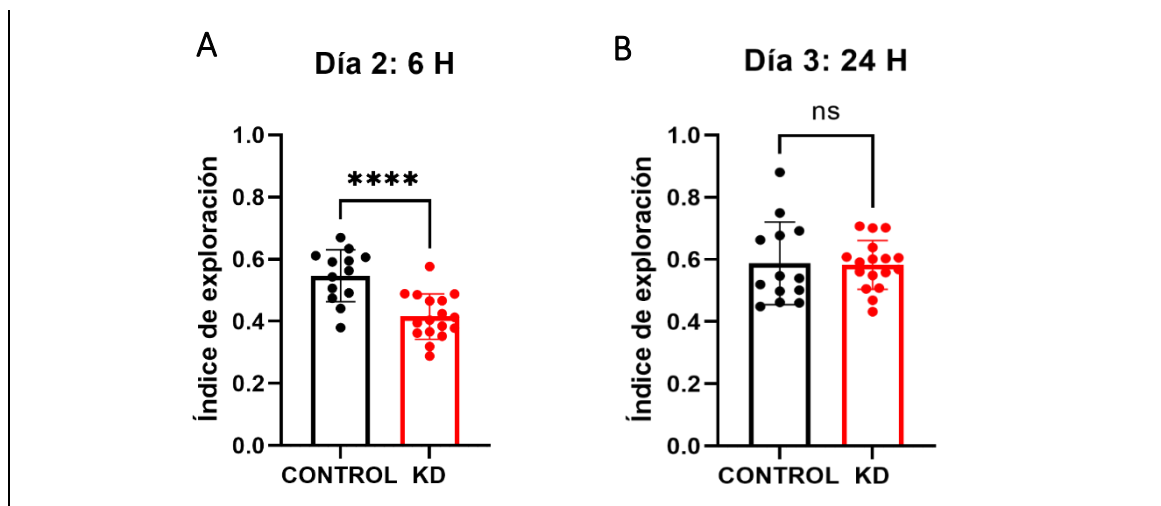
Figura 47: Test de la caja de Luz-Oscuridad. **A)** No se encontraron diferencias significativas en el tiempo que pasaron los ratones control y KD en la cámara con luz ($p = 0.9289$; $81,48 \pm 24,28$ s para Control; $82,13 \pm 17,46$ s para KD). **B)** Los animales control y KD no mostraron diferencias en el número de entradas a la cámara iluminada ($p = 0.3384$; $10,500 \pm 3,162$ entradas para Control; $11,610 \pm 3,466$ entradas para KD). **C)** Los animales no presentaron diferencias significativas en la duración de las entradas a la cámara con luz ($p = 0.4571$; $8,481 \pm 3,438$ s para Control, $7,677 \pm 2,787$ s para KD. n control = 16; n KD = 18.

– *NOR test*

El ensayo de reconocimiento de objeto novedoso se incluyó para evaluar la memoria de reconocimiento. Se cuantificó el tiempo durante el cual el ratón en estudio interactúa con distintos objetos, familiares y novedosos, y a partir de esos datos se calculó un índice de exploración, que relaciona el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso, respecto al tiempo total invertido en interactuar con ambos objetos (Ver: [4.2. Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso \(NOR test\)](#)).

Se encontró que, 6 horas después del entrenamiento en el que se le presentaron al animal dos objetos idénticos, al cambiar uno de esos objetos por uno novedoso, los animales KD presentaron un menor índice de exploración que los controles (**Figura 48A**). Este dato indicaría que los KD no recuerdan los objetos que se le presentaron durante el entrenamiento, y por lo tanto no reconocen la novedad. Mientras que, los controles reconocen el objeto familiar e invierten más tiempo en el reconocimiento del novedoso (**Figura 48A**). Sin embargo, a largo plazo (24 horas después del entrenamiento) no se ven diferencias entre los grupos (**Figura 48B**). Los KD necesitaron más tiempo para procesar que uno de los objetos ya se lo habían presentado previamente, incluso necesitaron de la presentación previa del mismo (entrenamiento y a las 6 horas posteriores), para recién en el tercer encuentro identificarlo como familiar.

Figura 48: Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso. **A)** En el corto plazo, los animales KD presentaron un menor índice de exploración que los controles ($0,5465 \pm 0,0836$ para control, $0,4150 \pm 0,0726$ para KD; **** $p < 0.0001$). **B)** En el tercer encuentro con el mismo objeto, ambos grupos lo reconocen como familiar y aumenta la explotación del novedoso. ANOVA de una vía, test de Tukey, n Control = 13, n KD = 17.



– *Ensayo de campo abierto (OF)*

Para evaluar el impacto de la dieta cetogénica se realizaron dos OF de 10 minutos en días sucesivos. Allí se analizaron la distancia total recorrida como un parámetro de exploración, y la tigmotaxia, para analizar un comportamiento de tipo ansioso.

En 10 minutos de OF, se cuantificó la tigmotaxia en intervalos de 5 minutos. En los controles, se observó un comportamiento típico, en el cual a medida que reconocen el espacio y les genera mayor confianza, se animan a explorarlo y pasan por el centro del mismo, en lugar de mantenerse sólo en la periferia (**Figura 49A, B**). En cambio, los animales KD no mostraron diferencias en la tigmotaxia a lo largo del ensayo, es decir que a pesar del paso del tiempo no se animaron a cruzar al centro del aparato y se mantuvieron continuamente cerca de las paredes del mismo (**Figura 49C, D**). Comparando la tigmotaxia en el intervalo 0-5 min, tanto controles como KD presentaron valores similares, y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.4074$). En cambio, al comparar la tigmotaxia para el intervalo 5-10 min, los animales KD mostraron valores más elevados que los controles ($p = 0.0319$). Estos resultados indicarían que los animales bajo dieta cetogénica presentan una conducta de tipo ansiosa.

Por otro lado, comparando la distancia total recorrida entre el día 1 y el día 2, se evaluó la capacidad de habituación del animal, dado que si el mismo reconoce el espacio en el que se encuentra, no lo explora. Durante el primer OF, los animales control y KD no presentaron diferencias en la exploración ($39,76 \pm 6,023$ m para los controles, $41,13 \pm$

9,299 m para los KD) (**Figura 50**). Sin embargo, durante el segundo OF, se observó que los animales control recorrieron menos distancia que en el primer OF ($30,88 \pm 6,019$ m; $p = 0.0034$), es decir que exploran menos el espacio, lo que indicaría que lo identifican como conocido. En cambio, los animales KD no presentaron diferencias en la distancia recorrida en los dos OF, lo que indicaría que no reconocen el espacio como familiar, y lo exploran el segundo día como si fuera la primera vez que están expuestos el mismo (**Figura 50**). Aunque el OF y el NOR *test* no evalúan los mismos parámetros, dado que el primero permite analizar la capacidad de habituación (reconocimiento del ambiente), y el segundo el reconocimiento de objetos similares, que la tendencia de ambos ensayos sea similar permite sospechar de un efecto de la KD sobre la memoria.

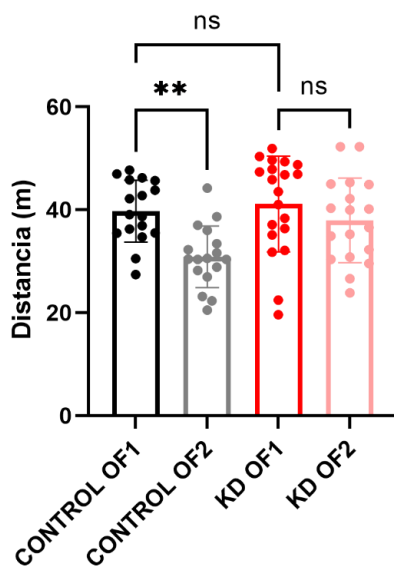
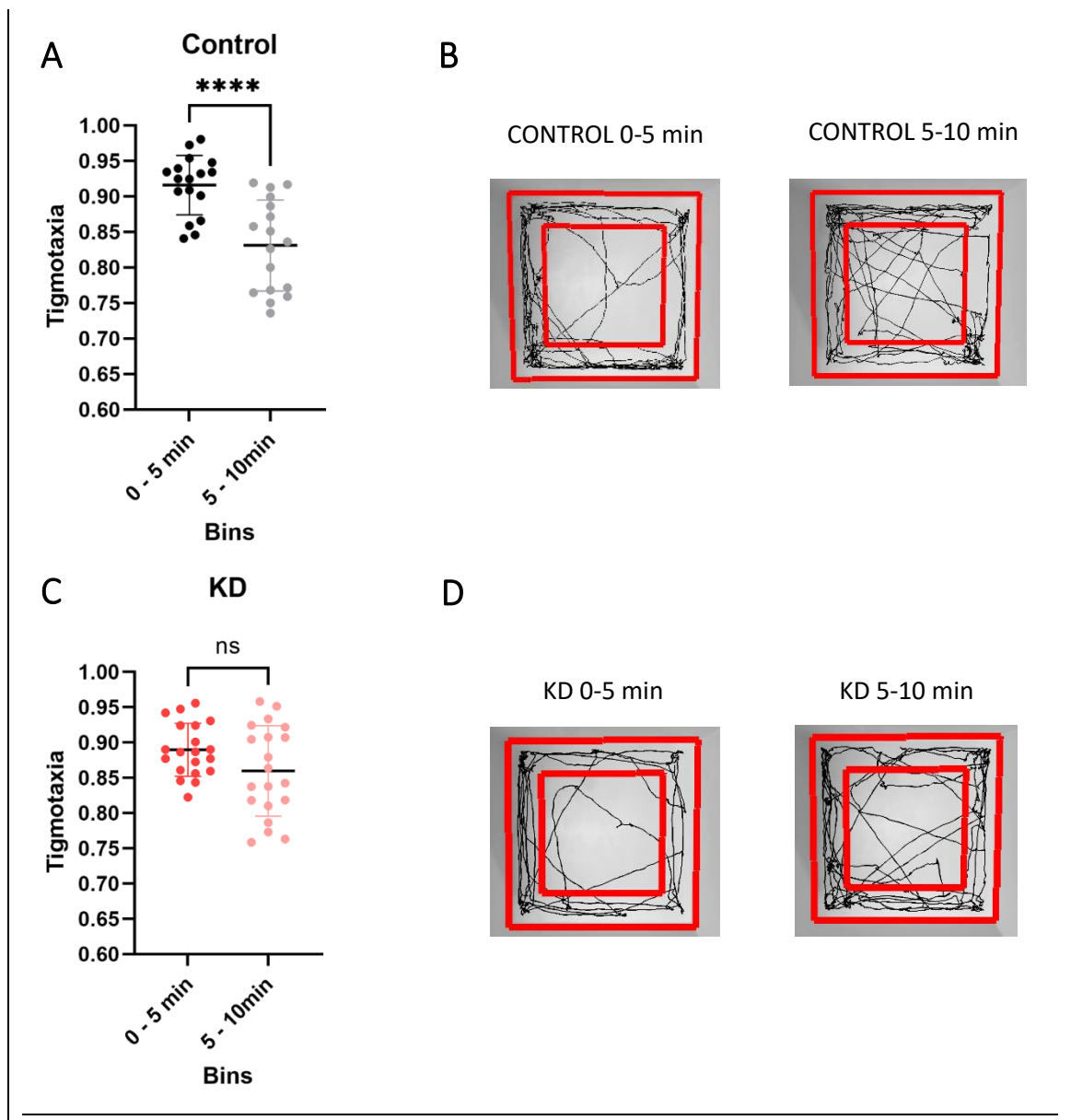


Figura 50: Distancia recorrida en el OF. Durante el primer OF (OF1), los animales control (puntos negros) y KD (puntos rojos) no presentaron diferencias en la distancia recorrida. En cambio, durante el segundo OF (OF2), se observó que los animales control (puntos grises) recorrieron menos distancia que en el OF1 (** $p = 0.0034$); mientras que los animales KD (puntos rosados) no presentaron diferencias en la distancia recorrida en los dos OF ($p = 0.6013$; $41,13 \pm 9,299$ m en el OF1 vs $37,93 \pm 8,229$ m en el OF2). ANOVA de una vía, test de Bonferroni; n Control = 17; n KD = 20.

Figura 49: Análisis de la tigmotaxia. **A)** Los controles en el segundo intervalo se animan a explorar más el espacio y cruzar por el centro, lo que reduce la tigmotaxia (ANOVA de una vía, test de Tukey; **** $p < 0.0001$; $0,9160 \pm 0,0419$ vs $0,8310 \pm 0,0642$; n = 17). **B)** Tracking de un animal control en los intervalos de 0-5 min y de 5-10 min, donde se observa que en el segundo intervalo aumentan los cruces por el centro de la arena del OF. **C)** Los animales KD no mostraron diferencias en la tigmotaxia a lo largo del ensayo (ANOVA de una vía, test de Tukey; ns, $p > 0.05$; $0,8897 \pm 0,0375$ vs $0,8698 \pm 0,064$; n = 20). **D)** Tracking de un animal KD en los intervalos de 0-5 min y de 5-10 min, donde se observa que prácticamente no hay diferencias en el recorrido entre los intervalos.



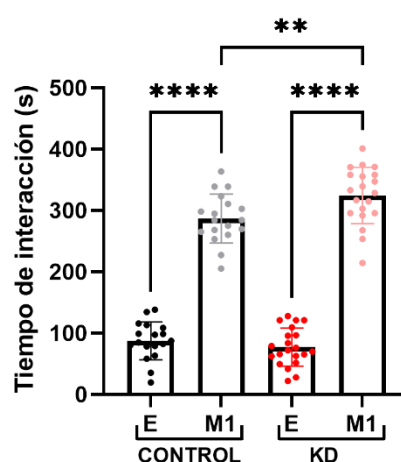
– *Sociabilidad*

Se ha reportado que la administración de una KD a niños con TEA produce efectos beneficiosos que, en gran medida, se manifiestan como una mejoría en la sociabilidad. Para evaluar este fenómeno se realizó un ensayo conductual para evaluar la interacción social en animales con dieta normal y KD. En el mismo, luego de un período de habituación al espacio, se expone al animal en estudio a un ratón extraño (M1), y se cuantifica el tiempo de interacción del mismo con una jaula vacía (E) y con dicho M1 (Ver: [4.3. Ensayo de Interacción Social](#)).

Tanto los animales control como los KD presentaron un comportamiento social típico de los ratones, que como seres sociales prefieren interactuar con otros animales en lugar de una jaula vacía. Se observó así que los animales control interactuaron más tiempo con M1 que con E, pasaron el 50% del tiempo del ensayo con el ratón extraño, y sólo el 16% con la jaula vacía (**Figura 51**). Los ratones KD mantuvieron un comportamiento social similar al de los controles, aunque estos fueron aún más sociables, dado que su tiempo de interacción con M1 fue mayor ($p = 0.0085$; $286,8 \pm 39,85$ s para los controles, y $324,5 \pm 46,15$ s para los KD) (**Figura 51**).

Figura 51: Efecto de la KD sobre la sociabilidad.

Ambos grupos interactuaron más tiempo con M1 que con E ($****p < 0.0001$). Los ratones KD mantuvieron un comportamiento social superior al de los controles ($**p = 0.0085$). ANOVA de una vía, test de Bonferroni para comparaciones múltiples. n Control = 18, n KD = 20.

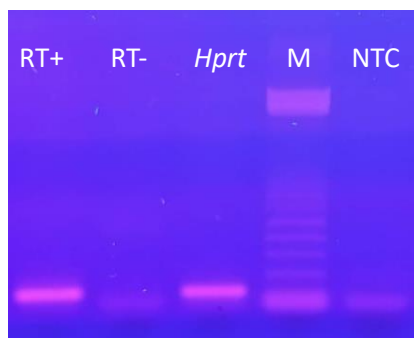


o Análisis de la expresión de genes tras la ingesta de la KD

Los cuerpos cetónicos han sido reportados como moduladores epigenéticos, por lo que pueden modificar la expresión de determinados genes, y en consecuencia podrían afectar el comportamiento, lo que permitiría explicar los cambios clínicos observados en pacientes con alteraciones psiquiátricas bajo tratamiento con KD. Entonces, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) sobre muestras de ARNm de hipocampo (HPC) y corteza prefrontal (Cx), se analizó la expresión de genes involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal (*Kcnq2-5*), el control del estrés oxidativo (*Sod1*, *Sod2*, *Foxo3*, *hdac3*) y el procesamiento de la memoria (*Chrna7*, *Chrna4*, *Chrb2*), con el objetivo de evaluar el impacto de la KD sobre la expresión de dichos genes, luego de una semana de ingesta (P28), y también en P80, luego de 59 días de administración de la dieta.

Previo a su uso con las muestras en estudio, se realizó la puesta a punto de cada par de *primers* mediante PCR convencional, a fin de determinar su temperatura de fusión óptima (Ver: [5.4. Validación de primers](#)). Para ello se emplearon controles positivos, es decir, tejidos donde la expresión del gen de interés ha sido previamente reportada. Para el caso de *Kcnq2*, *Kcnq3* y *Kcnq5* se realizó la validación empleando ADNc obtenido a partir de muestras de hipocampo de animales WT (**Figura 52**); y para la validación de *Kcnq4* se emplearon muestras de mesencéfalo de animales WT. Para el caso de *Chrna7*, *Chrna4* y *Chrn2* se realizó la validación empleando ADNc obtenido a partir de muestras de hipocampo de animales C57BL/6. Para la validación de *Sod1*, *Sod2*, *Foxo3* y *hdac3* se emplearon muestras de mesencéfalo como control positivo.

Figura 52: Gel de agarosa tras la puesta a punto del par de *primers* para la amplificación de *Kcnq3*. Referencias: RT+ (ADNc de mesencéfalo de un animal WT; obtenido luego de la transcripción reversa), RT- (contiene ARNm sin transcriptasa reversa), M (marcador de peso molecular), NTC (tubo sin muestra de material genético). Se incluyó un tubo de reacción con el gen endógeno *Hprt* para certificar la calidad de la muestra de ADNc. La ausencia de banda en el RT- y en el NTC permite descartar la presencia de ADN genómico y posibles contaminaciones en los reactivos de PCR, respectivamente.



Para el análisis de cada gen de interés se empleó un número de animales igual a 5 ($n = 5$), para ambas condiciones (Control y KD). La expresión relativa de ARNm se obtuvo mediante el método del $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Se calculó el $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (RQ), para determinar cómo se modifica la expresión génica en las

muestras de animales KD respecto a los controles, empleando como referencia dos genes endógenos (*Hprt* y *Tbp*).

Particularmente, para el caso de *Kcnq4*, mediante qPCR no se pudo detectar su expresión en las áreas cerebrales estudiadas en este caso. Este resultado coincide con reportes previos al respecto de este gen, dado que no se había reportado previamente su expresión en los tejidos analizados (Kharkovets et al., 2000). Sin embargo, para determinar con certeza su ausencia, se realizó la qPCR sobre las muestras control y KD de HPC y Cx, y se incluyó una muestra de mesencéfalo (MdBr) que sí expresa *Kcnq4*. Se encontró así expresión del gen en el control positivo, y su ausencia en los tejidos en estudio (**Figura 53**). Se observó expresión de los demás genes de interés en las muestras de animales control, tanto en HPC como en Cx (**Figura 54**).

Figura 53: Expresión del gen *Kcnq4* en corteza prefrontal e hipocampo de animales C57BL/6. Mediante qPCR se determinó que dicho gen no se expresa tanto en corteza prefrontal como en hipocampo de animales control y KD, siendo el MdBr el control positivo de la reacción.

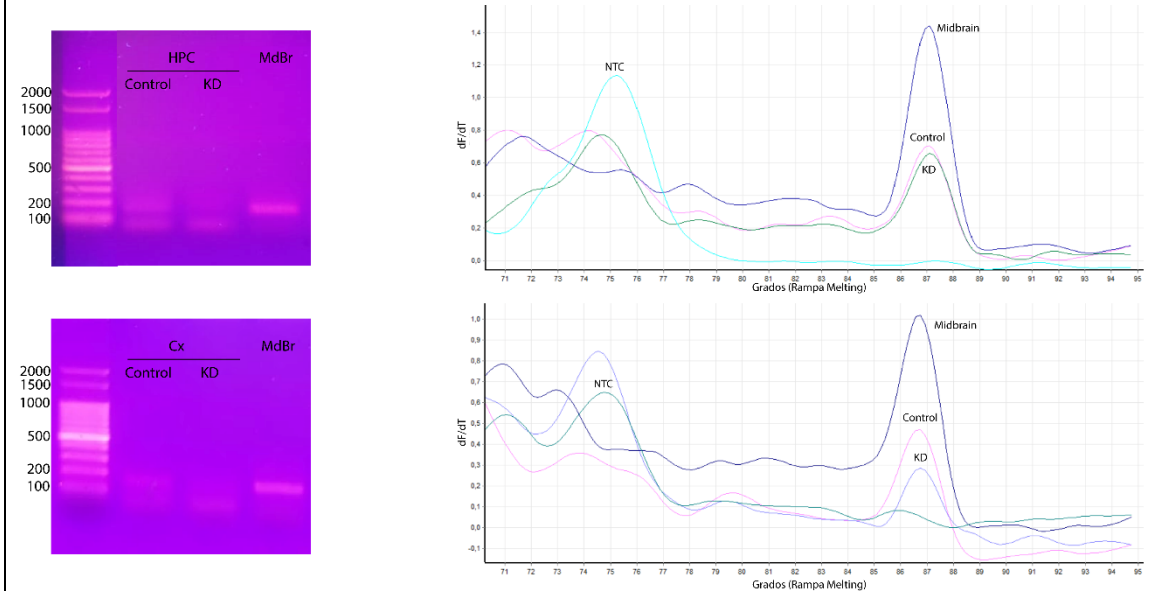
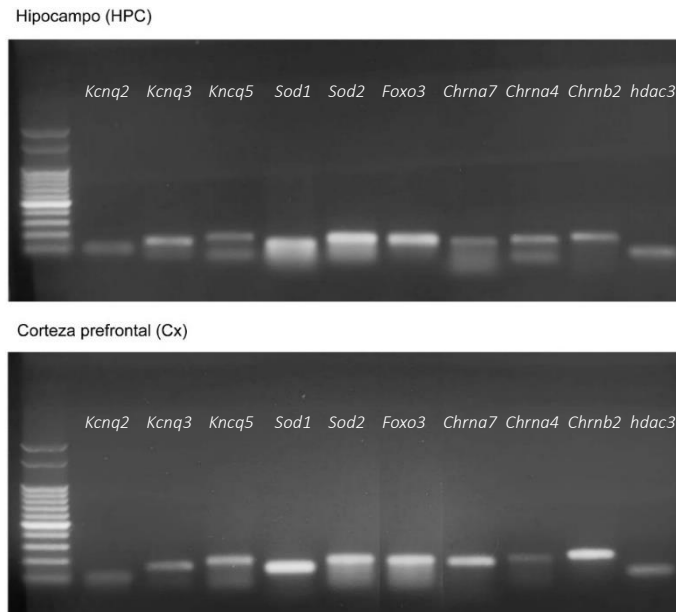


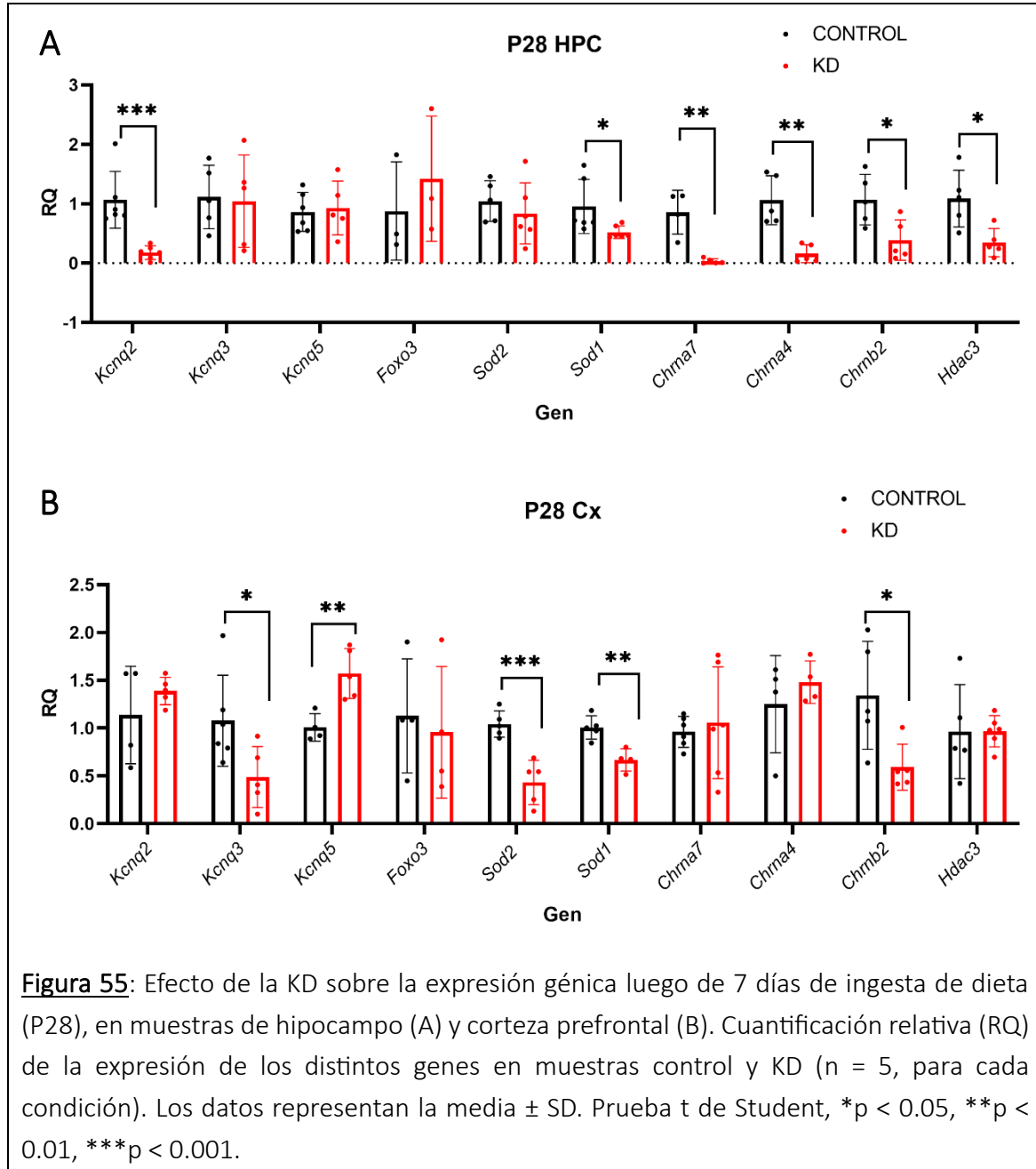
Figura 54: Expresión de genes en muestras control.



En las muestras de HPC de animales KD de P28, se encontró una disminución de ~6 veces de la expresión de *Kcnq2* y del gen *Chrna4*. La expresión de *Chrnb2* y de *hdac3* disminuyó ~3 veces respecto al control. A su vez, la expresión de *Sod1* se redujo a la mitad. El mayor impacto se observó sobre la expresión del gen *Chrna7*, que disminuyó ~25 veces respecto al control. En los demás genes no se encontraron diferencias significativas en su expresión (**Figura 55A**). En las muestras de Cx de animales KD de P28 se observó un aumento en la expresión de *Kcnq5*, y una reducción a la mitad en la expresión de *Kcnq3*, *Sod1*, *Sod2* y *Chrnb2* (**Figura 55B**).

En las muestras de HPC de animales KD de P80, se encontró un aumento en la expresión de *Kcnq5*. También aumentó al doble la expresión de genes involucrados en el control del estrés oxidativo (*Sod1*, *Sod2*). Mientras que, la expresión de los genes que codifican para las subunidades de los tres canales nicotínicos aquí estudiados ($\alpha 7$, $\alpha 4$ y $\beta 2$) se redujo ampliamente. Al igual que lo mencionado para el gen *Chrna7* en muestras de HPC a P28, a P80 también su expresión disminuyó, pero en este caso ~85 veces respecto al control. La expresión de *Chrna4* disminuyó ~6 veces y la de *Chrnb2* ~26 veces. En los demás genes no se encontraron diferencias significativas en su expresión (**Figura 56A**). En las muestras de Cx de animales KD de P80 se observó un aumento en la expresión de *Kcnq2* y *Kcnq5*. A diferencia de lo visto en P28, en estas muestras la expresión de *Sod1* y *Sod2* aumentó ~4 veces respecto al control. De la misma manera, también aumentó la expresión de los

genes *Chrna7* y *hdac3* (Figura 56B). La Tabla 15 resume los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión de genes en las muestras de HPC y Cx, a P28 y P80.



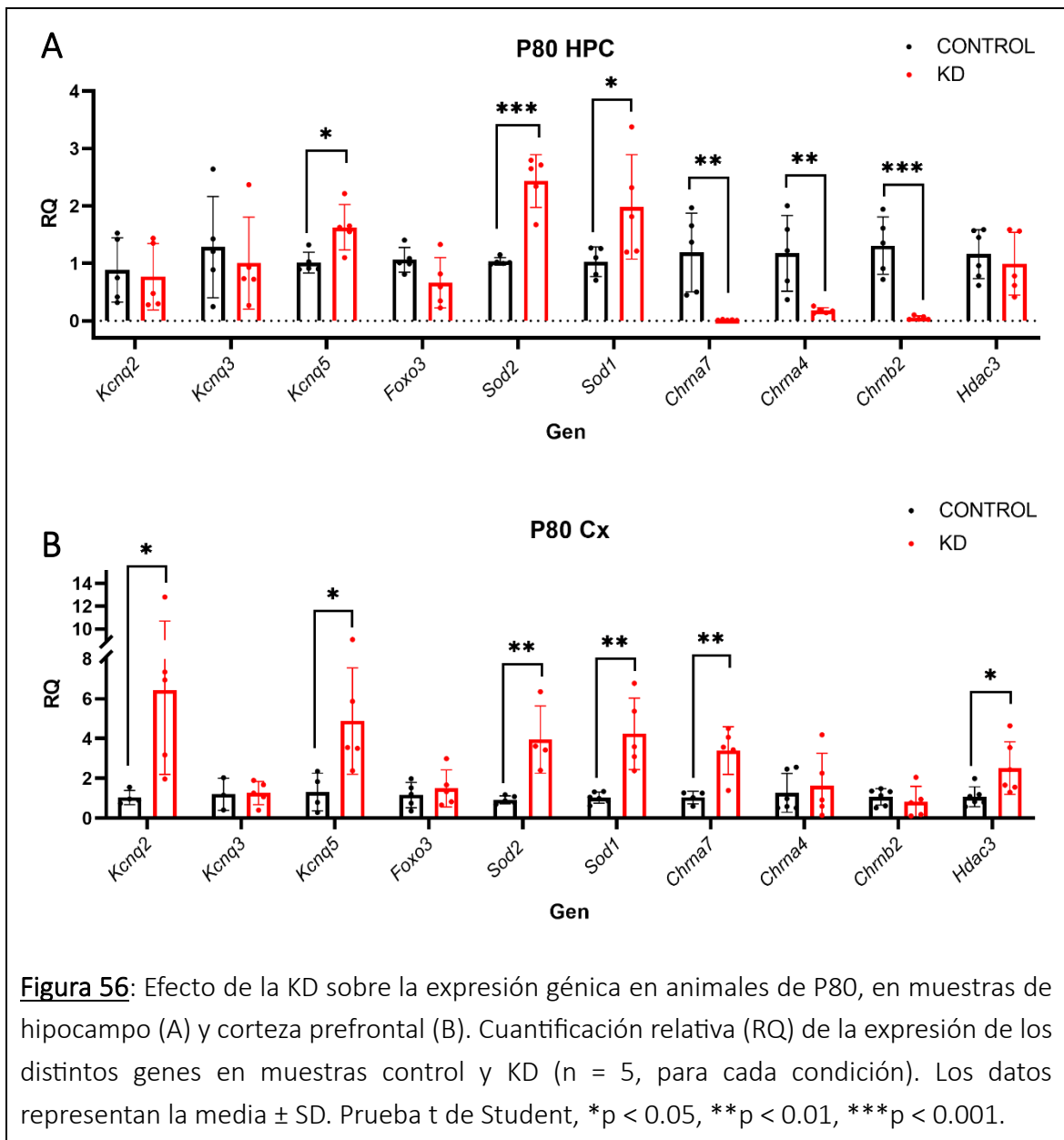


Figura 56: Efecto de la KD sobre la expresión génica en animales de P80, en muestras de hipocampo (A) y corteza prefrontal (B). Cuantificación relativa (RQ) de la expresión de los distintos genes en muestras control y KD (n = 5, para cada condición). Los datos representan la media ± SD. Prueba t de Student, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Tabla 15: Resultados obtenidos tras el análisis de expresión de genes, comparando la cuantificación relativa para los animales KD con sus respectivos controles. S/C: sin cambios.

Gen	HPC		Cx	
	P28	P80	P28	P80
<i>Kcnq2</i>	Disminuye	S/C	S/C	Aumenta
<i>Kcnq3</i>	S/C	S/C	Disminuye	S/C
<i>Kcnq5</i>	S/C	Aumenta	Aumenta	Aumenta
<i>Foxo3</i>	S/C	S/C	S/C	S/C

<i>Sod2</i>	S/C	Aumenta	Disminuye	Aumenta
<i>Sod1</i>	Disminuye	Aumenta	Disminuye	Aumenta
<i>Chrna7</i>	Disminuye	Disminuye	S/C	Aumenta
<i>Chrna4</i>	Disminuye	Disminuye	S/C	S/C
<i>Chrnb2</i>	Disminuye	Disminuye	Disminuye	S/C
<i>Hdac3</i>	Disminuye	S/C	S/C	Aumenta

DISCUSIÓN

La KD es una dieta caracterizada por su alto contenido graso y baja cantidad de carbohidratos, que tiene como objetivo promover la cetogénesis para alcanzar un estado de cetosis nutricional en el organismo (Le Foll & Levin, 2016). Los cuerpos cetónicos así generados no sólo son una fuente de energía alternativa a la glucosa, sino que también actúan como moduladores epigenéticos y como metabolitos de señalización intracelular en diversos procesos celulares (Y. He et al., 2023; Nelson et al., 2023; Newman & Verdin, 2014a). En este trabajo se logró elaborar una dieta cetogénica en el laboratorio, que fue bien recibida por los ratones, y permitió cumplir el objetivo de que los mismos alcancen un estado de cetosis, que se determinó en función de los niveles sanguíneos de BHB, para luego poder realizar estudios moleculares y conductuales.

La KD tiene beneficios y riesgos. Las ventajas de la dieta incluyen pérdida de peso y la reducción del apetito, además de un flujo más estable de energía a los tejidos (Brouns, 2018; Antonio Paoli, 2014). Justamente, la KD se promociona continuamente como una dieta para bajar de peso (Masood et al., 2023; Ting et al., 2018), efecto que se atribuye inicialmente a la estimulación de la diuresis, y luego al menor almacenamiento de grasa, debido al aumento de la lipólisis y a la disminución de la insulina durante la cetosis (Kirkpatrick et al., 2019). En este trabajo, se vio que en los primeros días de consumo de la misma los ratones experimentaron mayor dificultad para aumentar su peso, y la tendencia fue mantenerse siempre por debajo de los animales control.

Uno de los grandes temores entorno al consumo de dietas altas en grasa, como la KD, gira alrededor del riesgo de aumento de los lípidos séricos, con el peligro que eso representa para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En particular, en roedores se ha descrito el desarrollo de enfermedad del hígado graso no alcohólico y resistencia a la insulina (Anekwe et al., 2020; Kosinski & Jornayvaz, 2017). Sin embargo, numerosos reportes indican que, a pesar de su alto contenido graso, la ingesta de la KD permite mejorar los valores de lípidos sanguíneos, particularmente, el colesterol HDL y los TG tienden a mejorar ya que moviliza las grasas para su utilización como fuente de energía (Kwiterovich et al., 2003; Noain et al., 2020; Norwitz & Loh, 2020; Vidić et al., 2021).

Aunque se ya reportado que el consumo de KD produce aumento en los valores de colesterol total, al realizar fraccionamiento lipídico, se determinó que los valores de aquellos lípidos que podrían representar un riesgo para la salud no aumentan, y que incluso el colesterol HDL y los TG mejoran durante la ingesta de KD (Caminhotto et al., 2017; Kennedy et al., 2007; Norwitz & Loh, 2020). En esta tesis, las determinaciones séricas permitieron ver un perfil lipídico aumentado en los animales KD, con valores de colesterol y TG por encima del rango de referencia. Particularmente, para el caso del colesterol, se realizó una cuantificación total, por lo que el incremento podría deberse al aumento del colesterol HDL, y no del LDL. Para el caso de los TG aumentados, este resultado no coincide con lo reportado, donde se ha visto una mejoría en los valores de TG tras la ingesta de KD, tanto en humanos como en roedores, debido a que durante el estado de cetosis se promueve la utilización de ácidos grasos para la producción de ATP, debido a la baja insulina y al elevado glucagón (Capozzi et al., 2020). Dichos valores podrían atribuirse al método de toma de muestra de sangre, dado que la misma no fue obtenida por punción cardíaca como es recomendado para evitar contaminaciones. Por lo tanto, el aumento en los TG podría deberse a la presencia de extractos de otros tejidos en la muestra, como hígado, donde si se ha reportado la elevación de los TG (Kennedy et al., 2007). También dicha elevación de los TG durante la ingesta de la KD podría atribuirse a que las mediciones se realizaron sobre muestras de animales que no fueron sometidos a ayuno previo (para prevenir alteraciones en los tejidos que serían luego analizados), y para el grupo que si experimentó el ayuno tal vez la duración del mismo no fue suficiente para reducir el alto contenido graso que aporta la dieta.

En el suero de los animales también se cuantificó la actividad de la enzima GOT. La determinación de este parámetro permite evaluar la integridad del parénquima hepático de un individuo. Su cuantificación sérica, junto a la enzima alanina aminotransferasa, permite alertar sobre una posible lesión de los hepatocitos, ya que pone de manifiesto su fuga hacia el compartimento extracelular (Aulbach & Amuzie, 2017; X.-J. Huang et al., 2006; Jain et al., 2021). Dichas enzimas hepáticas también actuarían como marcadores moleculares de la actividad metabólica (Lu Zhang et al., 2015). Esto justificaría su elevación durante los primeros días de ingesta de KD en animales de P28, momento en el

cual los animales alcanzaron el pico de BHB en sangre, indicando que el metabolismo está dirigido hacia la producción de cuerpos cetónicos, principalmente en el hígado. Sin embargo, cuando ya se adapta a esa situación, los valores se normalizan, por lo que en animales KD de P80 no se encontraron diferencias con los controles. Esta adaptación se correlaciona con la disminución en la producción de cuerpos cetónicos observada luego de P28 (D7 de KD). Este proceso es normal en individuos que realizan KD, ya que sus tejidos luego de un tiempo se adaptan para utilizar mayor cantidad de ácidos grasos directamente como combustible (Chung, 2023).

Una vez realizada la caracterización bioquímica de las consecuencias del consumo de la KD, luego se analizó su efecto sobre la expresión de determinados genes en el HPC y la Cx, partiendo de la idea de que los cuerpos cetónicos actúan como moduladores epigenéticos (Newman & Verdin, 2017). El término epigenética fue introducido por primera vez por Hal Waddington en 1942, para referirse al estudio de los mecanismos que modulan la expresión genética, describiendo las interacciones internas y externas entre el medio ambiente y los genes, que conducen al desarrollo de un fenotipo determinado (Waddington, 1942). Más precisamente, se refiere a cualquier proceso que influya en la expresión génica, ya sea activando o reprimiendo la transcripción, pero no involucra cambios en la secuencia nucleotídica del ADN. Esta regulación de la expresión se produce a través de cambios en la estructura de la cromatina por medio de modificaciones postraduccionales en las histonas, o mediante la metilación del ADN (Tronick & Hunter, 2016; Weinhold, 2006). Entre las modificaciones de histonas más comunes se encuentran la acetilación, metilación y fosforilación. Por otro lado, la modificación típica del ADN es la metilación; se trata de un proceso reversible que implica la adición de grupos metilo a las bases nitrogenadas del ADN que, mediante diversos mecanismos, puede influir en la actividad de los genes (Black et al., 2012; Miller & Grant, 2013).

Se conoce que los butiratos son inhibidores no selectivos de las enzimas HDAC de clase I (H. J. Kim & Bae, 2011), y el BHB no es una excepción (Newman & Verdin, 2014b; Shimazu et al., 2013). Estos inhiben la actividad de la enzima uniéndose a su sitio catalítico, lo que bloquea el acceso del sustrato al sitio (Wenbo Li & Sun, 2019). Debido a ese mecanismo, la elevación de los cuerpos cetónicos mediante administración exógena, ayuno

prolongado o cetogénesis nutricional, aumenta las marcas globales de acetilación de histonas en la cromatina, y en consecuencia tiene efectos epigenéticos (Y. He et al., 2023; Shimazu et al., 2013). Más recientemente, se ha determinado que el BHB también es capaz de regular una serie de fenómenos epigenéticos mediante metilación de histonas y la reducción del nivel de metilación del ADN (Y. He et al., 2023; Ungaro et al., 2022).

La acetilación de histonas es un proceso clave en la regulación de la expresión génica. Cuando las histonas están acetiladas, la cromatina tiende a estar más relajada, lo que facilita el acceso de los factores de transcripción al ADN y, en consecuencia, puede aumentar la expresión génica. Por el contrario, la desacetilación de histonas está asociada con una condensación de la cromatina, y con una supresión de la expresión génica. Los inhibidores de HDAC se han utilizado para una amplia variedad de propósitos, como anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes y neuroprotectores (D. Chen et al., 2017), entre otros motivos debido a que la inducción de la acetilación de histonas estimula al promotor de genes de resistencia al estrés oxidativo FoxO3a (Y. Liu et al., 2024; X. Wang et al., 2017).

La KD tiene efectos beneficiosos en diversos trastornos, y aunque en muchos casos no se conocen con precisión los mecanismos involucrados, las evidencias experimentales actuales indican que los mecanismos epigenéticos, que controlan la expresión génica, están involucrados. Particularmente los cuerpos cetónicos, a través de un mecanismo epigenético, regulan la expresión de varios genes implicados en la respuesta antioxidante y antiinflamatoria (Rojas-Morales et al., 2020; Youm et al., 2015).

En esta tesis no se realizaron análisis epigenéticos propiamente dichos, ya que no se analizaron los niveles de acetilación de histonas, ni metilación. Se analizó de manera indirecta el efecto epigenético mediante la cuantificación de la expresión relativa de determinados genes, luego de tratamientos de distinta duración con la KD. Con el objetivo de estudiar genes que podrían relacionarse con los efectos beneficiosos reportados sobre la KD, puntualmente se analizaron genes involucrados en la modulación de la excitabilidad neuronal (canales de potasio *Kcnq2-5*) (David A. Brown & Passmore, 2009), otros implicados en el control del estrés oxidativo (*Sod1* y *Sod2*) (Ying Wang et al., 2018), y otros que intervienen en la modulación de procesos de memoria y aprendizaje, tales como las

subunidades $\alpha 7$ (*Chrna7*), $\alpha 4$ (*Chrna4*) y $\beta 2$ (*Chrn2*) del receptor nicotínico de ACh (nAChR) (Kutlu & Gould, 2015). El análisis se realizó mediante qPCR sobre ARNm extraído del HPC y la Cx, por su relación con los procesos de memoria y el desarrollo de la conducta. La formación del hipocampo es parte del sistema límbico, y es la principal responsable de la memoria a largo plazo y la navegación espacial (Sigurdsson & Duvarci, 2016).

Se pudo ver que el nivel de expresión del gen que codifica para la enzima HDAC3 (*Hdac3*), que es la que se expresa mayoritariamente en cerebro, no cambia tras la administración de la KD en el HPC de animales a P80 ni en la Cx de P28. Sin embargo, se determinó que presenta una disminución en el HPC a P28 y un aumento en la Cx a P80 (**Tabla 15**). Esto indica que, en presencia de cuerpos cetónicos, el nivel de expresión de *Hdac3* depende de la región cerebral y del contexto metabólico. A pesar de que el BHB es un inhibidor de la actividad de la enzima HDAC, no necesariamente ese proceso afecta la expresión del gen. La inhibición de la actividad enzimática de las HDAC podría asociarse con el aumento de enzimas antioxidantes y disminución de genes asociados a memoria en el HPC, mientras que su efecto en Cx muestra una disminución de los antioxidantes y un efecto mucho menor sobre genes asociados a memoria. En los casos en los que se observó un cambio en la expresión de *Hdac3*, este puede atribuirse a una retroalimentación negativa sobre los niveles de los genes cuya expresión está modulada por la actividad de las HDAC. A su vez, por su papel crucial en la modificación de la cromatina, la expresión inadecuada del gen que codifica para la enzima, puede conducir a la activación o represión inadecuada de otros genes, que puede desencadenar diversas patologías (Lai et al., 2012). En conclusión, los aumentos encontrados de la expresión de ciertos genes podrían asociarse a una mayor inhibición de las HDAC, que daría como resultado una mayor acetilación de histonas, que promueve así la expresión génica.

También se analizaron los genes que codifican para las subunidades KCNQ neuronales. Los mismo fueron elegidos dado que se ha visto que la KD resulta beneficiosa en pacientes con epilepsia y/o TEA, y algunos casos de dichos trastornos han sido vinculados con variantes genéticas en los *Kcnq* (Abidi et al., 2015; Gilling et al., 2013; M. Nappi et al., 2022; Soh et al., 2014). A su vez, se estima que el 20% de los casos de TEA también pueden padecer epilepsia (Besag, 2018). El VPA, al igual que BHB, es un ácido alifático, capaz de

inhibir a las HDAC (H. J. Kim & Bae, 2011). El VPA es ampliamente utilizado como antiepiléptico, y se ha visto que dentro de los mecanismos de acción por los cuales permite controlar las convulsiones se encuentra la preservación de la I_M en las neuronas, ya que interrumpe la supresión muscarínica de la I_M y previene la hiperexcitabilidad neuronal (Kay et al., 2015). Por lo tanto, la modulación de la I_M a través de los canales KCNQ contribuiría al efecto anticonvulsivante del VPA (Hoshi, 2020). Por otro lado, el tratamiento con VPA también parece mejorar la pérdida auditiva asociada a alteraciones en el gen *KCNQ4* (D. Chen et al., 2017). La HDAC1 se expresa en el órgano de Corti, y está implicada allí en la muerte de las células ciliadas por apoptosis (D. Chen et al., 2017), particularmente, se ha demostrado que su sobreexpresión regula negativamente la expresión de *KCNQ4*. De allí que, la inhibición de la HDAC1 por VPA, recuperaría la expresión de *KCNQ4* en las células ciliadas de la cóclea, y permitiría así reestablecer allí la corriente de K^+ , cuya ausencia es responsable de la sordera DFNA2 (Nam et al., 2023). Teniendo en cuenta la similitud estructural entre el VPA y BHB, se podría establecer un vínculo entre el mecanismo anticonvulsivante del VPA y el de la KD. Asimismo, ya se ha determinado que el BHB es capaz de activar a los canales KCNQ (Abbott, 2020; R. íW Manville & Abbott, 2020). En particular, en variantes genéticas de *Kcnq3* que provocan cuadros epilépticos, la administración del BHB revirtió la disfunción del canal inducida por la mutación, proporcionando así la justificación para el uso de KD en pacientes epilépticos, principalmente en aquellos portadores de variantes con pérdida de función en *KCNQ2* o *KCNQ3* (Falsaperla et al., 2023; Jepps et al., 2021; Miceli et al., 2020).

Particularmente, en este análisis de los efectos de la KD sobre la expresión génica, *Kcnq4* no pudo amplificarse en los tejidos estudiados. Esto concuerda con estudios publicados previamente, en los cuales se determinó que la expresión de *KCNQ4* se encuentra restringida al cerebro medio y algunos núcleos puntuales del encéfalo (Kharkovets et al., 2000). Para el resto de los *Kcnq* se encontró que su expresión puede verse afectada por la KD (**Tabla 15**). En los casos donde se encontraron cambios, se vio siempre un aumento en la expresión de *Kcnq5*. Para el caso de *Kcnq2*, se observó una disminución de su expresión en el HPC de animales de P28, y un aumento en la Cx de animales de P80. La expresión de *Kcnq3* sólo cambió en la Cx de animales de P28. Las propiedades cinéticas

de la I_M dependen de las subunidades que la conforman (David A. Brown & Passmore, 2009; Delmas & Brown, 2005), por lo que, los cambios en el patrón de expresión de los *Kcnq* alterarían la I_M , y esto podría modificar la excitabilidad neuronal. Para el caso de los aumentos en la expresión génica, esto permitiría elevar la disponibilidad de canales, que generarían una mayor I_M capaz de modular la excitabilidad neuronal.

Se ha determinado que el BHB no sólo es un modulador epigenético, sino que también interactúa directamente con los canales KCNQ, tanto *in vitro* como *in vivo* (R. W. Manville et al., 2020). Este cuerpo cetónico genera la apertura de los canales KCNQ, con lo cual reduce la excitabilidad neuronal. Por lo tanto, la presencia elevada y continua del BHB en sangre, en especial en las primeras semanas de ingesta de la KD, generarían la activación de los KCNQ e incremento de la I_M , y esto controle la frecuencia de gatillado de las neuronas. Esto podría justificar la ausencia de cambios en la expresión de los *Kcnq*, o incluso la disminución en sus niveles de expresión en animales de P28, por retroalimentación negativa de la expresión génica. Luego de 7 días de tratamiento, que hay una mayor cantidad de BHB, habría una sobre activación de los canales KCNQ, principalmente de las subunidades KNCQ2/3 que son las principales responsables de la I_M , y eso podría causar la inhibición de los genes relacionados, llevando a la disminución en la expresión de los genes *Kcnq2* y *Kcnq3* encontrada en HPC y Cx, respectivamente.

FoxO3 tiene un papel clave en la inducción de la expresión de *Sod2* y *CAT*, que codifican para las enzimas Mn-Superóxido Dismutasa (SOD2) y catalasa, respectivamente, ambas involucradas en la resistencia al estrés oxidativo. Cuando FoxO3 se activa, transloca al núcleo celular, donde se une a las regiones promotoras de los genes antioxidantes mencionados. Aunque la activación de la enzima SOD1 (Cu-Zn Superóxido Dismutasa) depende de otra vía de señalización completamente distinta, ante situaciones de estrés oxidativo, se induce la expresión aumentada de *Sod1*, y como resultado se sintetiza más enzima SOD1 que, al igual que SOD2, cataliza la degradación de superóxidos en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Cuando existe un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de las células para neutralizarlas, se genera un cuadro de estrés oxidativo, que puede resultar en el daño de componentes celulares, que

contribuye al desarrollo de diversas enfermedades (K. Du et al., 2013; Ying Wang et al., 2018).

En este trabajo, la expresión de *Foxo3* se mantuvo sin cambios, sin embargo, se observó una disminución de la expresión de *Sod2* en Cx de P28, y su aumento en HPC y Cx de animales de P80. Cabe destacar que aquí no se midió la cantidad de FoxO3 fosforilado/desfosforilado, pero estaría aumentada dicha vía de señalización, ya que aumenta el nivel de expresión de *Sod2*, que se encuentra río debajo de FoxO3. Además, la expresión de *Sod1* cambió en el mismo sentido que la de *Sod2*, estando disminuida en ambos tejidos en P28, y aumentada en P80. Dado que se ha demostrado que los cuerpos cetónicos reducen la generación de ROS (Alhamzah et al., 2023), el aumento de la expresión de los genes *Sod1/Sod2*, que llevaría a una mayor disponibilidad de esas enzimas, justificaría el efecto antioxidante de la KD. Aquí no se realizó ningún ensayo *in vivo* relacionado con esta mayor protección antioxidante, pero los resultados a nivel génico permiten predecir que la KD sería beneficiosa como neuroprotector, y por ello tendría un rol beneficioso en autismo.

Una de las vías de señalización ampliamente vinculada a los TEA es la vía PTEN/PI3K/Akt/FoxO3a, que resulta fundamental para el neurodesarrollo (Zhou & Parada, 2012). Tras la activación de Akt, esta quinasa puede fosforilar a FoxO3, dejándolo retenido en el citoplasma, por lo que se bloquea la transcripción de genes mediada por dicho factor de transcripción, que incluyen genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, la apoptosis y ciertos procesos metabólicos, entre otros (Carnero et al., 2008; S. Du & Zheng, 2021). Particularmente, en mutantes *daf-18/PTEN* de *C. elegans* se encontró que tienen dificultades a la hora de ejercer un comportamiento complejo como la respuesta de escape, pero, sorprendentemente, este defecto mejora en animales cultivados en presencia de BHB. PTEN es a su vez un regulador negativo de la vía PI3K/Akt, se encarga de desfosforilar a PIP3, para antagonizar la vía de señalización de PI3K, impidiendo la activación de Akt (R. Christensen et al., 2011). El efecto beneficioso del BHB se suprime en mutantes *daf-16/FOXO*, lo que revelaría un papel clave para este factor de transcripción (Giunti et al., 2023). En ratas inyectadas con BHB, se ha observado una regulación positiva de FoxO1 y sus genes diana catalasa y SOD2 por parte de este

metabolito, que sería responsable del efecto antiinflamatorio observado en este caso, y que en general se le atribuye a la KD (D. H. Kim et al., 2019).

Tanto la Cx como el HPC son tejidos con alta expresión de nAChR, que son receptores ionotrópicos de localización pre y postsináptica; particularmente la activación de los presinápticos se asocia con la modulación de la liberación de neurotransmisores, mientras que la de los postsinápticos provoca una despolarización celular que puede desencadenar cascadas de señalización intracelular (Kutlu & Gould, 2015). Estos receptores participan en la plasticidad sináptica y la formación de la memoria, mediante la activación de cascadas de señalización celular asociadas al aprendizaje. Se ha reportado que, la disminución de la concentración de nAChR en el hipocampo se asocia con el deterioro cognitivo presente en esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer (Pocivavsek et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que los agonistas de estos receptores mejoran la memoria, mientras que su bloqueo ocasiona el deterioro de la misma (Levin et al., 2002). En el análisis de la expresión génica de los nAChR, específicamente de los genes que codifican para las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 4$ y $\beta 2$, se destaca la disminución de la expresión de todas ellas en el HPC en ambas edades. Estos resultados sugerirían que los animales bajo KD podrían presentar alteraciones en la memoria. Particularmente, se ha demostrado que la KD tiene efectos conductuales beneficiosos en modelos animales de autismo, así como en humanos (Castro et al., 2015, 2017), aunque se desconocen los mecanismos subyacentes a dichos efectos. Partiendo de esta idea, uno de los objetivos de este capítulo fue evaluar la conducta de los animales bajo KD, a fin de determinar cuáles podrían verse afectadas por la misma:

- o Memoria

Mediante ensayos conductuales se pudo detectar una alteración leve en la memoria de reconocimiento. El deterioro cognitivo identificado a en animales de P28 podría ser responsabilidad de la disminución de la expresión de los nAChR, que se suma a la deficiencia de *Sod1* y *Sod2*, lo cual indicarían una condición de estrés oxidativo que sería perjudicial para las neuronas en desarrollo. De la misma manera, la reversión del deterioro en la memoria identificado a largo plazo, podría también asociarse a la sobreexpresión de SOD2 en el hipocampo a P80, así como al aumento de la expresión de

Chrna7 en la Cx. Este fenómeno en modelos animales de Alzheimer ya se ha vinculado con una prevención de los déficit de memoria y aprendizaje característicos de la enfermedad (Massaad et al., 2009; Saito et al., 2022). Asimismo, en humanos con un deterioro cognitivo leve, se ha demostrado un efecto beneficioso de la cetosis nutricional sobre la memoria (Krikorian et al., 2012). Los resultados de este trabajo indicarían que existe en los animales KD un desarrollo de la memoria de reconocimiento distinto al de los controles, que puede necesitar más tiempo o una mayor cantidad de presentaciones del objeto a reconocer para su procesamiento, dado que en el corto plazo los KD presentaron una reducción transitoria de la memoria, que luego se normaliza. Estos efectos pueden atribuirse también a la mejoría en los niveles de antioxidantes cerebrales, lo cual induciría un menor daño neuronal al reducir la cantidad de ROS. A su vez, se ha reportado que compuestos que inhiben a los canales KCNQ (bloqueantes) sirven para mejorar la memoria (Gribkoff, 2003), por lo que los cambios en la expresión de los genes *Kcnq* también se sumarían al efecto de la KD sobre la memoria.

o Ansiedad

Siguiendo con los ensayos conductuales, a partir del OF, se podría inferir que la KD generaría una conducta de tipo ansiosa en los animales. Sin embargo, en el ensayo de la caja de luz-oscuridad no se manifestó dicha conducta. Dado que el OF no es un ensayo óptimo para evaluar ansiedad, y que no se realizó en este trabajo una batería de ensayos para tal fin, no se podría concluir que la KD tiene un efecto ansiogénico. Además, excepción de unos pocos reportes en los que se ha informado de trastornos de pánico y ansiedad exacerbados tras la ingesta de una KD, que se atribuyen reducciones inducidas por la dieta en la serotonina cerebral y el triptófano plasmático (Ehrenreich, 2006; Sripongpun et al., 2022), la mayoría de las publicaciones coinciden en lo contrario, es decir que, no se han visto efectos de los cuerpos cetónicos sobre conductas relacionadas con la ansiedad, lo que indicaría que la KD no influye en ellas (Ciarlone et al., 2016; Grabowska et al., 2024; J. Huang et al., 2019).

o Sociabilidad

Al analizar los efectos de la KD sobre la conducta social de los animales, se observó una mejoría en la misma. Aunque no se conocen los mecanismos involucrados, ya se habían reportado efectos beneficiosos sobre los síntomas de los TEA en niños bajo KD, que incluyen la mejoría de las habilidades sociales, el lenguaje y la comunicación (Grabowska et al., 2024; Napoli et al., 2014). Asimismo, en el modelo de autismo inducido por VPA se ha observado un aumento de la sociabilidad en los ratones alimentados con KD (Castro et al., 2017). También hay reportes que no muestran cambios en la conducta social de ratones C57BL/6J (J. Huang et al., 2019), sin embargo, allí la administración de la KD se realizó a partir de los 2-3 meses de edad, a diferencia de este caso, donde la KD se administró a partir del destete en P21, lo que indicaría que los efectos están sujetos a la etapa del desarrollo en la que comienza el tratamiento.

En los animales alimentados con KD se ha observado una mayor cantidad de células positivas para c-Fos en regiones del cerebro asociadas con comportamientos sociales, incluida la corteza cingulada, los núcleos septales laterales y el núcleo del lecho anterior de la estría terminal. Esto apoya la idea de que el aumento en la sociabilidad surge del impacto del KD en los circuitos neuronales que controlan el comportamiento social, independientemente del deterioro social subyacente en cada modelos animal (Grabowska et al., 2024; Verpeut et al., 2016).

El neuropéptido oxitocina cumple un rol importante en la sociabilidad en humanos, afecta la interacción social, la empatía y la regulación de las emociones de un individuo, que están estrechamente relacionadas con la construcción de las redes neuronales sociales (Han et al., 2021). Particularmente, la KD provoca un gran impacto en la composición de la microbiota intestinal (Rew et al., 2022) y se conoce que esta condiciona los niveles de oxitocina (Varian et al., 2023). Aquí no fue evaluado, pero la mejoría en la sociabilidad en los ratones KD podría deberse a modificaciones en la microbiota que, mediante el nervio vago en el eje intestino-cerebro, aumenta la síntesis de oxitocina en el hipotálamo.

Para finalizar, aún quedan pendientes muchas explicaciones respecto a los efectos de la KD, así como también es necesario determinar si los tratamientos prolongados con la misma son adecuados. Probablemente lo conveniente sea alternar la dieta, para lograr los efectos beneficiosos producto de los altos niveles de BHB, ya que en el largo plazo sus valores se normalizan, y con ello muchos de sus efectos.

CONCLUSIONES

- ✓ La KD es una herramienta adecuada para alcanzar un estado de cetosis, que permite tener una fuente de energía alternativa a la glucosa, y además a los cuerpos cetónicos como moduladores epigenéticos.
- ✓ Luego de una semana de ingesta de la KD los animales alcanzan el estado de cetosis, llegando al valor más elevado de BHB en sangre, acompañado por la glucemia más baja.
- ✓ La KD no afecta el peso corporal de los animales. Si se ven aumento de colesterol total y TG al evaluar su perfil lipídico.
- ✓ La cetosis altera algunas conductas en los animales adultos jóvenes (>P60): aumenta la sociabilidad y conducta tipo ansiosa, y provoca un deterioro en la memoria de reconocimiento de objetos en el corto plazo.
- ✓ Los cuerpos cetónicos alteran la expresión de diversos genes, siendo los cambios más evidentes la disminución en la expresión de los genes que codifican para los nAChR en el HPC, así como la disminución de *Sod1* y *Sod2* luego de una semana de ingesta de KD (cuando se alcanza el estado de cetosis), y el aumento de la expresión de *Sod1* y *Sod2* tras la exposición a largo plazo a la KD.
- ✓ Particularmente, la regulación a la baja de los nAChR podría ser la principal responsable de las alteraciones detectadas en la memoria de los animales.
- ✓ Es indispensable la administración de la KD a edades tempranas para obtener un efecto sobre el neurodesarrollo. Cuando se administra en edades más avanzadas tiene efecto, pero no necesariamente son los mismos, ni tan profundos.
- ✓ La KD tiene efectos epigenéticos sobre la corteza y el hipocampo, y estos efectos son tejido-específicos y cambian con la edad. Esto sugiere que en algunas regiones del cerebro hay una adaptación al cambio metabólico inducido por la KD, mientras que otras probablemente tardan más tiempo en manifestar cambios en la expresión génica.

CAPÍTULO 3: Canales de potasio KCNQ en el núcleo pedúnculo pontino.

RESULTADOS

El PPN, una estructura conocida como miembro colinérgico del RAS, contribuye a la regulación del ciclo sueño-vigilia. Los canales KCNQ son responsables de la I_M , que es una corriente de potasio no inactivante, modulada principalmente por señalización colinérgica. En el SNC, la expresión de KCNQ4 está restringida a determinadas estructuras del tronco del encéfalo, como ciertos núcleos del RAS. En este capítulo se investigó la presencia de las distintas subunidades KCNQ neuronas en el PPN, y la funcionalidad del canal KCNQ4 en dicho núcleo, utilizando un modelo de ratón que carece de expresión de KCNQ4.

o Expresión génica de las subunidades *Kcnq* en el PPN.

Se ha determinado la presencia de I_M en neuronas colinérgicas del PPN (Bordas et al., 2015). Sin embargo, se desconoce qué subunidades componen de dicha corriente. Por esta razón, primero, se evaluó la expresión génica de las subunidades *Kcnq2-5* en muestras de PPN extraídos de cerebros de ratones *Kcnq4^{+/+}* (WT) y *Kcnq4^{-/-}* (KO) mediante qPCR. Para eso se debió realizar la eutanasia de los animales, disección del cerebro y posterior extracción y purificación del ARNm (Ver: [Análisis de expresión génica](#)).

Para confirmar la obtención del PPN en las muestras de tejido recolectadas, se analizó en el ADNc de cada muestra la presencia del marcador de neuronas colinérgicas colinacetyltransferasa (*ChAT*) mediante PCR convencional. Luego, mediante electroforesis en gel de agarosa se determinó la presencia de una banda de 175 pb. Aquellas muestras que contenían el PPN presentaban dicha banda, mientras que, en aquellos tejidos que carecen de la expresión de *ChAT* no se observa dicha banda. Para validar los *primers* utilizados, se incluyeron muestras de corteza prefrontal, que carece de la expresión de ChAT (ausencia de banda de 175 pb) y de cerebro total como control positivo (presencia

de banda a 175 pb) (Figura 57). Se analizaron sólo aquellas muestras de PPN que fueron positivas para *ChAT*.

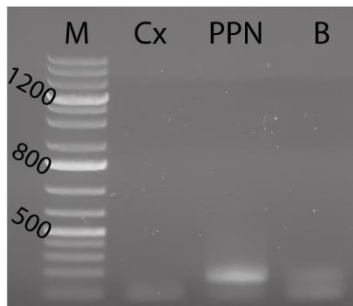


Figura 57: ChAT en el PPN.

Marcador de PM (M), corteza prefrontal (Cx) como control negativo, PPN y cerebro total (B) como control positivo. Se identifica la banca de 175pb tanto en la calle del PPN como del control positivo, estando la misma ausente en el control negativo.

Previo a su uso con las muestras en estudio, se realizó la puesta a punto de cada par de *primers* mediante PCR convencional, a fin de determinar su temperatura de fusión óptima (Ver: [5.4. Validación de primers](#)). Para ello se emplearon controles positivos, es decir, tejidos donde la expresión del gen de interés ha sido previamente reportada. Para el caso de *Kcnq2*, *Kcnq3* y *Kcnq5* se realizó la validación empleando ADNc obtenido a partir de muestras de hipocampo de animales WT; y para la validación de *Kcnq4* se emplearon muestras de mesencéfalo de animales WT (Ver: [Análisis de la expresión de genes tras la ingesta de la KD](#)).

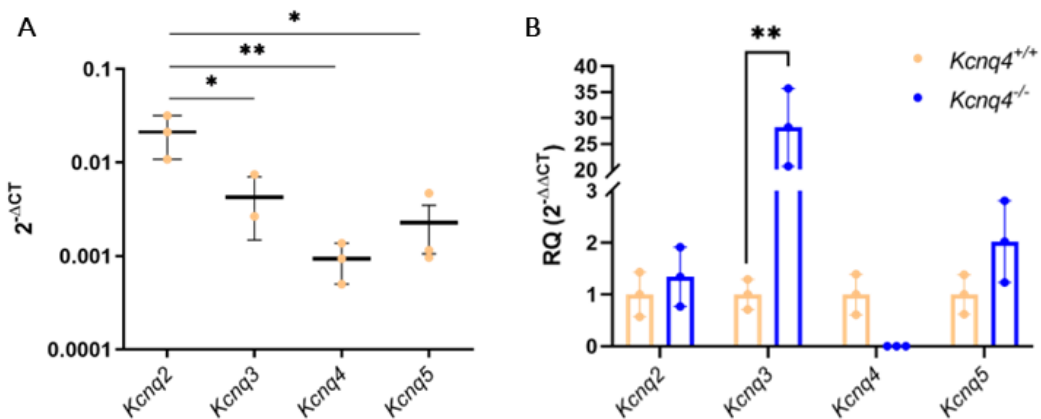
Una vez validados los *primers* para cada subunidad neuronal del canal KCNQ, se estudió la expresión del ARNm de las muestras de PPN. Para el análisis de cada subunidad se empleó n=3 (cada muestra contenía un pool de 3 animales), para ambos genotipos. La expresión relativa de ARNm se obtuvo mediante el método del $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Para el análisis de los datos se calculó el $2^{-\Delta C_t}$ para las muestras de animales WT, con el objetivo de determinar qué subunidades *Kcnq* se expresan en el PPN, y los niveles relativos de las mismas, calculados tomando como referencia dos genes endógenos, *Hprt* y *Gapdh*. También se calculó el $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (RQ), para determinar cómo se modifica la expresión de las subunidades *Kcnq* en ausencia de KCNQ4 en las muestras de animales KO respecto a las WT.

Se determinó así que, en el PPN de animales WT, se expresan *Kcnq2*, -3, -4 y -5, siendo *Kcnq2* el que se encuentra mayormente expresado en dicho núcleo, y *Kcnq4* el que

presenta menor nivel de expresión (**Figura 58A**). Esto permitió confirmar la presencia de todas las subunidades *Kcnq* neuronales en el PPN, y que dicho núcleo se suma a los miembros del RAS en los que se expresa *Kcnq4*.

En ausencia de expresión de *Kcnq4* en los animales KO, el perfil de expresión de las demás subunidades se modificó. Mediante la comparación de los RQ de animales WT y KO para las distintas subunidades, se observó un aumento de ~30 veces para la expresión del ARNm de *Kcnq3* (prueba t de Student, $p = 0,0032$), mientras que *Kcnq2* y *-5* no mostraron diferencias en su nivel de expresión (**Figura 58B**). Estos resultados indican que la expresión de *Kcnq4* modularía la expresión de, al menos, *Kcnq3*, modificándose el perfil de expresión y, por ende, las propiedades cinéticas de la I_M .

Figura 58: Expresión del ARNm de *Kcnq2-5* en el PPN. **A)** Cuantificación relativa al endógeno del ARNm *Kcnq2-5* en el PPN de animales WT (ANOVA de una vía, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $n=3$). **B)** Cuantificación relativa (RQ) del ARNm de *Kcnq2-5* en el PPN de animales WT (naranja) y KO (azul) (Media \pm SD, t de Student, $**p = 0,0032$, $n=3$, para cada genotipo).



o [Expresión de las proteínas KCNQ en el PPN.](#)

Se analizó la presencia y localización de las subunidades neuronales KCNQ en el PPN (KCNQ2,-3,-4 y-5) mediante IF. Para ello se extrajeron cerebros enteros de animales WT y KO, se fijaron con PFA 4% y se cortaron en criostato, para finalmente realizar sobre dichas secciones protocolos de IF (Ver: [Inmunofluorescencia sobre rebanadas de cerebro](#)). Las

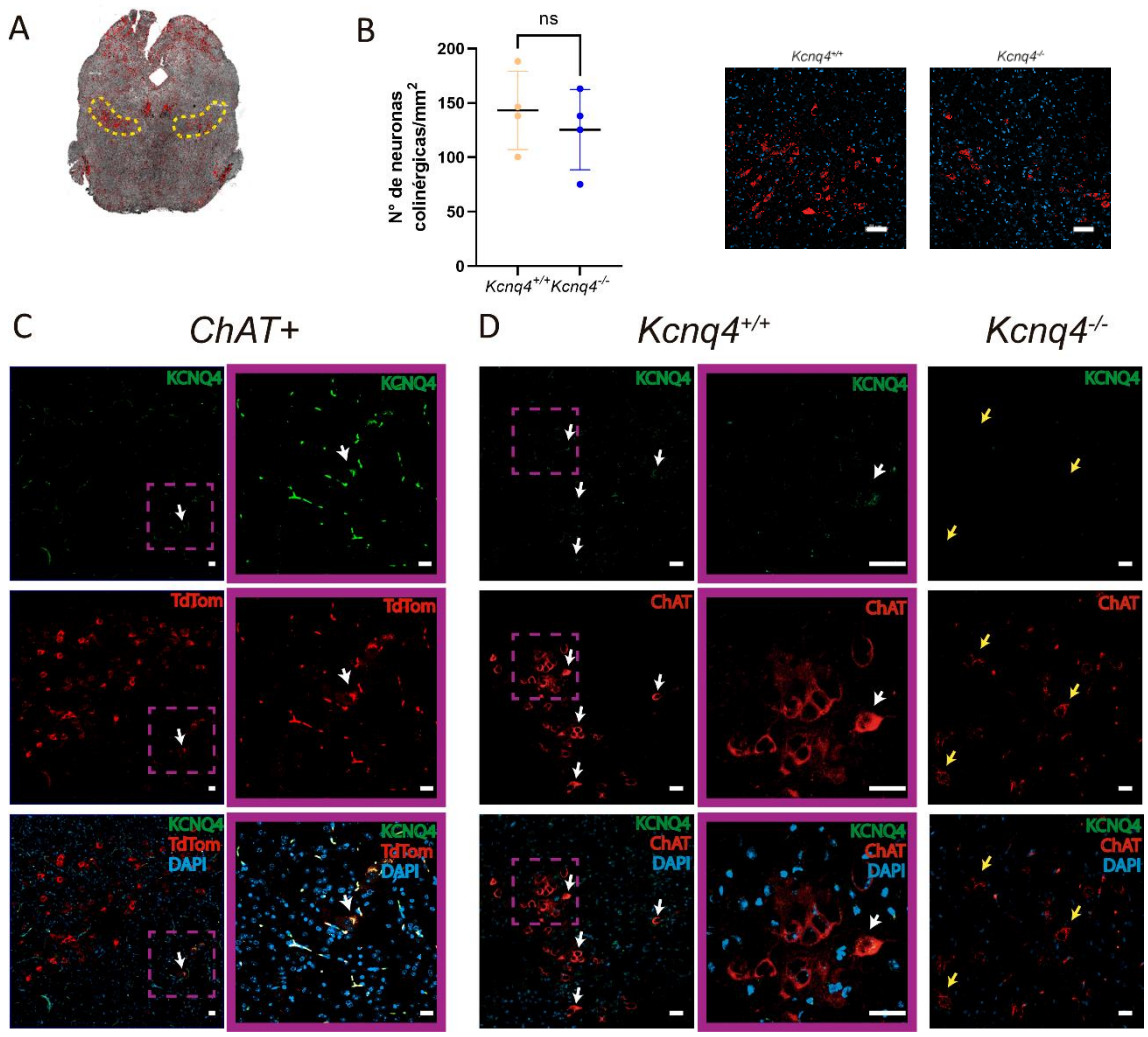
mismas fueron de tipo indirectas, es decir, las muestras fueron sometidas a dos pasos de incubación: primero, con el anticuerpo primario y luego, con el secundario acoplado a un fluoróforo. Esta técnica posee mayor sensibilidad con respecto a la IF directa, en la cual se emplean anticuerpos primarios acoplados a los fluoróforos. A su vez, se emplearon técnicas de amplificación de la señal para revertir el enmascaramiento de los epítomos (Im et al., 2019).

Las neuronas colinérgicas se identificaron mediante el uso del anticuerpo anti-colinacetiltransferasa (anti-ChAT), en ratones WT y KO, o directamente pudieron visualizarse en el modelo *ChAT-tdTomato* (Ver: [Ratones](#)), que expresa la proteína fluorescente tdTomato en neuronas colinérgicas (**Figura 59A**). A partir de los preparados obtenidos, se generaron imágenes de fluorescencia mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 900, Airyscan 2). Aquellas neuronas en las que se detectó fluorescencia el anti-ChAT se asumieron de identidad colinérgica. Tanto las neuronas de los animales *ChAT-tdTomato*, como aquellas que fueron marcadas mediante IF, mostraron una señal robusta en el PPN, correspondiente con una densidad de aproximadamente 140 neuronas/mm² en dicho núcleo (**Figura 59A, B**).

Por otro lado, sólo en una baja proporción de neuronas colinérgicas del PPN se detectó expresión de KCNQ4. Se determinó en secciones de PPN de animales WT mediante recuento celular manual que, la proporción de neuronas colinérgicas del PPN KCNQ4-positivas fue de $9,0 \pm 4,8\%$ ($n = 8$), lo que es consistente con el resultado encontrado en la expresión del ARNm, donde se determinó que *Kcnq4* se encuentra en bajos niveles de expresión en el PPN de animales WT.

La subpoblación de neuronas colinérgicas que expresaban KCNQ4 se identificó en ubicaciones más caudales que rostrales, y no toda la población colinérgica exhibió marcación específica contra KCNQ4, solo subgrupos ubicados lateralmente (**Figura 59C, D**). Este patrón de expresión se observó en ambos modelos animales, tanto WT como *ChAT-tdTomato*. La señal de KCNQ4 estuvo ausente en secciones del PPN de animales KO (**Figura 59D**), sin embargo, el número de neuronas colinérgicas no difirió significativamente respecto a los animales WT (**Figura 59B**, $143,3 \pm 36,0/\text{mm}^2$ en WT y $125,5 \pm 36,9/\text{mm}^2$ en KO; $p = 0,5166$; $n = 4$ para cada genotipo).

Figura 59: Expresión de KCNQ4 en el PPN. **(A)** Imagen obtenida por microscopía confocal de un corte coronal del mesencéfalo ($-4,60$ mm desde bregma), que muestra la ubicación del PPN (línea discontinua amarilla) determinada por marcación de ChAT sobre neuronas colinérgicas. **(B)** Izquierda: Cuantificación del número de neuronas colinérgicas identificadas en secciones de PPN de animales WT (naranja) y KO (azul). Derecha: IF de ChAT en secciones coronales de cerebros *Kcnq4*^{+/+} y *Kcnq4*^{-/-}, empleadas para el recuento manual de neuronas colinérgicas (Escala: 20 μ m). **(C-D)** IF de KCNQ4 en secciones coronales del cerebro de ratones *ChAT-tdTomato* (*ChAT*⁺; C), WT (*Kcnq4*^{+/+}; D) y KCNQ4 KO (*Kcnq4*^{-/-}; D). Ambos modelos revelaron que sólo una subpoblación de neuronas colinérgicas de PPN ubicadas en los límites externos posee KCNQ4 (flechas blancas). Mayor aumento de las neuronas positivas para KCNQ4 (cuadrado morado). No se pudo detectar KCNQ4 en las neuronas colinérgicas de PPN en animales KO (flechas amarillas), lo que confirmó la especificidad del anticuerpo. Panel superior: KCNQ4 (verde). Panel central: neuronas colinérgicas, identificadas con ChAT o expresión de tdTomato bajo el promotor ChAT (rojo). Panel inferior: imagen fusionada con DAPI. Escala: 20 μ m.



Como los ratones KO exhibieron un perfil de expresión génica alterado de las subunidades *Kcnq* en el PPN, se investigó más a fondo el patrón de expresión de las proteínas KCNQ2, -3 y -5 mediante IF. En animales WT, se observó la expresión de KCNQ2 en fibras neuronales del PPN. Sin embargo, su localización fue diferente a la de las neuronas colinérgicas (**Figura 60A**). Por el contrario, KCNQ3 marcó la mayoría de las neuronas colinérgicas del PPN, observándose una tinción clara en el soma neuronal. Además, KCNQ3 marcó algunas neuronas no colinérgicas. Finalmente, observamos tinción con KCNQ5 en neuronas colinérgicas (**Figura 60A**, flechas amarillas), pero también está presente en ciertas neuronas no colinérgicas (**Figura 60A**, flechas blancas). En animales KO, la tinción con KCNQ2 y 5 en el PPN no mostró diferencias ni en la localización ni en la intensidad de la señal con el WT (**Figura 60B**). Sin embargo, observamos un cambio en el patrón de expresión de KCNQ3 en animales KO. Si bien todavía está presente en algunas neuronas colinérgicas de la PPN (**Figura 60B**, flechas amarillas), el número de neuronas no colinérgicas marcadas aumenta drásticamente (**Figura 60B**, flechas blancas). Los experimentos de control negativo en ausencia del anticuerpo primario no mostraron ninguna señal de fluorescencia correspondiente al anticuerpo KCNQ2, KCNQ3 o KCNQ5 en las secciones de cerebro (**Figura 61**).

De acuerdo a estos resultados, existe un perfil de expresión diferencial para las subunidades KCNQ2-5 en el PPN, y una alteración de este patrón en las neuronas de dicho núcleo tras la eliminación de la subunidad KCNQ4 en el animal KO, afectando principalmente la expresión de la subunidad KCNQ3. Este cambio se observó tanto a nivel de expresión de la proteína como de la expresión génica.

Figura 60: Expresión de las subunidades neuronales KCNQ2, KCNQ3 y KCNQ5 en secciones coronales del PPN de ratones WT (*Kcnq4^{+/+}*, A) y KO (*Kcnq4^{-/-}*, B). KCNQ2 se encontró en fibras neuronales sin colocación en neuronas colinérgicas. KCNQ3 y KCNQ5 se ubicaron en el soma de neuronas colinérgicas (flechas amarillas) y no colinérgicas. Para KCNQ2 y KCNQ5, no hubo diferencias entre los genotipos. Además, KCNQ3 en animales KO marcó en su mayoría neuronas no colinérgicas (flechas blancas). Panel superior: subunidad KCNQ (verde). Panel central: ChAT (rojo). Panel inferior: fusionado con DAPI. Escala: 20 μm .

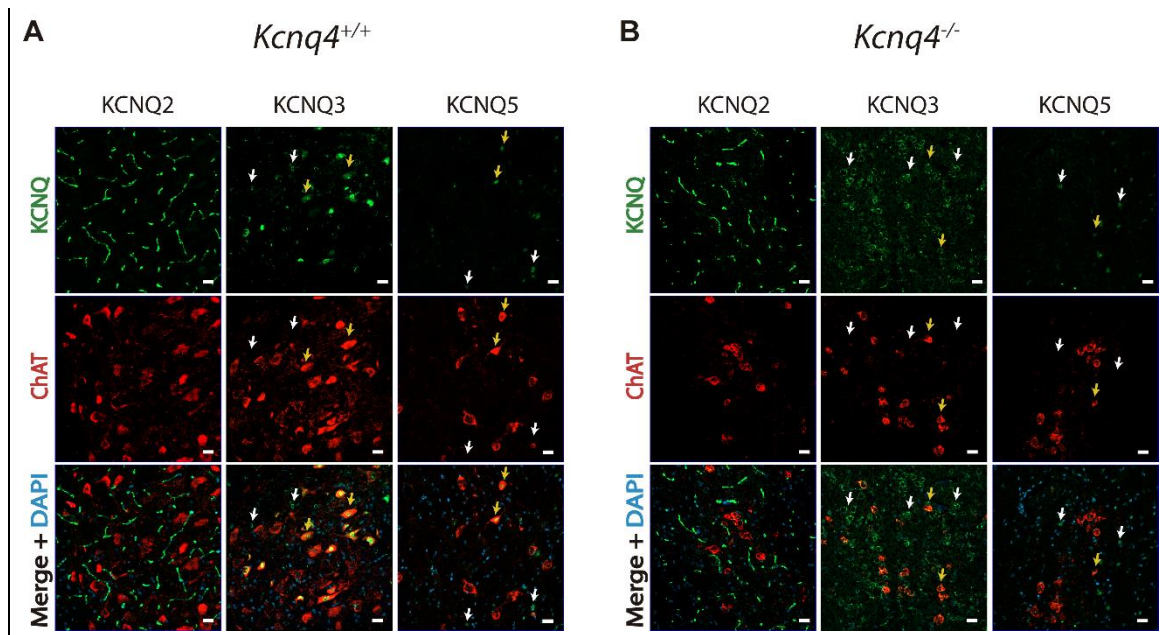
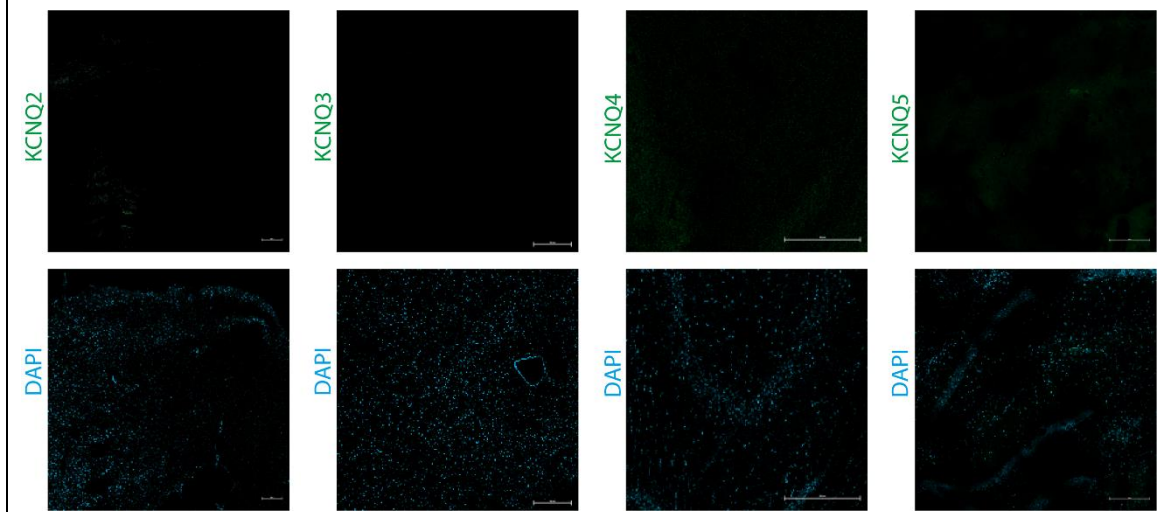


Figura 61: Control negativo de las IF de KCNQ2-5 en rebanadas de cerebro. En ausencia del anticuerpo primario no se observó ninguna señal de fluorescencia correspondiente a los anticuerpos KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 o KCNQ5 en las secciones de cerebro.



o Corriente M y excitabilidad de las neuronas del PPN

Dado que se encontró que las subunidades KCNQ exhibieron alteraciones en su expresión en el animal KO, y que previamente se había reportado la presencia de I_M en las neuronas colinérgicas del PPN de animales WT (Bordas et al., 2015), se continuó con el estudio de las propiedades eléctricas de las neuronas del PPN en animales WT y KO.

Mediante ensayos de *whole-cell patch-clamp* en una configuración de *voltage-clamp* se estudió la presencia de I_M , mediada por los canales KCNQ, en neuronas del PPN. Para determinar la identidad de las mismas, se marcaron las neuronas registradas con biocitina para luego verificar su naturaleza colinérgica mediante inmunohistoquímica *post-hoc* con anti-ChAT.

Para obtener los registros de I_M se utilizó un protocolo de *voltage-clamp* clásico para este fin, en el cual las neuronas se mantuvieron a un potencial fijo despolarizante de -20 mV. Los distintos canales iónicos se abren a ese potencial de membrana y, la mayoría de ellos, se cierran por inactivación rápidamente, cesando las corrientes iónicas. En ese punto puede distinguirse la I_M , ya que es una corriente de potasio no inactivante mediada por los canales KCNQ. La magnitud de la corriente se midió mediante pulsos repolarizantes, que favorecen el cierre de los canales iónicos. La I_M corresponde a la diferencia que existe entre la corriente instantánea y la corriente estacionaria final (Ver: [Electrofisiología en rebanadas de cerebro](#)).

Utilizando dicho protocolo, se determinó la presencia de I_M en las neuronas colinérgicas del PPN (**Figura 62A**) y su ausencia en neuronas no colinérgicas (GABAérgicas y glutamatérgicas) de dicho núcleo (**Figura 62B**).

Se encontró que la I_M fue significativamente menor en neuronas colinérgicas de los animales KO que en los animales WT (**Figuras 62A, C**). Los valores medios fueron $175,97 \pm 27,67$ pA para los animales WT y, $66,95 \pm 19,80$ pA para los animales KO ($p = 0,0060$). Cabe destacar que estos valores representan el promedio de los valores de corrientes para cada genotipo. Se determinó que la I_M estaba ausente (es decir que, se registraron valores de corriente menores a 10 pA a -40 mV) en el 62,5% de las muestras KO, mientras que en los animales WT sólo estuvo ausente en el 7,7% (1 de 13 neuronas evaluadas) de los casos (**Figura 62C**). A pesar de la ausencia de KCNQ4 en los animales KO, en el 37,5% de los casos (3 de 8 neuronas colinérgicas evaluadas) se registró I_M . Esto reflejó que existen en el PPN dos poblaciones neuronales colinérgicas, una que posee I_M , y otra que carece de ella.

La I_M ejerce una importante acción sobre la adaptación de la frecuencia de gatillado de las neuronas (SFA), que es un fenómeno en el que la frecuencia de disparo de una neurona en respuesta a un estímulo constante disminuye con el tiempo, es decir que, se va enlenteciendo la descarga de potenciales de acción consecutivos en el tren de espigas (o *spike train*) de una neurona. Este efecto de la I_M sobre la SFA puede medirse mediante la determinación del índice de adaptación (AI) (Ver: [Electrofisiología en rebanadas de cerebro](#)).

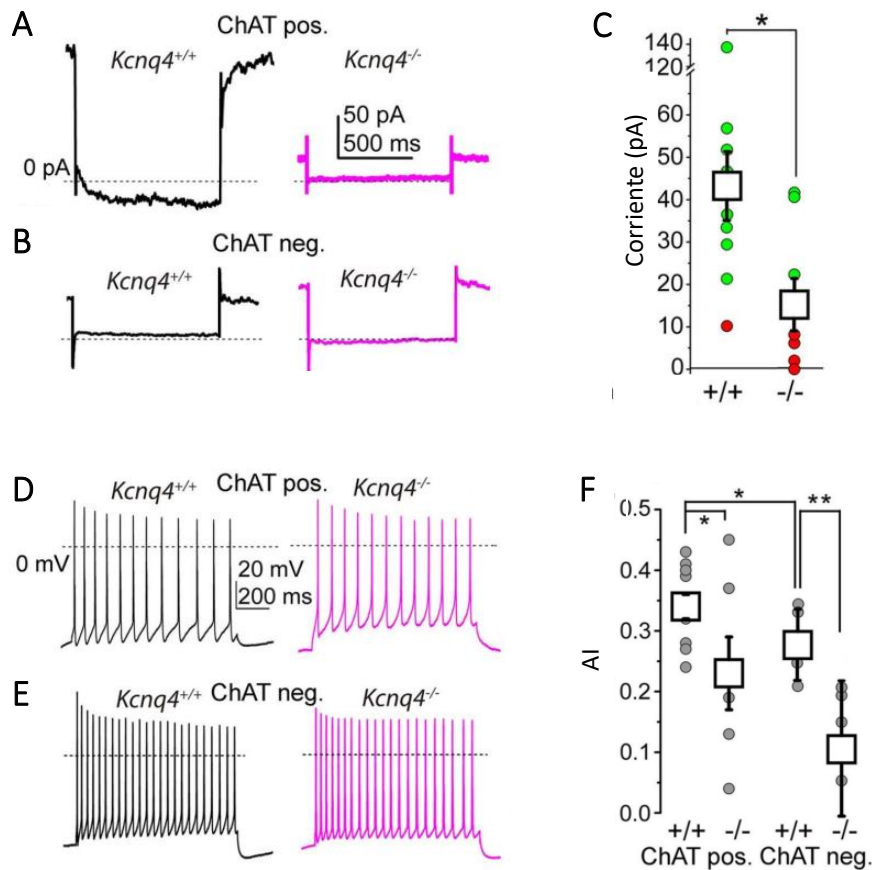
Se analizó entonces si la ausencia de una I_M mediada por KCNQ4 puede afectar la SFA, mediante el cálculo del índice de adaptación (AI). Para ello fue necesario determinar las propiedades del tren de espigas, para lo que se utilizó una configuración de *current-clamp*. Este protocolo permite determinar la diferencia de voltaje a través de la membrana celular producto del disparo de potenciales de acción tras inyecciones de corriente cuadrada despolarizante en la neurona (Ver: [Electrofisiología en rebanadas de cerebro](#)). Una vez obtenido el tren de espigas, a partir de este se calculó el AI, tanto para neuronas colinérgicas (ChAT positivas) como no colinérgicas (ChAT negativas).

Las neuronas colinérgicas de los animales WT presentaron un tren de espigas en el cual se observó un enlentecimiento en el gatillado de potenciales de acción en el tiempo, generando AI relativamente altos (**Figura 62D**). En cambio, los AI de los animales KO fueron significativamente más bajos que los de los WT ($0,28 \pm 0,06$ en WT y $0,11 \pm 0,11$ en KO, $p = 0,0094$), demostrando que en el caso de los animales KO no hay una adaptación a la frecuencia de gatillado ante un estímulo constante. Los AI de las neuronas no colinérgicas (que carecen de I_M) fueron significativamente más bajos que los de las colinérgicas (**Figuras 62D, F**), lo que refleja la importancia de la I_M para esta propiedad neuronal. Sorprendentemente, al analizar los AI de neuronas no colinérgicas de animales KO se encontró que estos disminuyen significativamente, aún más que para las neuronas colinérgicas. Esto indicaría que la ausencia de KCNQ4 altera la modulación de la excitabilidad de neuronas no colinérgicas (**Figura 62E, F**).

En resumen, estos experimentos demostraron que KCNQ4 es una subunidad importante en el subconjunto de neuronas colinérgicas del PPN que posee la I_M , a pesar de su bajo

nivel de expresión. Su ausencia impacta en el patrón de activación neuronal al cambiar la SFA en neuronas colinérgicas y no colinérgicas.

Figura 62: Ensayos de electrofisiología sobre rebanadas de PPN.



A) Registros de corriente representativos de neuronas colinérgicas de una muestra WT ($Kcnq4^{+/+}$, negro) y KO ($Kcnq4^{-/-}$, fucsia), generados por una repolarización de 1s desde -20 a -40 mV. **B)** Registros de corriente representativos de neuronas no colinérgicas de una muestra WT ($Kcnq4^{+/+}$, negro) y KO ($Kcnq4^{-/-}$, fucsia), generados por una repolarización de 1s desde -20 a -40 mV. En las neuronas no colinérgicas (ChAT negativas) no se detectó I_M en animales WT ni en KO ($n = 5$ para cada genotipo). **C)** Comparación estadística (Media \pm SD) de la corriente de relajación de las neuronas colinérgicas a -40 mV de las muestras WT ($+/+$; $n = 13$) y KO ($-/-$; $n = 8$) (verde: I_M existe; rojo: no se detectó I_M). Dicha corriente de relajación fue de $42,57 \pm 7,95$ pA para los animales WT y $14,85 \pm 6,12$ pA para los animales KO (* $p = 0,0133$). **D)** Registros de voltaje representativas de neuronas colinérgicas, obtenidos a partir de muestras WT ($Kcnq4^{+/+}$, negro) y KO ($Kcnq4^{-/-}$, fucsia), generados por la inyección de pulsos de 1 s de corriente cuadrada de 100 pA de amplitud.

E) Registros de voltaje representativas de neuronas no colinérgicas, obtenidos a partir de muestras WT (*Kcnq4*^{+/+}, negro) y KO (*Kcnq4*^{-/-}, fucsia), generados por la inyección de pulsos de 1 s de corriente cuadrada de 100 pA de amplitud. F) Comparación estadística (Media ± SD) del índice de adaptación de las neuronas colinérgicas (ChAT pos.) y no colinérgicas (ChAT neg.) de las muestras WT (+/+) y KO (-/-). Para las células colinérgicas, los AI fueron 0,34 ± 0,02 en los ratones WT y 0,23 ± 0,04 en los ratones KO (*p = 0,0399; n = 6 para KO y n = 9 para WT). Para las células no colinérgicas, los AI fueron 0,28 ± 0,06 en los ratones WT y 0,11 ± 0,11 en los ratones KO (**p = 0,0094; n = 5 para ambos genotipos).

o Ciclo sueño-vigilia

Una vez determinada la presencia de KCNQ4 en el PPN, se buscó determinar si dicho canal de potasio cumple un rol funcional en el RAS, particularmente si contribuye a la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Para ello, se evaluó la actividad locomotora circadiana en animales WT y KO (n = 15 WT, n = 13 KO), dejando correr de manera voluntaria a los ratones en una rueda, y se cuantificó la velocidad de giro y el tiempo durante el que estuvieron en actividad en la rueda; a partir de ello se obtuvieron actogramas. Luego, se calculó la distancia recorrida y el tiempo total de actividad. Los ratones estuvieron bajo ciclos de luz-oscuridad con períodos de 6 horas para cada fase (LDLD), que permitió verificar la integridad de la vía visual, tras generar una bifurcación en su ritmo circadiano (Harrison et al., 2016). Para poder estudiar el ritmo circadiano intrínseco de estos animales, se alteró su ciclo luz-oscuridad, para lo cual fueron sometidos a ciclos de oscuridad total (DD). Este ensayo permitió así evaluar la capacidad de los animales a adaptarse a los cambios ambientales de luz, que condicionan su ritmo circadiano.

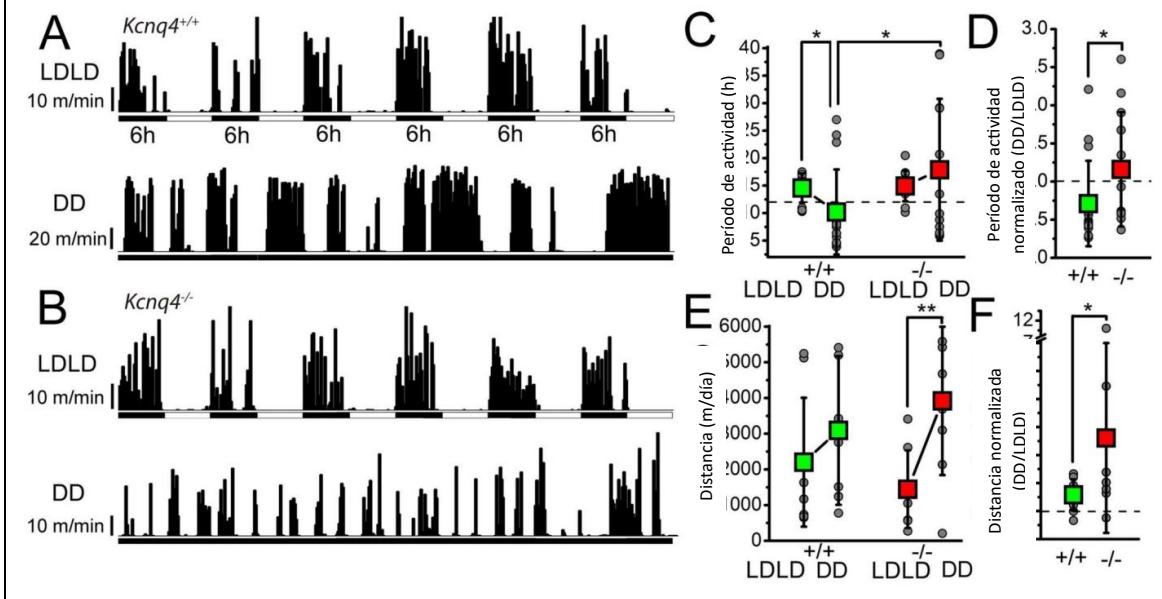
Los animales tuvieron acceso voluntario e ilimitado a la rueda para correr. Fueron colocados en una habitación durante 7 días para acomodar los períodos alternos de iluminación de 6 h y de oscuridad de 6 h. Después de dicha adaptación, se registró su actividad durante 5 días con las mismas condiciones de iluminación (LDLD). Después de eso, se registró la actividad en completa oscuridad (DD) durante 5 días. Sólo se analizaron los últimos 3 días de grabaciones.

Dado que los ratones son animales nocturnos, era esperable encontrar su actividad elevada en las fases de oscuridad, al menos si su función visual se encuentra normal. El actograma mostró episodios de mayor actividad durante las escotofases para cada genotipo en la condición LDLD (**Figuras 63A, B**), lo que manifiesta la integridad de las funciones relacionadas con la visión. El período de actividad (en horas) bajo las condiciones LDLD no mostró diferencias entre genotipos (**Figura 63C**). Tampoco existieron diferencias significativas en la distancia recorrida por día entre ratones WT y KO en condiciones LDLD (**Figura 63E**).

En la condición DD, el período de tiempo se redujo significativamente respecto a LDLD en ratones WT, pero en los KO se observó una tendencia a aumentar (**Figura 63C**). En cuanto a la distancia recorrida en DD, los ratones KO mostraron un aumento de aproximadamente el doble en la distancia recorrida en comparación con LDLD (**Figura 63E**). Al comparar ambos genotipos, el período de tiempo en oscuridad total fue significativamente más largo en ratones KO que en ratones WT (**Figura 63C**); la comparación de la distancia recorrida no fue estadísticamente significativa (**Figura 63E**). Al normalizar el período de actividad bajo condición DD sobre LDLD en cada caso, este parámetro fue significativamente mayor en los ratones KO (**Figura 63D**), y lo mismo ocurre al normalizar la distancia recorrida (**Figura 63F**). Los animales KO mostraron alteraciones en su ciclo de actividad ante cambios en las condiciones ambientales de luz. Por lo tanto, la ausencia de KCNQ4 en el KO parece tener un impacto detectable en la adaptación a los cambios en el ciclo de luz-oscuridad.

Figura 63: Rol de KCNQ4 en el ciclo sueño-vigilia. **A)** Ciclos de actividad registrados con un ratón WT (*Kcnq4^{+/+}*) bajo ciclos de luz-oscuridad con períodos de 6 horas (LDLD), y en completa oscuridad (DD). Las barras verticales representan la distancia recorrida en intervalos de 10 minutos. **B)** Ciclos de actividad bajo las mismas condiciones que en el panel (A) para el ratón KO (*Kcnq4^{-/-}*). **C)** Comparación estadística del período de tiempo (en horas) en las condiciones LDLD y DD para ratones WT (+/+, verde, n = 15) y KO (-/-, rojo, n = 13). Bajo condición LDLD, el período de tiempo no mostró diferencias entre genotipos (14,55 ± 2,64 h para WT, y 14,92 ± 2,77 h para KO). En DD, el período de tiempo para animales WT se redujo en comparación con LDLD (*p = 0,0242; 14,55 ± 2,64 en LDLD vs 10,2 ± 7,72 en DD). En ratones KO la comparación no fue estadísticamente significativa,

sin embargo, se observó una tendencia a que aumente el período de tiempo en DD ($14,92 \pm 2,77$ en LDLD vs $17,88 \pm 12,9$ en DD). La comparación del período de tiempo en condición DD entre ratones WT y KO mostró un aumento estadísticamente significativo para el KO (* $p = 0,0331$). La línea discontinua indica 12 h. **D**) Comparación estadística del período de actividad bajo condición DD normalizado a la condición LDLD entre ambos genotipos. Se observó un aumento del valor normalizado para los animales KO (* $p = 0,0461$; $0,71 \pm 0,56$ para el WT, y $1,15 \pm 0,76$ para el KO). **E**) Comparación estadística de la distancia recorrida en tres días (en m/día) en las condiciones LDLD y DD para ratones WT (+/+, verde, $n = 15$) y KO (-/-, rojo, $n = 13$). Bajo condición LDLD, no se encontraron diferencias entre genotipos (2.203 ± 1.804 m/día para WT, y 1.445 ± 1.088 m/día para KO). Tampoco se encontraron diferencias para los animales WT comparando LDLD y DD (2.203 ± 1.804 m/día y 3.091 ± 2.083 m/día, respectivamente). Para los ratones KO se registró un aumento en la distancia recorrida durante DD (** $p = 0,0049$; 1.445 ± 1.088 m/día para LDLD; 3.919 ± 2.075 m/día para DD). **F**) Distancia recorrida bajo la condición DD normalizada a LDLD para ambos genotipos. El valor normalizado fue mayor en animales KO que en WT (* $p = 0,0482$; $1,58 \pm 0,55$ para el WT, y $3,6 \pm 3,39$ para el KO).



DISCUSIÓN

La I_M es una corriente de potasio responsable de la hiperpolarización posterior al disparo de un potencial de acción y contribuye a establecer el potencial de membrana en reposo en varias regiones cerebrales (Madison & Nicoll, 1984), por lo que está involucrada en la regulación de la excitabilidad neuronal, y desempeña un papel importante en la determinación de la frecuencia de gatillado de potenciales de acción y su duración (David A. Brown & Passmore, 2009; Delmas & Brown, 2005). Sin embargo, no es mucho lo que se conoce sobre la importancia fisiológica de la I_M en las neuronas colinérgicas del PPN, así como tampoco qué subunidades KCNQ podrían ser responsables de la misma, dado que se desconocía cuáles de dichos canales de potasio se expresan en el PPN. La presencia de la I_M fue descrita en ciertos núcleos del RAS, como en el VTA y en los núcleos del rafe (Drion et al., 2010; Su et al., 2019; Zhao et al., 2017). A su vez, el grupo del Dr. Balazs Pal de la Universidad de Debrecen (Hungría) ya había reportado la presencia de I_M en las neuronas colinérgicas del PPN, y su ausencia en neuronas no colinérgicas de dicho núcleo (Bordas et al., 2015).

Entonces, en este trabajo de tesis, en primera instancia, se evaluó la expresión de los genes *Kcnq2-5* en el PPN de ratones WT de la cepa C3H mediante qPCR. Se demostró la expresión de todas las subunidades neuronales, siendo *Kcnq2* el que se encuentra mayormente expresado en el PPN, y *Kcnq4* el que presenta menor nivel de expresión. Luego, se evaluó la presencia de las proteínas KCNQ2-5 en el PPN de animales WT mediante IF. Los resultados obtenidos revelaron que la proteína KCNQ4 se expresa en una subpoblación de neuronas colinérgicas del PPN. También se encontró la expresión de KCNQ2 en fibras neuronales no colinérgicas de dicho núcleo, KCNQ3 se localizó principalmente en el soma de neuronas colinérgicas, y KCNQ5 fue identificado tanto en neuronas colinérgicas como no colinérgicas del PPN.

KCNQ2, KCNQ3 y KCNQ5 exhiben una alta expresión en el cerebro. KCNQ2 y KCNQ3 se ubican en el segmento inicial de los axones y en los nodos de Ranvier (Klinger et al., 2011). Trabajos recientes han identificado los canales KCNQ2, KCNQ3 y KCNQ5 en las dendritas de neuronas corticales prefrontales (Galvin et al., 2020). KCNQ5 también está presente

en la membrana postsináptica de las neuronas del hipocampo (Fidzinski et al., 2015), así como también en terminales presinápticos (H. Huang & Trussell, 2011). En esos terminales sinápticos también se ha identificado la presencia de KCNQ2 (Soh et al., 2022).

Las localizaciones más relevantes de KCNQ4 se encuentran en los sistemas sensorial y periférico (células ciliadas externas cocleares, DRG, corpúsculos de Merkel y Pacini) (Beisel et al., 2005; Carignano et al., 2019; Heidenreich et al., 2011; Kubisch et al., 1999). Sin embargo, también está localizado en el SNC, con un patrón más restringido en comparación con las otras subunidades. Se ha detectado su expresión en los núcleos auditivos del tronco del encéfalo y en el RAS (Kharkovets et al., 2000). Se determinó su presencia funcional en el VTA y los núcleos del rafe (McGuier et al., 2018; Su et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Como ya se mencionó, en esta tesis, utilizando diversas técnicas, se logró demostrar la presencia de la subunidad KCNQ4 también en el PPN. Se identificó en ubicaciones más caudales que rostrales, y no toda la población colinérgica exhibió marcación específica contra KCNQ4, sólo un subconjunto que representa aproximadamente el 9% de las neuronas colinérgicas del PPN. Este hallazgo es similar a lo mostrado anteriormente para el DRG (Heidenreich et al., 2011) y el rafe dorsal (Zhao et al., 2017), donde también sólo una fracción de las neuronas fue positiva para KCNQ4. Las neuronas colinérgicas que poseen KCNQ4 se ubican en el PPN caudal. Esta observación refuerza la opinión de que las neuronas del PPN están lejos de ser uniformes, sino que existen varios subgrupos funcionales en términos de propiedades de membrana (Baksa et al., 2019).

Además, el PPN rostral (*pars dissipata*) se diferencia de la parte caudal (*pars compacta*) en la conectividad eferente, ya que las neuronas colinérgicas ubicadas rostralmente se proyectan al cuerpo estriado dorso-lateral y a la sustancia negra *pars compacta*, mientras que las ubicadas caudalmente se proyectan al VTA y el cuerpo estriado dorso-medial (Martinez-Gonzalez et al., 2011). A su vez, las diferentes partes del PPN cumplen distintas funciones, ya que el PPN rostral está más involucrado en funciones motoras (Alderson et al., 2008; Mena-Segovia, 2016) mientras que el caudal desempeña un papel en el aprendizaje y la atención (Inglis et al., 2001; Wilson et al., 2009). Esto podría implicar que las neuronas colinérgicas que poseen KCNQ4 pueden contribuir a estas últimas funciones.

Para resumir, las diferentes subunidades KCNQ neuronales están presentes en el PPN a nivel de ARNm y proteína. Con la excepción de KCNQ2, las otras subunidades se ubicaron conjuntamente con la marcación del anticuerpo anti-ChAT (es decir, en neuronas colinérgicas). El canal heteromérico formado por la combinación de las subunidades KCNQ2 con KCNQ3 ha sido históricamente presentado como el principal responsable de la I_M (David A. Brown & Passmore, 2009; Soldovieri et al., 2011; Springer et al., 2021; H.-S. Wang et al., 1998). Los canales iónicos implicados en dicha corriente de potasio neuronal también pueden estar compuestos exclusivamente de subunidades KCNQ2 (homotetraméricos), o la combinación de las subunidades KCNQ2 con KCNQ5 (Soh et al., 2022), que a su vez puede combinarse con KCNQ3 o KCNQ4 o también funcionar como homotetrámero (H. Huang & Trussell, 2011; Jentsch, 2000; Schroeder et al., 2000; Shah et al., 2002). De acuerdo a los hallazgos de este trabajo, la ausencia de expresión de KCNQ2 en las neuronas colinérgicas del PPN, admite pensar que la I_M en este núcleo dependería de canales de potasio que estarían compuestos por KCNQ3/KCNQ4, KCNQ3/KCNQ5, o KCNQ4/KCNQ5.

Para evaluar la influencia de KCNQ4 sobre la I_M en el PPN, se utilizó un modelo murino que carece de la expresión de dicha subunidad (animal KO). Primero, se analizó mediante qPCR e IF si la ausencia de KCNQ4 afecta la expresión de las demás subunidades neuronales. En ratones KO, como se esperaba, la subunidad KCNQ4 desapareció tanto a nivel de ARNm como de proteína. Paralelamente a estos cambios, los niveles de *Kcnq2* y *Kcnq5* se mantuvieron sin alteración, pero *Kcnq3* se reguló en alza (*upregulation*). Además de las alteraciones encontradas en las expresiones de las subunidades KCNQ en animales KO, probablemente otros canales de potasio también se vieron afectados para compensar la ausencia de KCNQ4, tales como los canales sensibles a calcio BK y SK (Lezmy et al., 2017, 2020; Okada et al., 2003).

Se encontró que la I_M fue significativamente menor en las neuronas colinérgicas de los animales KO. Además, se determinó que la I_M estaba ausente en el 62,5% de las muestras KO, mientras que en los animales WT sólo estuvo ausente en el 7,7% de los casos. A pesar de la ausencia de KCNQ4 en los animales KO, en el 37,5% de los casos se registró I_M en las neuronas colinérgicas, probablemente debido a que dicha corriente se encuentra

mediada por otras subunidades KCNQ. El hecho de que los ratones KO cambiaran la expresión de KCNQ3 y, que una alta proporción de las neuronas colinérgicas carecieran de I_M , permite pensar la posibilidad de que KCNQ4 en el PPN forma heterómeros funcionales con KCNQ3 y/o KCNQ5. Para el caso de las neuronas no colinérgicas, a pesar del aumento de expresión de KCNQ3 en el animal KO, no se detectaron cambios en la I_M con respecto al WT, posiblemente porque la I_M mediada por homotetrámeros de KCNQ3 es muy pequeña (Okada et al., 2002).

La I_M ejerce una importante acción sobre la SFA, y ese efecto puede medirse mediante la determinación del AI. Tras la activación de la I_M , una neurona muestra un enlentecimiento en el gatillado ante un estímulo constante, que se refleja con un alto AI. Dicho índice en las neuronas no colinérgicas de ratones WT fue significativamente más pequeño que el de las colinérgicas, y esto puede atribuirse a la ausencia de I_M . Como se esperaba, la eliminación de la subunidad KCNQ4 redujo significativamente el AI de las neuronas colinérgicas, en las cuales la SFA entonces sería menor por la ausencia de I_M . Sin embargo, de forma imprevista, los AI también se redujeron significativamente en las neuronas no colinérgicas de los animales KO, a diferencia de lo que ocurrió con la I_M , que no sufrió cambios por la ausencia de KCNQ4. De hecho, el impacto de la ausencia de KCNQ4 fue mucho mayor sobre el AI de las neuronas no colinérgicas que sobre las colinérgicas. Tal vez, así como en el animal KO se modificó la expresión de *Kcnq3*, también se podrían ver afectados otros genes que codifican para canales iónicos que también condicionan la SFA.

Además de los canales de potasio tipo M (KCNQ), existen otros canales iónicos (de potasio, calcio y de cloruro) que también determinan el AI (Ha & Cheong, 2017), por lo que se puede suponer que la eliminación de KCNQ4 puede afectar la expresión y función de varios canales dependientes de voltaje. A su vez, la I_M puede ser efectivamente inhibida por la actividad colinérgica tras la activación de receptores muscarínicos de ACh (David A. Brown & Passmore, 2009). Parece factible entonces que la activación colinérgica del PPN, que proporciona axones colaterales locales para sí mismo, y recibe fibras colinérgicas del LDT, pueda tener un efecto sobre el AI de las neuronas colinérgicas de este núcleo (Honda & Semba, 1995; Lezmy et al., 2017; Mena-segovia et al., 2008). Además, al verse afectada la SFA, también se alteraría la sincronización de las poblaciones neuronales vecinas, que

es necesaria para la coordinación de numerosos procesos (Bordas et al., 2015; Leão et al., 2009; Roach et al., 2015, 2016).

El PPN, los núcleos del rafe y el VTA, como miembros del RAS, participan tanto en el ciclo sueño-vigilia como en la regulación del movimiento (MacLaren et al., 2018; McGuier et al., 2018; Mena-Segovia & Bolam, 2017; Monti, 2010; Su et al., 2019; Zhao et al., 2017). El PPN, particularmente, contribuye en la modulación de los ciclos de sueño-vigilia, así como también en la transición entre sueño no REM y REM (Mena-Segovia & Bolam, 2017). Las neuronas colinérgicas son las que facilitan la transición al estado de vigilia y al sueño REM (McCormick, 1989; Van Dort et al., 2015), y su descarga sostenida contribuiría a mantener el estado de vigilia (Petzold et al., 2015). A su vez, la subpoblación de neuronas glutamatérgicas del PPN tiene su actividad incrementada durante la vigilia y durante el sueño REM (Kroeger et al., 2017).

Alteraciones en los patrones de expresión de subunidades KCNQ han sido observados en diferentes tejidos, y se han vinculado con diversas patologías como hipertensión, tumores vasculares o degeneración de la retina, que a su vez contribuyen a modificaciones en las propiedades celulares (Caminos et al., 2015; Jepps et al., 2011; Serrano-Novillo et al., 2020). Un comportamiento similar se identificó al afectar la expresión de KCNQ4 en el PPN, que alteró la expresión génica y la localización de las otras subunidades KCNQ, y las propiedades eléctricas de las neuronas colinérgicas del PPN. Estas observaciones plantean la posibilidad de que KCNQ4 sea importante no sólo como una de las subunidades que integran la I_M , sino que también podría ser un regulador potencial de la expresión de otras subunidades KCNQ, influenciando la función fisiológica de las mismas. De acuerdo con esto, en este trabajo, se detectaron alteraciones de comportamiento relacionadas con las funciones del RAS en ratones que carecen de la expresión de KCNQ4. La ausencia de KCNQ4 provocó leves modificaciones en la adaptación del ritmo circadiano a los cambios de luz ambiental. La principal patología asociada al mal funcionamiento de KCNQ4 es la pérdida auditiva progresiva DFNA2. Particularmente, en ratones de 2 meses (edad de los animales que realizaron el test), ya existe una insipiente pérdida auditiva propia de la edad, que se profundiza por la ausencia de KCNQ4 en el órgano de Corti de los animales KO (Carignano et al., 2019). Sin embargo, dicha pérdida auditiva no es

prominente, por lo tanto, las acciones observadas en los ciclos de actividad se deben principalmente a la falta de la subunidad KCNQ4 en las estructuras del tronco del encéfalo, como el PPN, el VTA y los núcleos del rafe, que intervienen en la regulación de dichos ciclos (Su et al., 2019; Zhao et al., 2017).

En esta tesis se determinó que, en completa oscuridad, los ratones KO aumentaron el tiempo de actividad y la distancia recorrida, en comparación con los animales WT. En consecuencia, los ratones KO mostraron una menor capacidad para regular el ciclo de sueño-vigilia al cambiar de ciclos alternos de luz-oscuridad a oscuridad total, lo que sugiere una contribución de KCNQ4 a la regulación de las funciones del RAS. Estos resultados proponen que, además de la pérdida auditiva dominante y los cambios adicionales de la sensación táctil, existen otros síntomas potenciales para DFNA2. Los síntomas relacionados con alteraciones en los ciclos de sueño-vigilia y la regulación del movimiento también podrían estar presentes en pacientes con DFNA2, pero hasta el momento no han sido descritos.

Existen compuestos que son activadores de la I_M , ya que son abridores de los canales KCNQ, como la retigabina. Estos parecen un objetivo prometedor para el tratamiento de trastornos psiquiátricos (Costi et al., 2022; McGuier et al., 2018; Sotty et al., 2009; Su et al., 2019; Zhao et al., 2017). Particularmente, como KCNQ4 se expresa selectivamente en ciertos núcleos del tronco del encéfalo, abridores específicos de KCNQ4 podrían ser un objetivo farmacológico para la modulación selectiva del ciclo sueño-vigilia, así como para el tratamiento de la depresión, la anhedonia y ciertas adicciones como el alcoholismo (Hou et al., 2024; McGuier et al., 2018).

Además, en función de sus acciones en el PPN, estos abridores podrían afectar el ciclo sueño-vigilia, además de tener el potencial de retardar la progresión de enfermedades neurodegenerativas que afectan a las neuronas colinérgicas del PPN, como la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Parkinson (Chambers et al., 2020; MacLaren et al., 2018; Sébille et al., 2019). También podrían ayudar en la adaptación a alteraciones artificiales del ritmo circadiano (por ej., *jet lag* o viajes espaciales) (Brainard et al., 2016).

CONCLUSIONES

- ✓ Todas las subunidades KCNQ neuronales (KCNQ2-5) se expresan en el PPN.
- ✓ Particularmente, KCNQ4 cuya expresión en SNC es restringida, se expresa en el PPN. En dicho núcleo, regula la expresión de otras subunidades KCNQ.
- ✓ Aunque KCNQ4 no es la única subunidad KCNQ presente en el núcleo, tendría una contribución significativa a la función de la I_M .
- ✓ El PPN contribuye a regular el ciclo sueño-vigilia y la actividad motora, y la I_M dependiente de KCNQ4 allí presente podría tener un papel modulador en la adaptación de los ciclos de sueño-vigilia a los cambios ambientales.

CAPÍTULO 4: Estudio genético en pacientes con Síndrome de QT alargado: *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* en enfermedades cardíacas.

RESULTADOS

Este estudio genético, realizado por un laboratorio de investigación pública en Argentina, representa el primer informe de variaciones genéticas en el SQTl dentro de la población argentina. Esta iniciativa no solo facilita la identificación temprana de esta enfermedad cardíaca, que puede ser potencialmente mortal si no se detecta y trata adecuadamente, sino que también destaca la importancia de acercar la investigación básica al ámbito hospitalario y, principalmente, a la población. Este enfoque integrado entre investigación y atención médica demuestra cómo la ciencia puede tener un impacto directo y positivo en la sociedad al mejorar los estándares de diagnóstico y tratamiento, salvaguardando así la salud y el bienestar de la población.

- Población analizada

Se realizó un análisis genético en una cohorte de pacientes diagnosticados con SQTl. El Servicio de Electrofisiología Cardíaca del Hospital Privado del Sur se encargó de seleccionar los casos con diagnóstico clínico de SQTl para realizar el análisis molecular. Fueron escogidos así 5 individuos (hombres y mujeres) con edades comprendidas entre 8 y 62 años, que mostraron un intervalo QTc alargado, es decir, mayor a 460 ms. Al estudio se sumó un sexto paciente de 3 meses de edad, que presentaba un intervalo QTc normal (<450 ms), pero era familiar de primer grado de uno de los individuos con diagnóstico clínico. La **Tabla 16** resume la historia clínica de los individuos, aportando la información permitida de acuerdo a los contratos de confidencialidad establecidos. Como población de control, se estudiaron 5 individuos sanos no relacionados, con el mismo rango de edad.

Tabla 16: Historia clínica de los individuos estudiados.

Caso	Sexo	Edad (años)	Presentación	Arritmia	Intervalo QTc (ms)	Tratamiento
1	F	0.3	asintomático	No	<450	Ninguno
2	M	27	asintomático	No	510	β-bloqueantes (BB)
3	F	33	presíncope y taquicardia ventricular polimórfica	Si	460	BB + Ablación con catéter + Desfibrilador implantable
4	M	45	palpitaciones	Si	495	BB
5	M	8	asintomático	No	500	BB
6	F	62	bradicardia	No	480	BB

- Variantes alélicas encontradas

Una vez seleccionados los pacientes, se obtuvo una muestra de sangre de cada uno, a partir de la cual se aisló el ADN genómico, que se utilizó como molde para la amplificación de los exones codificantes de los genes de interés (*KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*) mediante PCR convencional, para su posterior secuenciación (Ver: [Estudio genético en pacientes con patologías cardíacas](#)). En la **Tabla 17** se resumen todas las variantes encontradas en cada caso, luego del procesamiento de las secuenciaciones mediante programas bioinformáticos específicos.

Vale aclarar que, se identificó como variante sinónima a aquellos cambios en la secuencia génica que no alteraron la secuencia de aminoácidos en la proteína codificada por ese gen. En otras palabras, esta variante cambia un nucleótido en el ADN, y así cambia un codón por otro codón que, debido a la redundancia del código genético, codifica para el mismo aminoácido. Aunque las variantes sinónimas no cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína, aún pueden tener efectos biológicos. Por ejemplo, podrían afectar la velocidad de traducción del ARNm, la estabilidad de ese mensajero o la unión

de factores de regulación de la traducción, lo que a su vez podría influir en la expresión génica o la función de la proteína en ciertos contextos.

A su vez, se identificó como variante con cambio de sentido, o variante no sinónima, a aquellas variantes en la secuencia de bases que causaron un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por ese gen. En este tipo de variante, una sola base del ADN se sustituye por otra, lo que resulta en la traducción de un aminoácido diferente en la proteína final. Las consecuencias de una variante con cambio de sentido pueden no tener un impacto significativo en la función de la proteína, como también puede afectar la estructura y función de la proteína, posiblemente alterando su actividad biológica.

Finalmente, se identificó como variante sin sentido, también conocida como variante de terminación, a aquellos cambios que causaron la sustitución de un codón de sentido (que codifica para un aminoácido) por un codón de terminación prematura o codón *stop* en la secuencia de ARNm. Este tipo de variante provoca la interrupción prematura de la traducción durante la síntesis de proteínas, lo que conduce a la producción de una proteína truncada o a la degradación del ARNm afectado. En la mayoría de los casos, las proteínas truncadas resultantes de las mutaciones sin sentido carecen de funciones biológicas significativas y pueden ser inestables o rápidamente degradadas por la célula.

– *Secuenciación de KCNQ1*

Se analizaron los exones 2 a 16 del gen *KCNQ1* (NM_000218.3) en los seis individuos seleccionados y en los sujetos control. El exón 1 no fue posible amplificarlo en ninguna muestra, dado que, es una zona en la cual la poca variabilidad de bases nitrogenadas dificulta el diseño de *primers* específicos que permitan una correcta hibridización.

Para este gen se detectó el cambio de la base G por A en la posición 1638 (c.1638G>A; p.Ser546=) en el exón 13 en los casos #2 y #6 (Tabla 17 y **Figura 64**). Sin embargo, este cambio en la secuencia génica no se tradujo en un cambio en la secuencia proteica, dado que codifica para el mismo aminoácido, que en este caso fue la serina. Por lo tanto, se trata de una variante sinónima. La misma se ubica a nivel intracelular, cerca del dominio

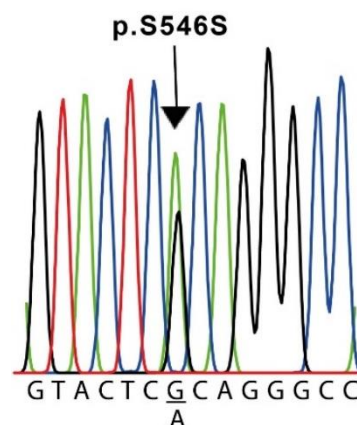
C-terminal del canal KCNQ1. En ambos casos, esta variante se encontró en heterocigosis, es decir que, en el electroferograma, se detectó una señal correspondiente a la base de referencia y una correspondiente a otra distinta, sugiriendo que existen dos copias diferentes del gen (**Figura 64**).

Para el caso #5 no fue posible amplificar, en las condiciones experimentales establecidas, el exón 16. Sin embargo, sí fue posible hacerlo en los otros cinco casos y las cinco muestras de control. Para descartar un problema con la muestra, se solicitó una nueva muestra de sangre del paciente. A su vez, para excluir la posibilidad de que los *primers* no se hibriden correctamente en la secuencia, se diseñó un segundo par ubicado unas bases antes y después en la secuencia. De todas maneras, no se pudo amplificar este exón en este individuo.

Se agregaron entonces al análisis dos familiares de primer grado del caso #5 (padre y hermana) para evaluar la misma variación. Se realizó la PCR para amplificar el exón 16, resultando positiva para ellos, y sin presentar ninguna variante genética tras su secuenciación.

Figura 64: recorte del electroferograma obtenido de la secuencia de nucleótidos de la variante c.1638G>A en el gen *KCNQ1*, encontrada en los casos #2 y #6.

En ambos pacientes se observó la presencia de dos picos que se corresponden con la señal de dos bases distintas en esa posición (flecha negra), indicando una configuración heterocigótica para dicha variante sinónima. La secuencia que se muestra corresponde a la cadena sentido del ADN del paciente #2.



– Secuenciación de *KCNH2*

Tras la secuenciación del exoma del gen *KCNH2* (NM_000238.4) y su respectivo análisis, se identificaron las variantes con cambio de sentido c.982C>T (p.Arg328Cys) en el exón 5 del caso #3, y c.2690A>C (p.Lys897Thr) en el exón 11 de los casos #2 y #6. La variante

K897T fue encontrada en homocigosis; se observó en el electroferograma de ambos pacientes un solo pico, correspondiente a la señal de una sola base (**Figura 65**). La variante R328C en heterocigosis. También se encontraron las variantes sinónimas c.1692A>G (p.Leu564=) en el exón 7 del caso #1, y c.1956T>C (p.Tyr652=) en todos los casos excepto en el caso #3 (Tabla 17).

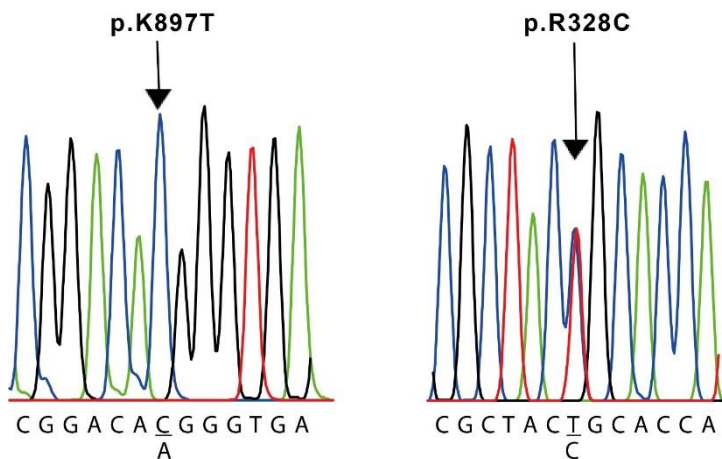


Figura 65: Recortes de electroferogramas de las secuencias de nucleótidos de variantes c.2690A>C y c.982C>T del gen *KCNH2*. Las secuencias que se muestran corresponden a la cadena sentido del ADNg de los casos #2 y #3, respectivamente.

– Secuenciación de *SCN5A*

La evaluación molecular del gen *SCN5A* (NM_000335.5) permitió identificar 7 variantes en la población estudiada (Tabla 17 y **Figura 66**), todas ellas localizadas en el dominio intracelular del canal:

- Variante sinónima c.87A>G (p.Ala29=) en el exón 2 de los casos #2, #4, #5 y #6.
- Variante no sinónima c.100C>T (p.Arg34Cys) en el exón 2 del caso #4.
- Variante sin sentido (de terminación) c.535C>T (p.Arg179Ter) en el exón 5 del caso #6.
- Variante no sinónima c.1673A>G (p.His558Arg) en el exón 12 de los casos #3 y #4.
- Variante sinónima c.5454T>C (p.Asp1818=) en el exón 28 del caso #2 y #4.
- Variante sinónima c.5841C>T (p.Ile1947=) en el exón 28 del caso #4.
- Variante sinónima c.3183A>G (p.Glu1061=) en el exón 17; se encontró en todos los casos excepto en el caso #4.

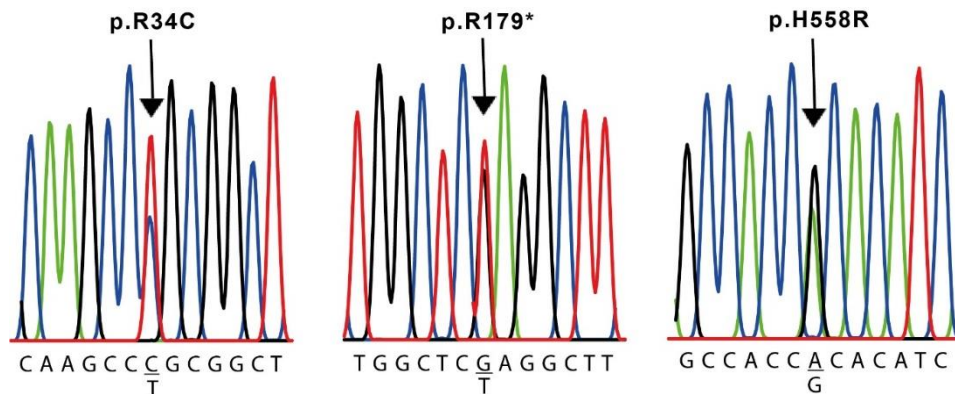


Figura 66: Recortes de electroferogramas de las secuencias de nucleótidos de variantes identificadas en el gen *SCN5A*. Todas las variantes mostradas se encontraron en heterocigosis, dado que se identificaron dos picos que se corresponden con la señal de dos bases distintas en esa posición (flechas negras). Las secuencias que se muestran corresponden a la cadena sentido del ADNg de los casos #4, #6 y #3, respectivamente.

Tabla 17:

Caso	Gen	Exón	Cambio de Nucleótido	Cambio de Aminoácido	Cigosidad	Interpretación ClinVar
#1	KCNQ1	-	-			-
	KCNH2	Exón 7	c.1692A>G	p.L564L	Htz	B
		Exón 8	c.1956T>C	p.Y652Y	Htz	B
	SCN5A	Exón 17	c.3183A>G	p.E1061E	Hmz	B
#2	KCNQ1	Exón 13	c.1638G>A	p.S546S	Htz	B
	KCNH2	Exón 8	c.1956T>C	p.Y652Y	Htz	B
		Exón 11	c.2690A>C	p.K897T	Htz	B
	SCN5A	Exón 2	c.87A>G	p.A29A	Htz	B
		Exón 17	c.3183A>G	p.E1061E	Hmz	B
		Exón 28	c.5454C>T	p.D1818D	Htz	B/LB
#3	KCNQ1	-	-	-	-	-
	KCNH2	Exón 5	c.982C>T	p.R328C	Htz	B/LB/US
	SCN5A	Exón 12	c.1673A>G	p.H558R	Htz	B/LB

		Exón 17	c.3183A>G	p.E1061E	Hmz	B
#4	KCNQ1	-	-	-	-	-
	KCNH2	Exón 8	c.1956T>C	p.Y652Y	Hmz	B
	SCN5A	Exón 2	c.87A>G	p.A29A	Hmz	B
			c.100C>T	p.R34C	Htz	B
		Exón 12	c.1673A>G	p.H558R	Htz	B/LB
		Exón 28	c.5454T>C	p.D1818D	Htz	B
c.5841C>T			p.I1947I	Htz	B	
#5	KCNQ1	Exón 16	n. a.	-	-	n. r.
	KCNH2	Exón 8	c.1956T>C	p.Y652Y	Hmz	B
	SCN5A	Exón 2	c.87A>G	p.A29A	Htz	B
		Exón 17	c.3183A>G	p.E1061E	Hmz	B
#6	KCNQ1	Exón 13	c.1638G>A	p.S546S	Htz	B
	KCNH2	Exón 8	c.1956T>C	p.Y652Y	Hmz	B
		Exón 11	c.2690A>C	p.K897T	Hmz	B
	SCN5A	Exón 2	c.87A>G	p.A29A	Htz	B
		Exón 5	c.535C>T	p.R179*	Htz	P/LP
		Exón 17	c.3183A>G	p.E1061E	Hmz	B

Referencias: n.a: no amplificado, n.r.: no reportado, Hmz: homocigota, Htz: heterocigota, B: benigna, LB: probablemente benigna, P: patogénica, LP: probablemente patogénica, US: significado incierto.

- Estructura tridimensional de las proteínas

Mediante el uso de métodos predictivos que se valen de programas computacionales se buscó determinar la estructura tridimensional de las proteínas humanas KCNQ1, hERG y Na_v1.5 (**Figura 67**), codificadas por los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*, respectivamente. Se realizó un modelado por homología, utilizando el servidor *online* SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org>) (Waterhouse et al., 2018). Los modelos de proteínas 3D

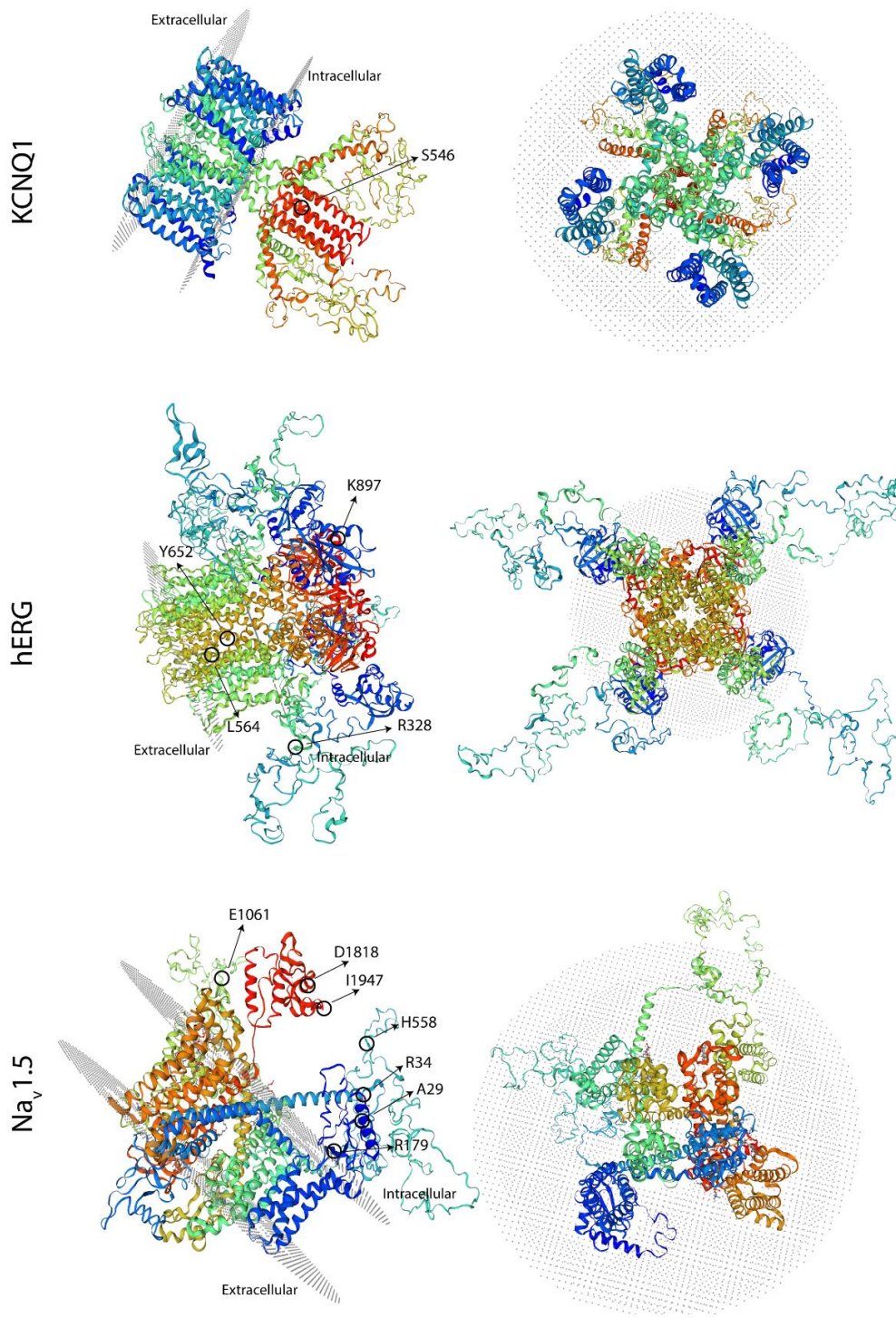
se generaron empleando como templatado las secuencias de aminoácidos FASTA para KCNQ1 (NP_000209.2), hERG (NP_000229.1) y Nav1.5 (NP_932173.1).

A partir de la estructura del canal KCNQ1, se pudo observar que la variante genética encontrada (S546S) codifica para el dominio intracelular de la proteína cercano al extremo C-terminal (**Figura 67**). Particularmente, para el caso de KCNQ1, la proteína modelada no incluye el área codificada por el exón 16 debido a limitaciones de resolución, por lo que no se pudo establecer el impacto de la posible delección de este exón (caso #5) sobre la estructura de la proteína.

Mediante la estructura tridimensional de hERG se identificó que la variante R328C localizada en la secuencia del exón 5 del gen *KCNH2*, se ubica en el dominio sensor de voltaje. Las variantes sinónimas L564L y Y652Y, se localizan en la región transmembrana en el dominio de conductancia del canal. Finalmente, la variante K897T identificada en el exón 11 del gen, codifica para la región intracelular próxima al extremo C-terminal de la proteína (**Figura 67**).

El modelado de Nav1.5 permitió determinar la localización de los polimorfismos encontrados para el gen *SCN5A*. Las variantes A29A y R34C, ambas localizadas en el exón 2 del gen, codifican para la región N-terminal del canal de sodio. La variante de terminación R179* localizada en el exón 5 se ubica en el S2 del dominio I. La variante H558R del exón 12 se ubicó en el interdominio I-II, y la E1061E del exón 17 en el interdominio III-IV. Las variantes sinónimas localizadas en el exón 28, D1818D y I1947I, codifican para la región posterior al dominio IV, en al extremo C-terminal. Todas las variantes identificadas codifican para la región intracelular de la proteína (**Figura 67**).

Figura 67: Estructura tridimensional de las proteínas KCNQ1, hERG y Na_v1.5, con las mutaciones encontradas en cada gen marcadas en la región afectada en cada caso. Panel izquierdo: vista lateral. Panel derecho: vista superior del lado extracelular. Las estructuras se encuentran orientadas en el espacio de forma tal que puedan visualizarse las variantes identificadas en cada una de ellas.



DISCUSIÓN

El SQTL congénito es el resultado de mutaciones genéticas que afectan a los canales iónicos que participan en el ciclo cardíaco, como los canales de potasio *KCNQ1* y *hERG*, y el canal de sodio *Nav1.5*. Estas canalopatías suelen asociarse con la aparición de arritmias graves, responsables del 40% de los casos de muerte súbita en personas menores de 40 años. Además, se estima que hasta un 10% de los neonatos con síndrome de muerte súbita infantil pueden ser desencadenados por esta patología (Abrams & Macrae, 2014; Arnestad et al., 2007; Curcio et al., 2017; Ioakeimidis et al., 2017; Napolitano et al., 2012; Schwartz et al., 2012). Esta sección de la tesis resultó de la colaboración con un grupo de médicos cardiólogos que contaban con el diagnóstico clínico del SQTL en un grupo de pacientes, cuyo objetivo era realizar su diagnóstico genético. Fue así que solicitaron abordar esta problemática, para dar un mejor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. De este trabajo surgió un vínculo entre la ciencia básica y la aplicada, siendo entonces este reporte no sólo un beneficio científico sino también un aporte significativo para la población.

El caso #1 mostró un ECG normal, pero ha sido incluida en el estudio debido a su relación de parentesco en primer grado con el caso #2. En la niña que corresponde al caso #1 sólo se detectaron variantes sinónimas. Particularmente, en el gen *KCNH2* se identificaron la variante L564L en el exón 7 y la variante Y652Y localizada en el exón 8, ambas clasificadas como benignas (Aydin et al., 2005; Iwasa et al., 2000; Song et al., 2011). Si bien los cambios detectados no representarían alteraciones patogénicas, se ha reportado que los cambios en esta posición generan un canal con pérdida de función, y generarían un defecto en el tráfico del canal que afecta el transporte intracelular (Keller et al., 2009). En el caso #1 también se detectó la variante sinónima benigna E1061E, en el exón 17 del gen *SCN5A*. Las variantes alélicas detectadas en este caso parecen no tener un efecto sobre el intervalo QT de la paciente, dado que su ECG no presentó alteraciones.

El caso #2 corresponde a un hombre joven con intervalo QT alargado en el ECG, pero asintomático. En este paciente se detectó la variante sinónima S546S (benigna y poco frecuente), localizada en el exón 13 del gen *KCNQ1*. Las mutaciones con pérdida de

función en *KCNQ1* se han asociado con el SQT (Aydin et al., 2005; F. Z. He et al., 2013). Sin embargo, el gen *KCNQ1* no sólo codifica para el canal dependiente de voltaje ubicado en los cardiomiocitos, sino también en las células β pancreáticas, y allí es fundamental para la regulación de la secreción de insulina, y esta es importante para la regulación del metabolismo de los lípidos (colesterol y triglicéridos). De hecho, la inhibición de *KCNQ1* en las células β aumenta la secreción de insulina (Torekov et al., 2014). La variante S546S en *KCNQ1* ha sido identificada en pacientes con SQT con alteraciones en los niveles de lípidos plasmáticos en la población china (X. dong Chen et al., 2012). A su vez, por su localización intracelular en el extremo C-terminal de la proteína, esta variante podría afectar el sitio de unión a calmodulina, y el ensamblaje de las subunidades para la tetramerización y conformación del canal funcional (Dixit et al., 2020; Kashiwa et al., 2024; Lipinsky et al., 2020).

En el caso #2 se detectaron también otras variantes sinónimas: Y652Y, para el gen *KCNH2*, y A29A, E1061E y D1818D, para *SCN5A*, todas ellas clasificadas como benignas (Iwasa et al., 2000; Magnani et al., 2014; Millat et al., 2009; Qureshi et al., 2015). A pesar de tratarse de variantes sinónimas, existe evidencia que indica que las mismas pueden afectar la estabilidad termodinámica de las estructuras secundarias del ARNm o afectar el empalme mediante fenómenos como la omisión de exones, teniendo consecuencias en la expresión funcional de las proteínas. Por lo tanto, las variantes sinónimas pueden no ser neutrales en la evolución (Carlini et al., 2001).

En el gen *KCNH2* también se detectó la variante con cambio de sentido K897T, localizada en el exón 11 del gen, clasificada como benigna pero también asociada con cambios cinéticos del canal y expresión reducida de la proteína hERG (Gouas et al., 2005; Paavonen et al., 2003; Sinner et al., 2008). Esta variante adquiere un perfil patogénico cuando se asocia a polimorfismos en *KCNQ1* (Bohnen et al., 2017; Gouas et al., 2005). Los canales hERG están regulados por la hormona tiroidea a través de la señalización PI3K. Esta variante crea un sitio de fosforilación para Akt, que revierte la regulación hormonal a través de la señalización PI3K e inhibe la actividad del canal, prolongando el intervalo QT (Gentile et al., 2008). Considerando que algunas de las variantes sinónimas identificadas son compartidas con el caso #1 (intervalo QT normal), posiblemente, su combinación con

la variante K897T sea responsable de la prolongación del intervalo QT observada en el caso #2.

El caso #3 corresponde a una mujer adulta joven con antecedentes médicos de presíncope y taquicardia ventricular polimórfica, que manifiesta una leve prolongación del intervalo QT en el ECG. A partir del estudio genético, en esta paciente se identificaron dos cambios en la secuencia de la proteína: el R328C en el gen *KCNH2* y el H558R en el gen *SCN5A*. Además de la variante sinónima E1031E en el exón 17 de *SCN5A*. A pesar de no estar asociadas a un estado patogénico, estas variantes han sido reportadas en individuos con alteraciones cardíacas (Gouas et al., 2005; Kawamura et al., 2009). Aunque la variante R328C no reduce la I_{Kr} ni altera la función del canal hERG (Anderson et al., 2006), fue reportada en un caso de Torsades de Pointes con dificultad respiratoria, disfunción ventricular izquierda e intervalo QT prolongado (Hinterseer et al., 2006). Además, se ha asociado con cambios en la conductancia cuando se co-expresa con la mutación R591H de *KCNQ1* (Grunnet et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que los residuos 326-345 ubicados en el dominio proximal de la proteína son necesarios para la modulación hormonal de hERG (mediada por receptores acoplados a PLC), por lo que mutaciones en los mismos modifican la activación del canal hERG, desacelerando su activación, y acelerando su desactivación (Alonso-Ron et al., 2009; Barros et al., 2012). La variante detectada entonces podría estar alterando la funcionalidad del canal mediante dicho mecanismo.

En el caso #3 también se identificó la variante H558R en el exón 12 del gen *SCN5A*. La misma se ha asociado con alteraciones en el tráfico intracelular (Gouas et al., 2005) y se ha reportado como un polimorfismo patogénico (Ackerman et al., 2004; Darbar et al., 2008). El residuo 558 se localiza en el conector entre los dominios DI y DII del canal Nav1.5 (Kapplinger et al., 2010), que puede ser un sitio para la metilación de arginina, que termina por afectar las propiedades del canal (Matsumura et al., 2017). Todos estos cambios pueden actuar sinérgicamente contribuyendo a la presentación clínica grave observada en este individuo.

El caso #4 corresponde a un hombre de mediana edad con antecedentes clínicos de arritmia y palpitations, en el cual se identificó un intervalo QT alargado en el ECG.

Presentó dos variantes no sinónimas en el gen *SCN5A* que codifica para el canal de sodio Nav1.5: R34C y H558R. El polimorfismo R34C está reportado como frecuente en población asiática y negra, aunque también se ha detectado entre hispanos (Ackerman et al., 2004). Está ubicado en el dominio N-terminal de la proteína (Kapplinger et al., 2010). Las mutaciones en el gen *SCN5A* asociadas con el SQTl generalmente causan un fenotipo de ganancia de función que resulta en una mayor entrada de Na⁺ al cardiomiocito durante el período de repolarización (T. Wang & Wehrens, 2012), sin embargo, esta variante se asocia con un cambio de pérdida de función. Las mutaciones de pérdida de función en *SCN5A* suelen conducir a niveles más bajos de expresión de *SCN5A* o a la producción de proteínas Nav1.5 defectuosas, y han sido principalmente ligadas al síndrome de Brugada (Wilde & Amin, 2018).

La variante H558R, como se mencionó anteriormente (caso #3), se asocia con alteraciones del tráfico intracelular. La coexpresión de estos dos cambios en el mismo individuo no se había informado antes. Particularmente, en este caso podría existir efecto sinérgico negativo al combinarse ambos cambios, que pueden contribuir a las manifestaciones clínicas que manifiesta el paciente. Este individuo, además, exhibió varias mutaciones sinónimas en los genes *KCNH2* (Y652Y) y *SCN5A* (A29A, D1818D e I1947I), todas ellas reportadas como benignas.

El caso #5 se trata de un individuo pediátrico asintomático, con antecedentes familiares de muerte súbita en un entorno deportivo, y que presenta un intervalo QTc prolongado. El análisis genético reveló variantes sinónimas en los genes *KCNH2* (Y652Y) y *SCN5A* (A29A y E1061E), y también un cambio no identificado en el exón 16 de *KCNQ1*, que es el último exón del gen. Esta alteración podría resultar de la delección del exón, o de una inserción lo suficientemente grande como para no poder ser amplificado mediante PCR. Cualquiera de estas posibilidades afectaría las propiedades funcionales del canal KCNQ1 (Schmitt et al., 2000). Se ha visto que pacientes jóvenes con delecciones en los exones 15 y 16 mostraron un intervalo QTc prolongado, donde el gen *KCNQ1* mutado codifica para una proteína truncada con pérdida de función (Ohno et al., 2013; Torrado et al., 2021). Además, un pequeño dominio entre los residuos 589 y 620 en la región C-terminal puede funcionar como un dominio de ensamblaje para las subunidades que conforman el canal.

Sin él, KCNQ1 no se ensamblaría y no se producirían canales funcionales. (Schmitt et al., 2000). Por otro lado, este exón codifica el sitio de interacción entre AKAP9 y KCNQ1, necesario para la regulación funcional del canal mediante fosforilación (L. Chen et al., 2007). Por tanto, por lo ya expuesto, la falta parcial o total del exón 16 en este individuo puede afectar la función del canal, y en consecuencia alterar la I_{Ks} en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco, causando la prolongación del intervalo QT. Un caso similar, con delección del exón 16, se reportó en un paciente adolescente que experimentó alargamiento del intervalo QT después del ejercicio físico (Ohno et al., 2013). Por los antecedentes familiares de este individuo, esta alteración del exón 16 podría tener implicaciones similares, por lo que el conocimiento sobre su condición le permitirá tomar medidas preventivas, principalmente en su vida deportiva. Cabe resaltar en este caso la importancia del estudio genético, donde se evidencia su utilidad para prevenir daños severos en los pacientes.

El caso #6 corresponde a una mujer que presenta bradicardia e intervalo QT alargado. Este individuo presentó variantes sinónimas, que también fueron identificadas en los casos previamente mencionados: S546S en *KCNQ1*, Y652Y en *KCNH2* y A29A y E1061E en *SCN5A*. Asimismo, se identificaron dos variantes que cambian la secuencia de la proteína: una variante no sinónima en el gen *KCNH2* (K897T) y una variante de terminación en *SCN5A* (R179*). Esta última inserta un codón de *stop* en el exón 5 del gen *SCN5A*, que codifica para el segmento transmembrana (Catterall, 2014; Kapplinger et al., 2010), generando una proteína truncada que carece de todos los dominios de poro, es decir que da como resultado canales no funcionales (Kawamura et al., 2009). Esta variante ha sido clasificada como patogénica/probablemente patogénica, y ha sido detectada en individuos con síndrome de Brugada y SQT (Kapplinger et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Le Scouarnec et al., 2015). Esta mutación provoca una pérdida de función y, por tanto, no es sería responsable de un fenotipo de QT largo (que necesita una ganancia de función de la proteína), sino que conduce a un posible fenotipo de síndrome de Brugada. Probablemente, la combinación de ambas mutaciones conduzca al desarrollo de un síndrome intermedio con características tanto del de Brugada como del SQT.

El análisis realizado en este trabajo permitió identificar variantes alélicas que podrían estar asociadas a las manifestaciones clínicas observadas en algunos individuos. Sin embargo, la técnica aquí empleada presenta limitaciones, entre ellas, que no se han analizado las regiones intrónicas de los genes seleccionados, y a su vez no se han incluido en el estudio la totalidad de genes vinculados al SQTL. Por lo tanto, en algunos pacientes los resultados obtenidos no pueden explicar completamente el cuadro clínico que manifiestan, y se requeriría en esos casos un estudio más profundo.

Para finalizar, entre los subtipos de SQTL no existen diferencias fenotípicas evidentes, tal vez sólo algunas características patognomónicas que pueden detectarse mediante un ECG. A su vez, en muchos casos los individuos son asintomáticos y no presentan alargamiento del intervalo QT hasta luego de un estímulo, como puede ser el deporte, llevando a arritmias graves e incluso muertes repentinas. Es por ello que el diagnóstico genético de esta patología es indispensable para prevenir dichas situaciones, más aún en los individuos que cuentan con antecedentes familiares. Además, hay que destacar la importancia de detectar variantes asociadas con alteraciones en la función de los canales iónicos cardíacos, ya que pueden crear un blanco vulnerable que, en presencia de desencadenantes específicos como los bloqueadores de I_{Kr} , puede precipitar arritmias ventriculares potencialmente mortales.

CONCLUSIONES

- ✓ El análisis de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* en los individuos estudiados permitió la detección de variantes genéticas tanto benignas como patogénicas. Entre los casos estudiados, a pesar de no identificarse variantes novedosas, las identificadas podrían asociarse con intervalos QT prolongados y los síntomas clínicos que presentan los individuos.
- ✓ Los resultados demuestran que la clasificación genética de los subtipos de SQTl no está determinada únicamente por una mutación patogénica en un único gen. Es más probable que se trate de una combinación de varios cambios en más de un gen, que desencadenan alteraciones en distintas proteínas implicadas en el ciclo cardíaco; esto explicaría el variado fenotipo observado en los pacientes con SQTl.
- ✓ El análisis genético de los casos sospechosos de SQTl, así como de sus familiares cercanos, puede proporcionar información valiosa para un diagnóstico preciso, asesoramiento genético y determinar las estrategias de tratamiento más adecuadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, G. W. (2020). KCNQs: Ligand- and Voltage-Gated Potassium Channels. *Frontiers in Physiology*, 11(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00583>
- Abidi, A., Devaux, J. J., Molinari, F., Alcaraz, G., Michon, F. X., Sutura-Sardo, J., Becq, H., Lacoste, C., Altuzarra, C., Afenjar, A., Mignot, C., Doummar, D., Isidor, B., Guyen, S. N., Colin, E., De La Vaissière, S., Haye, D., Trauffler, A., Badens, C., ... Aniksztejn, L. (2015). A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels. *Neurobiology of Disease*, 80, 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.017>
- Abrams, D. J., & Macrae, C. A. (2014). Long QT syndrome. *Circulation*, 129(14), 1524–1529. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003985>
- Ackerman, M. J., Splawski, I., Makielski, J. C., Tester, D. J., Will, M. L., Timothy, K. W., Keating, M. T., Jones, G., Chadha, M., Burrow, C. R., Stephens, J. C., Xu, C., Judson, R., & Curran, M. E. (2004). Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*, 1(5), 600–607. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2004.07.013>
- Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Al-Ahmad, A., & Wilde, A. A. M. (2014). Inheritable Potassium Channel Disease. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Sixth Edition* (Sixth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2856-5.00051-0>
- Alderson, H. L., Latimer, M. P., & Winn, P. (2008). A functional dissociation of the anterior and posterior pedunculopontine tegmental nucleus: Excitotoxic lesions have differential effects on locomotion and the response to nicotine. *Brain Structure and Function*, 213(1–2), 247–253. <https://doi.org/10.1007/s00429-008-0174-4>
- Alhamzah, S. A., Gatar, O. M., & Alruwaili, N. W. (2023). Effects of ketogenic diet on oxidative stress and cancer: A literature review. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 7, 100093. <https://doi.org/10.1016/J.ADCANC.2023.100093>
- Allen, A. S., Berkovic, S. F., Cossette, P., Delanty, N., Dlugos, D., Eichler, E. E., Epstein, M. P., Glauser, T., Goldstein, D. B., Han, Y., Heinzen, E. L., Hitomi, Y., Howell, K. B., Johnson, M. R., Kuzniecky, R., Lowenstein, D. H., Lu, Y. F., Madou, M. R. Z., Marson, A. G., ... Winawer, M. R. (2013). De novo mutations in the classic epileptic encephalopathies. *Nature*, 501(7466), 217. <https://doi.org/10.1038/NATURE12439>
- Alonso-Ron, C., Barros, F., Manso, D. G., Gómez-Varela, D., Miranda, P., Carretero, L., Domínguez, P., & De La Peña, P. (2009). Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 457(6), 1237–1252. <https://doi.org/10.1007/S00424-008-0599-X>
- American Psychiatric Association. (1980). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3 (DSM-III)*.

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5 (DSM-5)*.
- Amran, N. H., Zaid, S. S. M., Mokhtar, M. H., Manaf, L. A., & Othman, S. (2022). Exposure to Microplastics during Early Developmental Stage: Review of Current Evidence. *Toxics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/TOXICS10100597>
- Anderson, C. L., Delisle, B. P., Anson, B. D., Kilby, J. A., Will, M. L., Tester, D. J., Gong, Q., Zhou, Z., Ackerman, M. J., & January, C. T. (2006). Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation*, *113*(3), 365–373. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.570200>
- Anekwe, C. V., Chandrasekaran, P., & Stanford, F. C. (2020). Ketogenic Diet-induced Elevated Cholesterol, Elevated Liver Enzymes and Potential Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Cureus*, *12*(1). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.6605>
- Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T. O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Wang, D. W., Rhodes, T. E., George, A. L., & Schwartz, P. J. (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation*, *115*(3), 361–367. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.658021>
- Atladóttir, H. Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., & Parner, E. T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *40*(12), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/S10803-010-1006-Y/TABLES/4>
- Auestad, N., Korsak, R. A., Morrow, J. W., & Edmond, J. (1991). Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis by Astrocytes in Primary Culture. *Journal of Neurochemistry*, *56*(4), 1376–1386. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1991.TB11435.X>
- Aulbach, A. D., & Amuzie, C. J. (2017). Biomarkers in Nonclinical Drug Development. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, 447–471. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00017-7>
- Autism Spectrum Disorder (ASD)*. (2023). <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/autism-spectrum-disorder-asd#:~:text=Across the CDC surveillance sites,all racial and ethnic groups>.
- AVMA. (2020). *American Veterinary Medical Association guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition*. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Ayad, R. F., Assar, M. D., Simpson, L., Garner, J. B., & Schussler, J. M. (2010). Causes and Management of Drug-Induced Long Qt Syndrome. *Baylor University Medical Center Proceedings*, *23*(3), 250–255. <https://doi.org/10.1080/08998280.2010.11928628>
- Aydin, A., Bähring, S., Dahm, S., Guenther, U. P., Uhlmann, R., Busjahn, A., & Luft, F. C. (2005). Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *83*(2), 159–165. <https://doi.org/10.1007/S00109-004-0595-3>
- Baculis, B. C., Zhang, J., & Chung, H. J. (2020). The Role of Kv7 Channels in Neural Plasticity and Behavior. *Frontiers in Physiology*, *11*, 568667. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.568667/BIBTEX>
- Baier, C. J., Gallegos, C. E., Raisman-Vozari, R., & Minetti, A. (2017). Behavioral impairments

- following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, *64*(July), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.004>
- Baksa, B., Kovács, A., Bayasgalan, T., Szentesi, P., Kőszeghy, Á., Szücs, P., & Pál, B. (2019). Characterization of functional subgroups among genetically identified cholinergic neurons in the pedunculo-pontine nucleus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(14), 2799–2815. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03025-4>
- Bal, M., Zhang, J., Zaika, O., Hernandez, C. C., & Shapiro, M. S. (2008). Homomeric and Heteromeric Assembly of KCNQ (Kv7) K⁺ Channels Assayed by Total Internal Reflection Fluorescence/Fluorescence Resonance Energy Transfer and Patch Clamp Analysis. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(45), 30668–30676. <https://doi.org/10.1074/JBC.M805216200>
- Balfour, J. A., & Bryson, H. M. (1994). Valproic Acid: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in Indications Other than Epilepsy. *CNS Drugs*, *2*(2), 144–173. <https://doi.org/10.2165/000232110-199402020-00007>
- Bambini-Junior, V., Baronio, D., MacKenzie, J., Zanatta, G., Riesgo, R. dos S., & Gottfried, C. (2014). Prenatal Exposure to Valproate in Animals and Autism. *Comprehensive Guide to Autism*, 1779–1793. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4788-7_108
- Barañano, K. W., & Hartman, A. L. (2008). The Ketogenic Diet: Uses in Epilepsy and Other Neurologic Illnesses. *Current Treatment Options in Neurology*, *10*, 410–419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11940-008-0043-8>
- Barrese, V., Stott, J. B., Figueiredo, H. B., Aubdool, A. A., Hobbs, A. J., Jepps, T. A., Mcneish, A. J., & Greenwood, I. A. (2018). Angiotensin II Promotes KV 7.4 Channels Degradation Through Reduced Interaction With HSP90 (Heat Shock Protein 90). *90*, 1091–1100. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11116>
- Barrese, V., Stott, J. B., & Greenwood, I. A. (2018). *KCNQ-Encoded Potassium Channels as Therapeutic Targets*.
- Barrese, V., & Tagliatela, M. (2022). Kv7 . 2 and Kv7 . 3 potassium channel subunits as new central regulators of blood pressure. *Cardiovascular Research*, *118*, 345–346. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac009>
- Barros, F., Domínguez, P., & de la Peña, P. (2012). Cytoplasmic Domains and Voltage-Dependent Potassium Channel Gating. *Frontiers in Pharmacology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2012.00049>
- Battefeld, A., Tran, B. T., Gavrilis, J., Cooper, E. C., & Kole, M. H. P. (2014). Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. *Journal of Neuroscience*, *34*(10), 3719–3732. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4206-13.2014>
- Beisel, K. W., Rocha-Sanchez, S. M., Morris, K. A., Nie, L., Feng, F., Kachar, B., Yamoah, E. N., & Fritsch, B. (2005). Differential expression of KCNQ4 in inner hair cells and sensory neurons is the basis of progressive high-frequency hearing loss. *Journal of Neuroscience*, *25*(40), 9285–9293. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2110-05.2005>
- Bellini, S. (2004). Social skill deficits and anxiety in high functioning adolescents with autism spectrum disorders. *Focus on Autism and Other Developmental Disabilities*, *19*(2), 78–86.
- Ben-Bassat, A., Giladi, M., & Haitin, Y. (2020). Structure of KCNH2 cyclic nucleotide-binding

- homology domain reveals a functionally vital salt-bridge. *Journal of General Physiology*, 152(4). <https://doi.org/10.1085/JGP.201912505>
- Berkley, K. J. (1992). Vive la différence! *Trends in Neurosciences*, 15(9), 331–332. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90048-D](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90048-D)
- Besag, F. M. C. (2018). Epilepsy in patients with autism: links, risks and treatment challenges. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 1. <https://doi.org/10.2147/NDT.S120509>
- Bey, A. L., & Jiang, Y. hui. (2014). Overview of Mouse Models of Autism Spectrum Disorders. *Current Protocols in Pharmacology*, 66(1), 5.66.1-5.66.26. <https://doi.org/10.1002/0471141755.PH0566S66>
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstine, J. R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell*, 48(4), 491–507. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.11.006>
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Griebel, G. (1995). Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 9(2), 79–82. <https://doi.org/10.1177/026988119500900201>
- Bohnen, M. S., Peng, G., Robey, S. H., Terrenoire, C., Iyer, V., Sampson, K. J., & Kass, R. S. (2017). Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiological Reviews*, 97(1), 89. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00008.2016>
- Bokil, N. J., Baisden, J. M., Radford, D. J., & Summers, K. M. (2010). Molecular genetics of long QT syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2010.05.011>
- Bordas, C., Kovacs, A., & Pal, B. (2015). The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell type-specific way in the pedunculo-pontine nucleus of mice. *Front. Cell. Neurosci*, 9(121), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00121>
- Borgini, M., Mondal, P., Liu, R., & Wipf, P. (2021). Chemical modulation of Kv7 potassium channels. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(4), 483–537. <https://doi.org/10.1039/d0md00328j>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2016). *Medical Physiology*.
- Bough, K. J., & Rho, J. M. (2007). Anticonvulsant Mechanisms of the Ketogenic Diet. *Epilepsia*, 48(1), 43–58. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2007.00915.X>
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3)
- Brainard, G. C., Barger, L. K., Soler, R. R., & Hanifin, J. P. (2016). The development of lighting countermeasures for sleep disruption and circadian misalignment during spaceflight. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 22(6), 535–544. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000329>
- Brouns, F. (2018). Overweight and diabetes prevention: is a low-carbohydrate–high-fat diet recommendable? *European Journal of Nutrition*, 57(4), 1301–1312. <https://doi.org/10.1007/S00394-018-1636-Y/FIGURES/5>
- Brown, D. A., & Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283, 673–676.

<https://doi.org/10.1007/BF03335355>

- Brown, David A., & Passmore, G. M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*, *156*(8), 1185–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00111.x>
- Bruce, K. D., Zsombok, A., & Eckel, R. H. (2017). Lipid processing in the brain: A key regulator of systemic metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, *8*(APR). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2017.00060>
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattoli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, *165*(7), 1762–1775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, *7*(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Calimag, A. P. P., Chlebek, S., Lerma, E. V., & Chaiban, J. T. (2023). Diabetic ketoacidosis. *Disease-a-Month*, *69*(3), 101418. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2022.101418>
- Caminhotto, R. D. O., Komino, A. C. M., De Fatima Silva, F., Andreotti, S., Sertié, R. A. L., Boltes Reis, G., & Lima, F. B. (2017). Oral β -hydroxybutyrate increases ketonemia, decreases visceral adipocyte volume and improves serum lipid profile in Wistar rats. *Nutrition and Metabolism*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0184-4>
- Caminos, E., Vaquero, C. F., & Martinez-Galan, J. R. (2015). Relationship between rat retinal degeneration and potassium channel KCNQ5 expression. *Experimental Eye Research*, *131*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.12.009>
- Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., & Depino, A. M. (2018). Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Molecular Autism*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0221-9>
- Capozzi, M. E., Coch, R. W., Koech, J., Astapova, I. I., Wait, J. B., Encisco, S. E., Douros, J. D., El, K., Finan, B., Sloop, K. W., Herman, M. A., D'Alessio, D. A., & Campbell, J. E. (2020). The limited role of glucagon for ketogenesis during fasting or in response to SGLT2 inhibition. *Diabetes*, *69*(5), 882–892. <https://doi.org/10.2337/DB19-1216/-/DC1>
- Carignano, C., Barila, E. P., Rías, E. I., Dionisio, L., Aztiria, E., & Spitzmaul, G. (2019). Inner Hair Cell and Neuron Degeneration Contribute to Hearing Loss in a DFNA2-Like Mouse Model. *Neuroscience*, *410*, 202–216. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.012>
- Carlini, D. B., Chen, Y., & Stephan, W. (2001). The relationship between third-codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary structure and gene expression in the drosophilid alcohol dehydrogenase genes *Adh* and *Adhr*. *Genetics*, *159*(2), 623. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/159.2.623>
- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., & Leal, J. (2008). The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Current Cancer Drug Targets*, *8*(3), 187–198. <https://doi.org/10.2174/156800908784293659>
- Carver, C. M., Hastings, S. D., Cook, M. E., & Shapiro, M. S. (2020). Functional responses of the hippocampus to hyperexcitability depend on directed, neuron-specific KCNQ2 K⁺ channel plasticity. *Hippocampus*, *30*(5), 435–455. <https://doi.org/10.1002/hipo.23163>
- Castro, K., Baronio, D., Perry, I. S., Riesgo, R. dos S., & Gottfried, C. (2017). The effect of ketogenic diet in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Nutritional*

Neuroscience, 20(6), 343–350. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1133029>

- Castro, K., Faccioli, L. S., Baronio, D., Gottfried, C., Perry, I. S., & Dos Santos Riesgo, R. (2015). Effect of a ketogenic diet on autism spectrum disorder: A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 20, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2015.08.005>
- Catterall, W. A. (2014). Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 317–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232>
- Chambers, N. E., Lanza, K., & Bishop, C. (2020). *Pedunculopontine Nucleus Degeneration Contributes to Both Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson ' s Disease*. 10(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01494>
- Chapman, A., Keane, P. E., Meldrum, B. S., Simiand, J., & Vernieres, J. C. (1982). Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Progress in Neurobiology*, 19(4), 315–359. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(82\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(82)90010-7)
- Che, X., Hornig, M., Bresnahan, M., Stoltenberg, C., Magnus, P., Surén, P., Mjaaland, S., Reichborn-Kjennerud, T., Susser, E., & Lipkin, W. I. (2022). Maternal mid-gestational and child cord blood immune signatures are strongly associated with offspring risk of ASD. *Molecular Psychiatry*, 27(3), 1527–1541. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01415-4>
- Chechik, T., Roeder, L. M., Tildon, J. T., & Poduslo, S. E. (1987). Ketone body enzyme activities in purified neurons, astrocytes and oligodendroglia. *Neurochemistry International*, 10(1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(87\)90179-3](https://doi.org/10.1016/0197-0186(87)90179-3)
- Chen, D., Xu, M., Wu, B., & Chen, L. (2017). Histone deacetylases in hearing loss: Current perspectives for therapy. *Journal of Otology*, 12(2), 47–54. <https://doi.org/10.1016/J.JOTO.2017.04.002>
- Chen, L., Marquardt, M. L., Tester, D. J., Sampson, K. J., Ackerman, M. J., & Kass, R. S. (2007). Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20990–20995. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0710527105>
- Chen, X. dong, Yang, Y. jun, Li, S. yuan, Peng, Q. qian, Zheng, L. juan, Jin, L., & Wang, X. feng. (2012). Several polymorphisms of KCNQ1 gene are associated with plasma lipid levels in general Chinese populations. *PloS One*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034229>
- Cheng, P., Qiu, Z., & Du, Y. (2021). Potassium channels and autism spectrum disorder: An overview. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 81(6), 479–491. <https://doi.org/10.1002/jdn.10123>
- Chesler, E. J., Wilson, S. G., Lariviere, W. R., Rodriguez-Zas, S. L., & Mogil, J. S. (2002). Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(8), 907–923. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00103-3)
- Chokvithaya, S., Caengprasath, N., Buasong, A., Jantasuwana, S., Santawong, K., Leela-adisorn, N., Tongkobpetch, S., Ittiwut, C., Saengow, V. E., Kamolvisit, W., Boonsimma, P., Bongsebandhuphubhakdi, S., & Shotelersuk, V. (2023). Nine patients with KCNQ2-related neonatal seizures and functional studies of two missense variants. *Scientific Reports*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29924-y>

- Chomiak, T., Turner, N., & Hu, B. (2013). What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. *Patholog Res Int*, 2013, 712758. <https://doi.org/10.1155/2013/712758>
- Christensen, J., Grnøborg, T. K., Srøensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*, 309(16), 1696–1703. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2013.2270>
- Christensen, R., de la Torre-Ubieta, L., Bonni, A., & Colón-Ramos, D. A. (2011). A conserved PTEN/FOXO pathway regulates neuronal morphology during *C. elegans* development. *Development*, 138(23), 5257–5267. <https://doi.org/10.1242/dev.069062>
- Chung, N. (2023). Impact of the ketogenic diet on body fat, muscle mass, and exercise performance: a review. *Physical Activity and Nutrition*, 27(4), 1. <https://doi.org/10.20463/PAN.2023.0031>
- Ciaranello, A. L., & Ciaranello, R. D. (1995). The Neurobiology of Infantile Autism. *Annual Review of Neuroscience*, 18, 101–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.ne.18.030195.000533>
- Ciarlone, S. L., Grieco, J. C., D’Agostino, D. P., & Weeber, E. J. (2016). Ketone ester supplementation attenuates seizure activity, and improves behavior and hippocampal synaptic plasticity in an Angelman syndrome mouse model. *Neurobiology of Disease*, 96, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.002>
- Codding, S. J., Johnson, A. A., & Trudeau, M. C. (2020). Gating and regulation of KCNH (ERG, EAG, and ELK) channels by intracellular domains. *Channels*, 14(1), 294–309. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1816107>
- Costi, S., Han, M. H., & Murrough, J. W. (2022). The Potential of KCNQ Potassium Channel Openers as Novel Antidepressants. *CNS Drugs*, 36(3), 207–216. <https://doi.org/10.1007/S40263-021-00885-Y>
- Cotter, D. G., Schugar, R. C., & Crawford, P. A. (2013). Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304(8), 1060–1076. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00646.2012>
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13(2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)
- Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology*, 17(4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x>
- Crawley, J. N. (2012). Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(3), 293–305. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21284>
- Crotti, L., Odening, K. E., & Sanguinetti, M. C. (2020). Heritable arrhythmias associated with abnormal function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*, 116, 1542–1556. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa068>
- Cui, C., Zhang, L., Qian, F., Chen, Y., Huang, B., Wang, F., Wang, D., Lv, J., Wang, X., Yan, Z., Guo, L., Li, G. L., Shu, Y., Liu, D., & Li, H. (2022). A humanized murine model, demonstrating dominant progressive hearing loss caused by a novel KCNQ4 mutation (p.G228D) from a

- large Chinese family. *Clinical Genetics*, 102(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/CGE.14164>
- Curcio, A., Santarpia, G., & Indolfi, C. (2017). The Brugada syndrome — From gene to therapy —. *Circulation Journal*, 81(3), 290–297. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0971>
- Darbar, D., Kannankeril, P. J., Donahue, B. S., Kucera, G., Stubblefield, T., Haines, J. L., George, A. L., & Roden, D. M. (2008). Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation*, 117(15), 1927–1935. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757955>
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Gut, N. K., Valencia, M., Kondabolu, K., Kim, Y., Gerdjikov, T. V., & Mena-Segovia, J. (2020). Cholinergic midbrain afferents modulate striatal circuits and shape encoding of action strategies. *Nature Communications*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15514-3>
- Davis, M., Parisi, T., Gendelman, D. S., Tischler, M., & Kehne, J. H. (1982). Habituation and sensitization of startle reflexes elicited electrically from the brainstem. *Science*, 218(4573), 688–690. <https://doi.org/10.1126/science.7134967>
- De Leenheer, E. M. R., Ensink, R. J. H., Kunst, H. P. M., Marres, H. A. M., Talebizadeh, Z., Declau, F., Smith, S. D., Usami, S. -i., Van de Heyning, P. H., Van Camp, G., Huygen, P. L. M., & Cremers, C. W. R. J. (2002). DFNA2/KCNQ4 and its manifestations. *Advances in Otorhinolaryngology*, 61, 41–46. <https://doi.org/10.1159/000066802>
- Delmas, P., & Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 850–862. <https://doi.org/10.1038/nrn1785>
- Devaux, J. J., Kleopa, K. A., Cooper, E. C., & Scherer, S. S. (2004). KCNQ2 Is a Nodal K⁺ Channel. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1236–1244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4512-03.2004>
- Dhillon, K. K., & Gupta, S. (2023). *Biochemistry, Ketogenesis*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493179/>
- Dixit, G., Dabney-Smith, C., & Lorigan, G. A. (2020). The membrane protein KCNQ1 potassium ion channel: Functional diversity and current structural insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(5), 183148. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2019.183148>
- Drion, G., Bonjean, M., Waroux, O., Scuvée-Moreau, J., Liégeois, J. F., Sejnowski, T. J., Sepulchre, R., & Seutin, V. (2010). M-type channels selectively control bursting in rat dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 31(5), 827–835. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2010.07107.X>
- Du, K., Yu, Y., Zhang, D., Luo, W., Huang, H., Chen, J., Gao, J., & Huang, C. (2013). NFκB1 (p50) suppresses SOD2 expression by inhibiting FoxO3a transactivation in a mir190/phlpp1/akt-dependent axis. *Molecular Biology of the Cell*, 24(22), 3577–3583. <https://doi.org/10.1091/MBC.E13-06-0343/ASSET/IMAGES/LARGE/3577FIG4.JPEG>
- Du, S., & Zheng, H. (2021). Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. *Cell and Bioscience*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00700-7>
- Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A., & de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from

- developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, 18(4), 551–561. <https://doi.org/10.1002/JNR.490180407>
- Ehrenreich, M. J. (2006). A case of the re-emergence of panic and anxiety symptoms after initiation of a high-protein, very low carbohydrate diet. *Psychosomatics*, 47(2), 178–179. <https://doi.org/10.1176/APPI.PSY.47.2.178>
- Elamin, M., Ruskin, D. N., Masino, S. A., & Sacchetti, P. (2017). Ketone-based metabolic therapy: Is increased nad⁺ a primary mechanism? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 297591. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00377/BIBTEX>
- Elsabbagh, M. (2020). Linking risk factors and outcomes in autism spectrum disorder: Is there evidence for resilience? *The BMJ*, 368. <https://doi.org/10.1136/bmj.l6880>
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., & Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*, 5(3), 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- Engelbrechtsen, L., Mahendran, Y., Jonsson, A., Gjesing, A. P., Weeke, P. E., Jørgensen, M. E., Færch, K., Witte, D. R., Holst, J. J., Jørgensen, T., Grarup, N., Pedersen, O., Vestergaard, H., Torkov, S., Kanters, J. K., & Hansen, T. (2018). Common variants in the hERG (KCNH2) voltage-gated potassium channel are associated with altered fasting and glucose-stimulated plasma incretin and glucagon responses. *BMC Genetics*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0602-2>
- Etxeberria, A., Santana-Castro, I., Regalado, M. P., Aivar, P., & Villarroel, A. (2004). Three Mechanisms Underlie KCNQ2/3 Heteromeric Potassium M-Channel Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 24(41), 9146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3194-04.2004>
- Evangelidou, A., Vlachonikolis, I., Mihailidou, H., Spilioti, M., Skarpalezou, A., Makaronas, N., Prokopiou, A., Christodoulou, P., Liapi-Adamidou, G., Helidonis, E., Sbyrakis, S., & Smeitink, J. (2003). Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: Pilot study. *Journal of Child Neurology*, 18(2), 113–118. <https://doi.org/10.1177/08830738030180020501>
- Falsaperla, R., Marino, S. D., Salomone, G., Madia, F., Marino, S., Tardino, L. G., Scalia, B., & Ruggieri, M. (2023). Impressive efficacy of the ketogenic diet in a KCNQ2 encephalopathy infant: a case report and exhaustive literature review. *Translational Pediatrics*, 12(2), 292–300. <https://doi.org/10.21037/tp-22-258>
- Fan, X. zhenzi, Wang, Y. Y., Cui, Z. Y., Cheng, Z. H., Zhang, H. L., Gamper, N., Zhang, F., & Han, M. (2022). Kv7.4 channel is a key regulator of vascular inflammation and remodeling in neointimal hyperplasia and abdominal aortic aneurysms. *Free Radical Biology and Medicine*, 178, 111–124. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.11.041>
- Fatemi, S. H., Aldinger, K. A., Ashwood, P., Bauman, M. L., Blaha, C. D., Blatt, G. J., Chauhan, A., Chauhan, V., Dager, S. R., Dickson, P. E., Estes, A. M., Goldowitz, D., Heck, D. H., Kemper, T. L., King, B. H., Martin, L. A., Millen, K. J., Mittleman, G., Mosconi, M. W., ... Welsh, J. P. (2012). Consensus paper: Pathological role of the cerebellum in Autism. *Cerebellum*, 11(3), 777–807. <https://doi.org/10.1007/s12311-012-0355-9>
- Fendt, M., Li, L., & Yeomans, J. S. (2001). Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology*, 156(2–3), 216–224.

<https://doi.org/10.1007/s002130100794>

- Fernández-Falgueras, A., Sarquella-Brugada, G., Brugada, J., Brugada, R., & Campuzano, O. (2017). Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY6010007>
- Fidzinski, P., Korotkova, T., Heidenreich, M., Maier, N., Schuetze, S., Kobler, O., Zuschratter, W., Schmitz, D., Ponomarenko, A., & Jentsch, T. J. (2015). KCNQ5 K⁺ channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. *Nature Communications*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms7254>
- Finlay, J. B., Liu, X., Ermel, R. W., & Adamson, T. W. (2015). Maternal Weight Gain as a Predictor of Litter Size in Swiss Webster, C57BL/6J, and BALB/cJ mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(6).
- Flórez, J. (2013). *Farmacología Humana. Fármacos Antiepilépticos*, 497–499.
- Fombonne, E. (2005). Epidemiology of Autistic Disorder and Other PDDs. *J Clin Psychiatry*, 66(suppl 10), 3–8.
- Fombonne, E. (2008). Is autism getting commoner? *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 193(1), 59. <https://doi.org/10.1192/bjp.193.1.59>
- Fosmo, A. L., & Skraastad, Ø. B. (2017). The Kv7 Channel and Cardiovascular Risk Factors. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00075>
- Franklin, K.B., Paxinos, G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Freeman, J., Veggiotti, P., Lanzi, G., Tagliabue, A., & Perucca, E. (2006). The ketogenic diet: From molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy Research*, 68(2), 145–180. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2005.10.003>
- FVS. (2023). <https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/13284/sindrome-fetal-del-valproato>
- Galić, E., Bešlić, P., Kilić, P., Planinić, Z., Pašalić, A., Galić, I., Čubela, V. V., & Pekić, P. (2021). Congenital Long Qt Syndrome: a Systematic Review. *Acta Clinica Croatica*, 60(4), 739–748. <https://doi.org/10.20471/acc.2021.60.04.22>
- Galvin, V. C., Yang, S. T., Paspalas, C. D., Rakic, P., Arnsten, A. F. T., & Wang, M. (2020). Muscarinic M1 Receptors Modulate Working Memory Performance and Activity via KCNQ Potassium Channels in the Primate Prefrontal Cortex. *Neuron*, 106, 649–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.030>
- Garcia-Rill, E., Saper, C. B., Rye, D. B., Kofler, M., Nonnekes, J., Lozano, A., Valls-Solé, J., & Hallett, M. (2019). Focus on the pedunculo pontine nucleus. Consensus review from the May 2018 brainstem society meeting in Washington, DC, USA. *Clinical Neurophysiology*, 130(6), 925–940. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.03.008>
- Garcia-Rill, Edgar. (1991). *THE PEDUNCULOPONTINE NUCLEUS*. 36.
- Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (n.d.). *Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis*. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.051672>
- Geisheker, M. R., Heymann, G., Wang, T., Coe, B. P., Turner, T. N., Stessman, H. A. F., Hoekzema, K., Kvarnung, M., Shaw, M., Friend, K., Liebelt, J., Barnett, C., Thompson, E. M., Haan, E., Guo, H., Anderlid, B., Nordgren, A., Lindstrand, A., Vandeweyer, G., ... Eichler, E. E. (2017).

- Hotspots of missense mutation identify neurodevelopmental disorder genes and functional domains. *Nature Neuroscience*, 20(8). <https://doi.org/10.1038/nn.4589>
- Gentile, S., Martin, N., Scappini, E., Williams, J., Erxleben, C., & Armstrong, D. L. (2008). The human ERG1 channel polymorphism, K897T, creates a phosphorylation site that inhibits channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14704–14708. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0802250105>
- George, A. L., Varkony, T. A., Drabkin, H. A., Han, J., Knops, J. F., Finley, W. H., Brown, G. B., Ward, D. C., & Haas, M. (1995). Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel α -subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 68(1), 67–70. <https://doi.org/10.1159/000133892>
- Geschwind, D. H., & Levitt, P. (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(1), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.009>
- Gilling, M., Rasmussen, H. B., Calloe, K., Sequeira, A. F., Baretto, M., Oliveira, G., Almeida, J., Lauritsen, M. B., Ullmann, R., Boonen, S. E., Brondum-Nielsen, K., Kalscheuer, V. M., Tümer, Z., Vicente, A. M., Schmitt, N., & Tommerup, N. (2013). Dysfunction of the heteromeric KV7.3/KV7.5 potassium channel is associated with autism spectrum disorders. *Frontiers in Genetics*, 4, 41436. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2013.00054/BIBTEX>
- Giunti, S., Blanco, M. G., Rosa, M. J. De, & Rayes, D. (2023). The ketone body β -hydroxybutyrate ameliorates neurodevelopmental deficits in the GABAergic system of daf-18/PTEN Caenorhabditis elegans mutants. *BioRxiv*, 2023.04.06.535850. <https://doi.org/10.1101/2023.04.06.535850>
- Goines, P., & Van de Walter, J. (2010). The Immune System 's Role in the Biology of Autism. *Curr Opin Neurol*, 23(2), 111–117. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283373514>.The
- Gómez-Nieto, R., Hormigo, S., & López, D. E. (2020). Prepulse inhibition of the auditory startle reflex assessment as a hallmark of brainstem sensorimotor gating mechanisms. *Brain Sciences*, 10(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/brainsci10090639>
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., & Heinzl, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal*, 20(24), 6969–6978. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.24.6969>
- Gouas, L., Nicaud, V., Berthet, M., Forhan, A., Tiret, L., Balkau, B., & Guicheney, P. (2005). Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 13(11), 1213–1222. <https://doi.org/10.1038/SJ.EJHG.5201489>
- Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M., & Reiss, K. (2016). Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS17122093>
- Grabowska, K., Grabowski, M., Przybyła, M., Pondel, N., Barski, J. J., Nowacka-Chmielewska, M., & Liśkiewicz, D. (2024). Ketogenic diet and behavior: insights from experimental studies. *Frontiers in Nutrition*, 11(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1322509>
- Grajek, M., Krupa-Kotara, K., Białek-Dratwa, A., Sobczyk, K., Grot, M., Kowalski, O., & Staśkiewicz, W. (2022). Nutrition and mental health: A review of current knowledge about the impact of

- diet on mental health. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.943998>
- Grant, A. O. (2009). Basic Science for the Clinical Electrophysiologist: Cardiac Ion Channels. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*, 2, 185–194. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.789081>
- Green, E. L. (1966). Biology of the Laboratory Mouse. *The Jackson Laboratory*.
- Greene, D. L., & Hoshi, N. (2017). Modulation of Kv7 channels and excitability in the brain. *Cell Mol Life*, 74(3), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2359-y>.
- Gribkoff, V. K. (2003). The therapeutic potential of neuronal KCNQ channel modulators. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 7(6), 737–748. <https://doi.org/10.1517/14728222.7.6.737>
- Grunnet, M., Behr, E. R., Calloe, K., Hofman-Bang, J., Till, J., Christiansen, M., McKenna, W. J., Olesen, S. P., & Schmitt, N. (2005). Functional assessment of compound mutations in the KCNQ1 and KCNH2 genes associated with long QT syndrome. *Heart Rhythm*, 2(11), 1238–1249. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2005.07.025>
- Guerra, M., Medici, V., Weatheritt, R., Corvino, V., Palacios, D., Geloso, M. C., Farini, D., & Sette, C. (2023). Fetal exposure to valproic acid dysregulates the expression of autism-linked genes in the developing cerebellum. *Translational Psychiatry*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02391-9>
- Gunthorpe, M. J., Large, C. H., & Sankar, R. (2012). The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. In *Epilepsia* (Vol. 53, Issue 3, pp. 412–424). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03365.x>
- Ha, G. E., & Cheong, E. (2017). *Spike Frequency Adaptation in Neurons of the Central Nervous System*. 26(4), 179–185.
- Haick, J. M., & Byron, K. L. (2016). Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels. *Pharmacology and Therapeutics*, 165, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.05.002>
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J. K., & Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of General Psychiatry*, 68(11), 1095–1102. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
- Han, M., Jiang, G., Luo, H., & Shao, Y. (2021). Neurobiological Bases of Social Networks. *Frontiers in Psychology*, 12, 626337. <https://doi.org/10.3389/FPSYG.2021.626337/BIBTEX>
- Hansen, H. H., Waroux, O., Seutin, V., Jentsch, T. J., Aznar, S., & Mikkelsen, J. D. (2008). Kv7 channels: Interaction with dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the CNS. *Journal of Physiology*, 586(7), 1823–1832. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149450>
- Harrison, E. M., Walbeek, T. J., Sun, J., Johnson, J., Poonawala, Q., & Gorman, M. R. (2016). Extraordinary behavioral entrainment following circadian rhythm bifurcation in mice. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep38479>
- He, F. Z., McLeod, H. L., & Zhang, W. (2013). Current pharmacogenomic studies on hERG potassium channels. *Trends in Molecular Medicine*, 19(4), 227–238. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2012.12.006>
- He, Y., Cheng, X., Zhou, T., Li, D., Peng, J., Xu, Y., & Huang, W. (2023). β -Hydroxybutyrate as an

- epigenetic modifier: Underlying mechanisms and implications. *Heliyon*, 9(11), e21098. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21098>
- Hefner, K., & Holmes, A. (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 176(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.BBR.2006.10.001>
- Heidenreich, M., Lechner, S. G., Vardanyan, V., Wetzell, C., Cremers, C. W., De Leenheer, E. M., Aránguez, G., Moreno-Pelayo, M. Á., Jentsch, T. J., & Lewin, G. R. (2011). KCNQ4 K⁺ channels tune mechanoreceptors for normal touch sensation in mouse and man. *Nature Neuroscience*, 15(1), 138–145. <https://doi.org/10.1038/nn.2985>
- Hernandez, A., Truckenbrod, L., Federico, Q., Campos, K., Moon, B., Ferekides, N., Hoppe, M., D'Agostino, D., & Burke, S. (2020). Metabolic switching is impaired by aging and facilitated by ketosis independent of glycogen. *Aging*, 12(9), 7963–7984. <https://doi.org/10.18632/aging.103116>
- Hernandez, C. C., Zaika, O., Tolstykh, G. P., & Shapiro, M. S. (2008). Regulation of neural KCNQ channels: Signalling pathways, structural motifs and functional implications. *Journal of Physiology*, 586(7), 1811–1821. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148304>
- Hewitt, A., Hall-Lande, J., Hamre, K., Esler, A. N., Punyko, J., Reichle, J., & Gulaid, A. A. (2016). Autism Spectrum Disorder (ASD) Prevalence in Somali and Non-Somali Children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(8), 2599–2608. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2793-6>
- Heyne, G. W., Plisch, E. H., Melberg, C. G., Sandgren, E. P., Peter, J. A., & Lipinski, R. J. (2015). A Simple and Reliable Method for Early Pregnancy Detection in Inbred Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 54(4), 368–371. <https://doi.org/PMC4521569>
- Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., & Kurachi, Y. (2010). How is the highly positive endocochlear potential formed? the specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(4), 521–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0754-z>
- Hinterseer, M., Irlbeck, M., Ney, L., Beckmann, B. M., Pfeufer, A., Steinbeck, G., & Kaab, S. (2006). Acute respiratory distress syndrome with transiently impaired left ventricular function and Torsades de Pointes arrhythmia unmasking congenital long QT syndrome in a 25-yr-old woman. *British Journal of Anaesthesia*, 97(2), 150–153. <https://doi.org/10.1093/BJA/AEL118>
- Hoff, J. (2000). *Methods of Blood Collection in the Mouse*.
- Homma, Y., Skinner, R. D., & Garcia-Rill, E. (2002). Effects of pedunculopontine nucleus (PPN) stimulation on caudal pontine reticular formation (PnC) neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 87(6), 3033–3047. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.6.3033>
- Honda, T., & Semba, K. (1995). An ultrastructural study of cholinergic and non-cholinergic neurons in the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei in the rat. *Neuroscience*, 68(3), 837–853. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00177-K](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00177-K)
- Hornig, M., & Lipkin, W. (2001). Infectious and immune factors in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders: epidemiology, hypotheses, and animal models. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 7(3), 200–210. <https://doi.org/10.1002/mrdd.1028>

- Hoshi, N. (2020). M-Current Suppression, Seizures and Lipid Metabolism: A Potential Link Between Neuronal Kv7 Channel Regulation and Dietary Therapies for Epilepsy. *Frontiers in Physiology*, 11(May), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00513>
- Hou, G., Hao, M., Duan, J., & Han, M. H. (2024). The Formation and Function of the VTA Dopamine System. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 3875, 25(7), 3875. <https://doi.org/10.3390/IJMS25073875>
- Hu, T., Zhang, J., Wang, J., Sha, L., Xia, Y., Ortyl, T. C., Tian, X., & Chen, L. (2023). Advances in Epilepsy: Mechanisms, Clinical Trials, and Drug Therapies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(7), 4434–4467. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01975>
- Huang, H., & Trussell, L. O. (2011). KCNQ5 channels control resting properties and release probability of a synapse. *Nat Neurosci*, 14(7), 840–847. <https://doi.org/10.1038/nn.2830>
- Huang, J., Li, Y. Q., Wu, C. H., Zhang, Y. L., Zhao, S. T., Chen, Y. J., Deng, Y. H., Xuan, A., & Sun, X. D. (2019). The effect of ketogenic diet on behaviors and synaptic functions of naive mice. *Brain and Behavior*, 9(4), e01246. <https://doi.org/10.1002/BRB3.1246>
- Huang, X.-J., Choi, Y.-K., Im, H.-S., Yarimaga, O., Yoon, E., & Kim, H.-S. (2006). Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 6(7), 756. [/pmc/articles/PMC3894536/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/163894536/)
- Huang, Y., Ma, D., Yang, Z., Zhao, Y., & Guo, J. (2023). Voltage-gated potassium channels KCNQs: Structures, mechanisms, and modulations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 689(November), 149218. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.149218>
- Hulbert, S. W., & Jiang, Y. H. (2016). Monogenic mouse models of autism spectrum disorders: Common mechanisms and missing links. *Neuroscience*, 321, 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.040>
- Hurley, A. M., Tadrous, M., & Miller, E. S. (2010). Thimerosal-Containing Vaccines and Autism: A Review of Recent Epidemiologic Studies. *JPPT*, 15, 173–181.
- Hwang, B., & Hughes, C. (2000). The effects of social interactive training on early social communicative skills of children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 30(4), 331–343. <https://doi.org/10.1023/A:1005579317085>
- Im, K., Mareninov, S., Palma Diaz, M. F., & Yong, W. H. (2019). An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Indraratna, P., Tardo, D., Delves, M., Szirt, R., & Ng, B. (2020). Measurement and Management of QT Interval Prolongation for General Physicians. *Journal of General Internal Medicine*, 35(3), 865–873. <https://doi.org/10.1007/s11606-019-05477-7>
- Inglis, W. L., Olmstead, M. C., & Robbins, T. W. (2001). Selective deficits in attentional performance on the 5-choice serial reaction time task following pedunculopontine tegmental nucleus lesions. *Behavioural Brain Research*, 123(2), 117–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00181-4)
- Institute for Laboratory Animals Research. (2011). Guide. In *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Vol. 46, Issue 3). https://doi.org/10.1163/1573-3912_islam_DUM_3825
- Ioakeimidis, N. S., Papamitsou, T., Meditskou, S., & Iakovidou-Kritsi, Z. (2017). Sudden infant death

- syndrome due to long QT syndrome: A brief review of the genetic substrate and prevalence. *Journal of Biological Research (Greece)*, 24(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S40709-017-0063-1/TABLES/2>
- Iwasa, H., Itoh, T., Nagai, R., Nakamura, Y., & Tanaka, T. (2000). Twenty single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their allelic frequencies in four genes that are responsible for familial long QT syndrome in the Japanese population. *Journal of Human Genetics*, 45(3), 182–183. <https://doi.org/10.1007/S100380050207>
- Jain, B. P., Goswami, S. K., & Pandey, S. (2021). Clinical Biochemistry. *Protocols in Biochemistry and Clinical Biochemistry*, 101–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822007-8.00001-5>
- Jensen, H. S., Grunnet, M., & Olesen, S. P. (2007). Inactivation as a New Regulatory Mechanism for Neuronal Kv7 Channels. *Biophysical Journal*, 92(8), 2747. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.101287>
- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 21–30.
- Jepps, T. A., Barrese, V., & Miceli, F. (2021). Editorial: Kv7 Channels: Structure, Physiology, and Pharmacology. *Frontiers in Physiology*, 12(April), 10–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.679317>
- Jepps, T. A., Chadha, P. S., Davis, A. J., Harhun, M. I., Cockerill, G. W., Olesen, S. P., Hansen, R. S., & Greenwood, I. A. (2011). Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. *Circulation*, 124(5), 602–611. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.032136>
- Jiang, Q.-X. (2021). High-resolution structures of K⁺ channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 267, 51–81. https://doi.org/10.1007/164_2021_454
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESPROT.2004.04.002>
- Kanner, L. (1943). *Autistic Disturbances of Affective Contact*. (pp. 217–250).
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Alders, M., Benito, B., Berthet, M., Brugada, J., Brugada, P., Fressart, V., Guerchicoff, A., Harris-Kerr, C., Kamakura, S., Kyndt, F., Koopmann, T. T., Miyamoto, Y., Pfeiffer, R., Pollevick, G. D., Probst, V., Zumhagen, S., Vatta, M., ... Ackerman, M. J. (2010). An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*, 7(1), 33–46. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2009.09.069>
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Salisbury, B. A., Carr, J. L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G. D., Wilde, A. A. M., & Ackerman, M. J. (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm*, 6(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2009.05.021>
- Kashiwa, A., Itoh, H., Makiyama, T., Wada, Y., Ozawa, J., Kato, K., Fukuyama, M., Nakajima, T., Ohno, S., & Horie, M. (2024). Clinical characterization of type 1 long QT syndrome caused by C-terminus Kv7.1 variants. *Heart Rhythm*. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2024.02.021>
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours

- with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
- Kato, M., Yamagata, T., Kubota, M., Arai, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Fujii, T., Sugai, K., Imai, K., Uster, T., Chitayat, D., Weiss, S., Kashii, H., Kusano, R., Matsumoto, A., Nakamura, K., Oyazato, Y., Maeno, M., Nishiyama, K., ... Saito, H. (2013). Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*, 54(7), 1282–1287. <https://doi.org/10.1111/epi.12200>
- Kato, S., Honjo, H., Takemoto, Y., Takanari, H., Suzuki, T., Okuno, Y., Opthof, T., Sakuma, I., Inada, S., Nakazawa, K., Ashihara, T., & Kodama, I. (2012). *Pharmacological Blockade of I_{Ks} Destabilizes Spiral-Wave Reentry Under β -Adrenergic Stimulation in Favor of Its Early Termination*. 63, 52–63. <https://doi.org/10.1254/jphs.12008FP>
- Kawamura, M., Ozawa, T., Yao, T., Ashihara, T., Sugimoto, Y., Yagi, T., Itoh, H., Ito, M., Makiyama, T., & Horie, M. (2009). Dynamic change in ST-segment and spontaneous occurrence of ventricular fibrillation in Brugada syndrome with a novel nonsense mutation in the SCN5A gene during long-term follow-up. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 73(3), 584–588. <https://doi.org/10.1253/CIRCJ.CJ-08-0142>
- Kawanai, T., Ago, Y., Watanabe, R., Inoue, A., Taruta, A., Onaka, Y., Hasebe, S., Hashimoto, H., Matsuda, T., & Takuma, K. (2016). Prenatal Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Affects Gene Expression of Autism-Related Molecules and Delays Neuronal Maturation. *Neurochemical Research*, 41, 2574–2584. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1969-y>
- Kay, H. Y., Greene, D. L., Kang, S., Kosenko, A., & Hoshi, N. (2015). M-current preservation contributes to anticonvulsant effects of valproic acid. *Journal of Clinical Investigation*, 125(10), 3904–3914. <https://doi.org/10.1172/JCI79727>
- Kazdoba, T. M., Leach, P. T., & Crawley, J. N. (2016). Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes, Brain and Behavior*, 15(1), 7–26. <https://doi.org/10.1111/gbb.12256>
- Kazdoba, Tatiana M, Leach, P. T., Yang, M., Silverman, J. L., Solomon, M., & Crawley, J. N. (2016). *Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics*. 1, 1–47. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Kazlauskas, N., Seiffe, A., Campolongo, M., Zappala, C., & Depino, A. M. (2019). Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism. *Psychoneuroendocrinology*, 110(September). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104441>
- Keller, D. I., Grenier, J., Christé, G., Dubouloz, F., Osswald, S., Brink, M., Ficker, E., & Chahine, M. (2009). Characterization of novel KCNH2 mutations in type 2 long QT syndrome manifesting as seizures. *Canadian Journal of Cardiology*, 25(8), 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0828-282X\(09\)70117-5](https://doi.org/10.1016/S0828-282X(09)70117-5)
- Kelly, S. J., Ostrowski, N. L., & Wilson, M. A. (1999). Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 64(4), 655–664. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00167-7)
- Kennedy, A. R., Pissios, P., Otu, H., Xue, B., Asakura, K., Furukawa, N., Marino, F. E., Liu, F. F., Kahn, B. B., Libermann, T. A., & Maratos-Flier, E. (2007). A high-fat, ketogenic diet induces a unique

- metabolic state in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(6), 1724–1739. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00717.2006>
- Kesl, S. L., Poff, A. M., Ward, N. P., Fiorelli, T. N., Ari, C., Van Putten, A. J., Sherwood, J. W., Arnold, P., & D'Agostino, D. P. (2016). Effects of exogenous ketone supplementation on blood ketone, glucose, triglyceride, and lipoprotein levels in Sprague-Dawley rats. *Nutrition and Metabolism*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0069-y>
- Kharkovets, T., Dedek, K., Maier, H., Schweizer, M., Khimich, D., Nouvian, R., Vardanyan, V., Leuwer, R., Moser, T., & Jentsch, T. J. (2006). Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *EMBO Journal*, 25(3), 642–652. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600951>
- Kharkovets, T., Hardelin, J. P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., & Jentsch, T. J. (2000). KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4333–4338. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4333>
- Kim, D. H., Park, M. H., Ha, S., Bang, E. J., Lee, Y., Lee, A. K., Lee, J., Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2019). Anti-inflammatory action of β -hydroxybutyrate via modulation of PGC-1 α and FoxO1, mimicking calorie restriction. *Aging*, 11(4), 1283–1304. <https://doi.org/10.18632/aging.101838>
- Kim, E. C., Patel, J., Zhang, J., Soh, H., Rhodes, J. S., Tzingounis, A. V., & Chung, H. J. (2020). Heterozygous loss of epilepsy gene KCNQ2 alters social, repetitive and exploratory behaviors. *Genes, Brain and Behavior*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/gbb.12599>
- Kim, H. J., & Bae, S. C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*, 3(2), 166. [/pmc/articles/PMC3056563/](https://doi.org/10.1155/2011/3056563)
- Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J., Dela Pena, I. C., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, 124(6), 832–843. <https://doi.org/10.1111/jnc.12147>
- Kirkpatrick, C. F., Bolick, J. P., Kris-Etherton, P. M., Sikand, G., Aspary, K. E., Soffer, D. E., Willard, K. E., & Maki, K. C. (2019). Review of current evidence and clinical recommendations on the effects of low-carbohydrate and very-low-carbohydrate (including ketogenic) diets for the management of body weight and other cardiometabolic risk factors: A scientific statement from the National Lipid Association Nutrition and Lifestyle Task Force. *Journal of Clinical Lipidology*, 13(5), 689–711.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JACL.2019.08.003>
- Klement, R. J., Brehm, N., & Sweeney, R. A. (2020). Ketogenic diets in medical oncology: a systematic review with focus on clinical outcomes. *Medical Oncology*, 37(2). <https://doi.org/10.1007/s12032-020-1337-2>
- Klinger, F., Gould, G., Boehm, S., & Shapiro, M. S. (2011). Distribution of M-channel subunits KCNQ2 and KCNQ3 in rat hippocampus. *NeuroImage*, 58, 761–769. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.003>
- Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology*, 59(2), 107–128.

[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00098-7)

- Kohl, S., Wolters, C., Gruendler, T. O. J., Vogeley, K., Klosterkötter, J., & Kuhn, J. (2014). Prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in high functioning autism. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092372>
- Kosinski, C., & Jornayvaz, F. R. (2017). Effects of Ketogenic Diets on Cardiovascular Risk Factors: Evidence from Animal and Human Studies. *Nutrients* 2017, Vol. 9, Page 517, *9*(5), 517. <https://doi.org/10.3390/NU9050517>
- Koyama, S., & Appel, S. B. (2006). Characterization of M-current in ventral tegmental area dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, *96*(2), 535–543. <https://doi.org/10.1152/jn.00574.2005>
- Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., & Göttlicher, M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO Journal*, *22*(13), 3411–3420. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG315>
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Dangelo, K., Couch, S. C., Benoit, S. C., & Clegg, D. J. (2012). Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, *33*(2), 425.e19. <https://doi.org/10.1016/j.NEUROBIOLAGING.2010.10.006>
- Kroeger, D., Ferrari, L. L., Petit, G., Mahoney, C. E., Fuller, P. M., Arrigoni, E., & Scammell, T. E. (2017). Cholinergic, glutamatergic, and GABAergic neurons of the pedunculopontine tegmental nucleus have distinct effects on sleep/wake behavior in mice. *Journal of Neuroscience*, *37*(5), 1352–1366. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1405-16.2016>
- Krystal, J. H., & State, M. W. (2014). Psychiatric Disorders: Diagnosis to Therapy. *Cell*, *157*(1), 201. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.02.042>
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., & Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, *96*(3), 437–446. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80556-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80556-5)
- Kubota, T., Matsumoto, H., & Kirino, Y. (2016). Ameliorative effect of membrane-associated estrogen receptor G protein coupled receptor 30 activation on object recognition memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacological Sciences*, *131*(3), 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.06.005>
- Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2015). Nicotinic receptors, memory, and hippocampus. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *23*, 137–163. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13665-3_6
- Kwiterovich, P. O., Vining, E. P. G., Pyzik, P., Skolasky, R., & Freeman, J. M. (2003). Effect of a High-Fat Ketogenic Diet on Plasma Levels of Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins in Children. *JAMA*, *290*(7), 912–920. <https://doi.org/10.1001/JAMA.290.7.912>
- Lai, F., Jin, L., Gallagher, S., Mijatov, B., Zhang, X. D., & Hersey, P. (2012). Histone Deacetylases (HDACs) as Mediators of Resistance to Apoptosis in Melanoma and as Targets for Combination Therapy with Selective BRAF Inhibitors. *Advances in Pharmacology*, *65*, 27–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397927-8.00002-6>
- Laker, D., Tolle, F., Stegen, M., Heerdegen, M., Köhling, R., Kirschstein, T., & Wolfart, J. (2021). Kv7 and Kir6 Channels Shape the Slow AHP in Mouse Dentate Gyrus Granule Cells and

- Control Burst-like Firing Behavior. *Neuroscience*, 467, 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.025>
- Lakhan, S. E., & Vieira, K. F. (2008). Nutritional therapies for mental disorders. *Nutrition Journal*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-7-2/TABLES/2>
- Landrigan, P. J. (2010). What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Current Opinion in Pediatrics*, 22(2), 219–225. <https://doi.org/10.1097/MOP.0B013E328336EB9A>
- Le Foll, C., Dunn-meynell, A. A., Miziorko, H. M., & Levin, B. E. (2014). *Regulation of Hypothalamic Neuronal Sensing and Food Intake by Ketone Bodies and Fatty Acids*. 63(July 2013), 1259–1269. <https://doi.org/10.2337/db13-1090>
- Le Foll, C., & Levin, B. E. (2016). Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 310(11), R1186–R1192. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2016>
- Le Scouarnec, S., Karakachoff, M., Gourraud, J. B., Lindenbaum, P., Bonnaud, S., Portero, V., Duboscq-Bidot, L., Daumy, X., Simonet, F., Teusan, R., Baron, E., Violleau, J., Persyn, E., Bellanger, L., Barc, J., Chatel, S., Martins, R., Mabo, P., Sacher, F., ... Redon, R. (2015). Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome. *Human Molecular Genetics*, 24(10), 2757–2763. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDV036>
- Leão, R. N., Hui, M. T., & Fisahn, A. (2009). Kv7/KCNQ channels control action potential phasing of pyramidal neurons during hippocampal gamma oscillations in vitro. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(42), 13353–13364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1463-09.2009>
- Lee, B. K., Magnusson, C., Gardner, R. M., Blomström, Å., Newschaffer, C. J., Burstyn, I., Karlsson, H., & Dalman, C. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.001>
- Lee, R. W. Y., Corley, M. J., Pang, A., Arakaki, G., Abbott, L., Nishimoto, M., Miyamoto, R., Lee, E., Yamamoto, S., Maunakea, A. K., Lum-Jones, A., & Wong, M. (2018). A modified ketogenic gluten-free diet with MCT improves behavior in children with autism spectrum disorder. *Physiology and Behavior*, 188(January), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.006>
- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J. C., Freret, T., Schumann-Bard, P., & Boulouard, M. (2015). Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cerebral Cortex*, 25(11), 4048–4061. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHU119>
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Lehman, A., Thouta, S., Mancini, G. M. S., Naidu, S., Slegtenhorst, M. Van, Mcwalter, K., Person, R., Mwenifumbo, J., Salvarinova, R., Study, C., Guella, I., Mckenzie, M. B., Datta, A., Connolly, M. B., Kalkhoran, S. M., Poburko, D., Friedman, J. M., Farrer, M. J., Demos, M., ... Claydon, T. (2017). *Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations in KCNQ5 Cause Intellectual Disability or Epileptic Encephalopathy*. 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.05.016>

- Leumann, L., Sterchi, D., Vollenweider, F., Ludewig, K., & Früh, H. (2001). A neural network approach to the acoustic startle reflex and prepulse inhibition. *Brain Research Bulletin*, 56(2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00607-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00607-4)
- Levin, E. D., Bradley, A., Addy, N., & Sigurani, N. (2002). Dorsal hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and memory. *Neuroscience*, 109(4), 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.052>
- Lezmy, J., Gelman, H., Katsenelson, M., Styr, B., Tikochinsky, E., Lipinsky, M., Peretz, A., Slutsky, I., & Attali, B. (2020). M-Current Inhibition in Hippocampal Excitatory Neurons Triggers Intrinsic and Synaptic Homeostatic Responses at Different Temporal Scales. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(19), 3694–3706. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1914-19.2020>
- Lezmy, J., Lipinsky, M., Khrapunsky, Y., Patrich, E., Shalom, L., Peretz, A., Fleidervish, I. A., & Attali, B. (2017). M-current inhibition rapidly induces a unique CK2-dependent plasticity of the axon initial segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(47), E10234–E10243. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1708700114>
- Li, L., Du, Y., Li, N., Wu, X., & Wu, Y. (2009). Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(8), 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.02.001>
- Li, Q., Liang, J., Fu, N., Han, Y., & Qin, J. (2021). A Ketogenic Diet and the Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Pediatrics*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.650624>
- Li, Wenbo, & Sun, Z. (2019). Mechanism of Action for HDAC Inhibitors—Insights from Omics Approaches. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1616*, 20(7), 1616. <https://doi.org/10.3390/IJMS20071616>
- Li, Wenjia, Yin, L., Shen, C., Hu, K., Ge, J., & Sun, A. (2018). SCN5A variants: Association with cardiac disorders. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01372>
- Liao, X., Yap, M. K. H., Leung, K. H., Kao, P. Y. P., Liu, L. Q., & Yip, S. P. (2017). Genetic Association Study of KCNQ5 Polymorphisms with High Myopia. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3024156>
- Libbey, J. E., Sweeten, T. L., McMahon, W. M., & Fujinami, R. S. (2005). Autistic disorder and viral infections. *Journal of NeuroVirology*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/13550280590900553/METRICS>
- Lin, T. Y., Liu, H. W., & Hung, T. M. (2021). The Ketogenic Effect of Medium-Chain Triacylglycerides. *Frontiers in Nutrition*, 8, 747284. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.747284>
- Lipinsky, M., Tobelaim, W. S., Peretz, A., Simhaev, L., Yeheskel, A., Yakubovich, D., Lebel, G., Paas, Y., Hirsch, J. A., & Attali, B. (2020). A unique mechanism of inactivation gating of the Kv channel family member Kv7.1 and its modulation by PIP2 and calmodulin. *Science Advances*, 6(51), 1–14. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABD6922>
- Liu, H. F., Yuan, T. Y., Yang, J. W., Li, F., Wang, F., & Fu, H. M. (2022). A novel de novo heterozygous variant of the KCNQ2 gene: Contribution to early-onset epileptic encephalopathy in a female infant. *Molecular Medicine Reports*, 26(3), 1–9. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12797>
- Liu, H., Huang, X., Xu, J., Mao, H., Li, Y., Ren, K., Ma, G., Xue, Q., Tao, H., Wu, S., & Wang, W. (2021). Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the

- Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. *Neurobiology of Stress*, 15, 100417. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100417>
- Liu, Y., Fan, L., Yang, H., Wang, D., Liu, R., Shan, T., & Xia, X. (2024). Ketogenic therapy towards precision medicine for brain diseases. *Frontiers in Nutrition*, 11(February). <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1266690>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lordan, R., Storni, C., & Benedictis, C. A. De. (2021). Autism Spectrum Disorders: Diagnosis and Treatment. *Autism Spectrum Disorders*, 17–32. <https://doi.org/10.36255/EXONPUBLICATIONS.AUTISMSPECTRUMDISORDERS.2021.DIAGNOSIS>
- Loth, E., Murphy, D. G., & Spooren, W. (2016). Defining precision medicine approaches to autism spectrum disorders: Concepts and challenges. *Frontiers in Psychiatry*, 7(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00188>
- Lucchina, L., & Depino, A. M. (2013). Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Research*, 7(2), 273–289. <https://doi.org/10.1002/aur.1338>
- Lucchina, L., & Depino, A. M. (2014). Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Research*, 7(2), 273–289. <https://doi.org/10.1002/aur.1338>
- Lundby, A., Tseng, G.-N., & Schmitt, N. (2010). Structural basis for KV 7.1–KCNE_x interactions in the IKs channel complex. *Heart Rhythm*, 7(5), 1–12. <https://doi.org/doi:10.1016/j.hrthm.2009.12.017>
- Lysakowski, A., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chatlani, S., Price, S. D., & Eatock, R. A. (2011). Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *Journal of Neuroscience*, 31(27), 10101–10114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0521-11.2011>
- Maamrah, B., Pocsai, K., Bayasgalan, T., Csemer, A., & Pál, B. (2023). KCNQ4 potassium channel subunit deletion leads to exaggerated acoustic startle reflex in mice. *NeuroReport*, 34(4), 232–237. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001883>
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J., Kim, K. C., & Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 285. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Letters*, 555(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01104-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01104-9)
- MacLaren, D. A. A., Ljungberg, T. L., Griffin, M. E., & Clark, S. D. (2018). Pedunculopontine tegmentum cholinergic loss leads to a progressive decline in motor abilities and neuropathological changes resembling progressive supranuclear palsy. *The European Journal of Neuroscience*, 48(12), 3477–3497. <https://doi.org/10.1111/EJN.14212>
- Madison, D. V., & Nicoll, R. A. (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 354(1), 319–331. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015378>
- Magnani, J. W., Brody, J. A., Prins, B. P., Arking, D. E., Lin, H., Yin, X., Liu, C. T., Morrison, A. C., Zhang, F., Spector, T. D., Alonso, A., Bis, J. C., Heckbert, S. R., Lumley, T., Sitlani, C. M.,

- Cupples, L. A., Lubitz, S. A., Soliman, E. Z., Pulit, S. L., ... Sotoodehnia, N. (2014). Sequencing of SCN5A identifies rare and common variants associated with cardiac conduction: Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 7(3), 365–373. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000098>
- Manville, R. W., Papanikolaou, M., & Abbott, G. W. (2018). Direct neurotransmitter activation of voltage-gated potassium channels. *Nature Communications*, 9(1847), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04266-w>
- Manville, R. W., Papanikolaou, M., & Abbott, G. W. (2020). M-channel activation contributes to the anticonvulsant action of the ketone body b-hydroxybutyrate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 372(2), 148–156. <https://doi.org/10.1124/JPET.119.263350>
- Manville, R. W., & Abbott, G. W. (2020). Potassium channels act as chemosensors for solute transporters. *Communications Biology*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0820-9>
- Mapelli, L., Soda, T., D'Angelo, E., & Prestori, F. (2022). The Cerebellar Involvement in Autism Spectrum Disorders: From the Social Brain to Mouse Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073894>
- Marres, H., Van Ewijk, M., Huygen, P., Kunst, H., Van Camp, G., Coucke, P., Willems, P., & Cremers, C. (1997). Inherited Nonsyndromic Hearing Loss: An Audiovestibular Study in a Large Family With Autosomal Dominant Progressive Hearing Loss Related to DFNA2. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 123(6), 573–577. <https://doi.org/10.1001/ARCHOTOL.1997.01900060015002>
- Martinez-Gonzalez, C., Bolam, J. P., & Mena-Segovia, J. (2011). Topographical Organization of the Pedunculopontine Nucleus. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00022>
- Masood, W., Annamaraju, P., Suheb, M. Z. K., & Uppaluri, K. R. (2023). Ketogenic Diet. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499830/>
- Massaad, C. A., Washington, T. M., Pautler, R. G., & Klann, E. (2009). Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13576–13581. https://doi.org/10.1073/PNAS.0902714106/SUPPL_FILE/0902714106SI.PDF
- Matsumura, H., Nakano, Y., Ochi, H., Onohara, Y., Sairaku, A., Tokuyama, T., Tomomori, S., Motoda, C., Amioka, M., Hironobe, N., Toshishige, M., Takahashi, S., Imai, K., Sueda, T., Chayama, K., & Kihara, Y. (2017). H558R, a common SCN5A polymorphism, modifies the clinical phenotype of Brugada syndrome by modulating DNA methylation of SCN5A promoters. *Journal of Biomedical Science*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/S12929-017-0397-X>
- Matthews, E. A., Linardakis, J. M., & Disterhoft, J. F. (2009). *The Fast and Slow Afterhyperpolarizations Are Differentially Modulated in Hippocampal Neurons by Aging and Learning*. 29(15), 4750–4755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0384-09.2009>
- McCormick, D. A. (1989). Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci*, 215–221.

- McGarry, J. D., & Foster, D. W. (1980). Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Bi.49.070180.002143*, 49, 395–420. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.49.070180.002143>
- McGaugh, E., & Barthel, B. (2022). A Review of Ketogenic Diet and Lifestyle. *Missouri Medicine*, 119(1), 84–88.
- McGuier, N. S., Rinker, J. A., Cannady, R., Fulmer, D. B., Jones, S. R., Hoffman, M., & Mulholland, P. J. (2018). Identification and Validation of Midbrain Kcnq4 Regulation of Heavy Alcohol Consumption in Rodents. *Neuropharmacology*, 138, 10. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.05.020>
- McKenna, M. C. (2012). Substrate Competition Studies Demonstrate Oxidative Metabolism of Glucose, Glutamate, Glutamine, Lactate and 3-Hydroxybutyrate in Cortical Astrocytes from Rat Brain. *Neurochemical Research* 2012 37:11, 37(11), 2613–2626. <https://doi.org/10.1007/S11064-012-0901-3>
- Mehta, M. V., Gandal, M. J., & Siegel, S. J. (2011). mGluR5-Antagonist Mediated Reversal of Elevated Stereotyped, Repetitive Behaviors in the VPA Model of Autism. *PLOS ONE*, 6(10), e26077. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0026077>
- Meidenbauer, J. J., Mukherjee, P., & Seyfried, T. N. (2015). The glucose ketone index calculator: A simple tool to monitor therapeutic efficacy for metabolic management of brain cancer. *Nutrition and Metabolism*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0009-2>
- Meltzer, A., & Van De Water, J. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284–298. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.158>
- Mena-Segovia, J. (2016). Structural and functional considerations of the cholinergic brainstem. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 123(7), 731–736. <https://doi.org/10.1007/S00702-016-1530-9>
- Mena-Segovia, J., & Bolam, J. P. (2017). Rethinking the Pedunculo-pontine Nucleus: From Cellular Organization to Function. *Neuron*, 94(1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.027>
- Mena-segovia, J., Sims, H. M., Magill, P. J., & Bolam, J. P. (2008). Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *Journal of Physiology*, 586(12), 2947–2960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153874>
- Miceli, F., Carotenuto, L., Barrese, V., Soldovieri, M. V., Heinzen, E. L., Mandel, A. M., Lipka, N., Bier, L., Goldstein, D. B., Cooper, E. C., Cilio, M. R., Tagliatela, M., & Sands, T. T. (2020). A Novel Kv7.3 Variant in the Voltage-Sensing S4 Segment in a Family With Benign Neonatal Epilepsy: Functional Characterization and in vitro Rescue by β -Hydroxybutyrate. *Frontiers in Physiology*, 11(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01040>
- Miceli, F., Millevert, C., Soldovieri, M. V., Mosca, I., Ambrosino, P., Carotenuto, L., Schrader, D., Lee, H. K., Riviello, J., Hong, W., Risen, S., Emrick, L., Amin, H., Ville, D., Edery, P., de Bellescize, J., Michaud, V., Van-Gils, J., Goizet, C., ... Weckhuysen, S. (2022). KCNQ2 R144 variants cause neurodevelopmental disability with language impairment and autistic features without neonatal seizures through a gain-of-function mechanism. *EBioMedicine*, 81, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104130>
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Barrese, V., Migliore, M., Cilio, M. R., & Tagliatela, M.

- (2013). Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of Kv7.2 potassium channel subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(11), 4386–4391. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216867110>
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., De Maria, M., Migliore, M., Migliore, R., & Tagliatela, M. (2015). Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. *Journal of Neuroscience*, *35*(9), 3782–3793. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4423-14.2015>
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Joshi, N., Weckhuysen, S., Cooper, E. C., & Tagliatela, M. (2023). KCNQ3-Related Disorders. *GeneReviews*®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK201978/>
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Joshi, N., Weckhuysen, S., Cooper, E., & Tagliatela, M. (2022). KCNQ2-Related Disorders. *GeneReviews*®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32534/>
- Millat, G., Chanavat, V., Rodriguez-Lafrasse, C., & Rousson, R. (2009). Rapid, sensitive and inexpensive detection of SCN5A genetic variations by high resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry*, *42*(6), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.10.014>
- Miller, J. L., & Grant, P. A. (2013). The Role of DNA Methylation and Histone Modifications in Transcriptional Regulation in Humans. *Sub-Cellular Biochemistry*, *61*, 289. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_13
- Mitchell, R. W., & Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport into the brain: Of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, *85*(5), 293–302. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2011.04.007>
- Moldrich, R. X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N., & Reutens, D. C. (2013). Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behavioural Brain Research*, *257*, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.049>
- Monti, J. M. (2010). The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Medicine Reviews*, *14*(5), 319–327. <https://doi.org/10.1016/J.SMRV.2009.10.003>
- Morant-Ferrando, B., Jimenez-Blasco, D., Alonso-Batan, P., Agulla, J., Lapresa, R., Garcia-Rodriguez, D., Yunta-Sanchez, S., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Carmeliet, P., Almeida, A., Garcia-Macia, M., & Bolaños, J. P. (2023). Fatty acid oxidation organizes mitochondrial supercomplexes to sustain astrocytic ROS and cognition. *Nature Metabolism*, *5*(8), 1290–1302. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00835-6>
- Morris, A. A. M. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *28*(2), 109–121. <https://doi.org/10.1007/S10545-005-5518-0>
- Morris, G., Puri, B. K., Carvalho, A., Maes, M., Berk, M., Ruusunen, A., & Olive, L. (2020). Induced Ketosis as a Treatment for Neuroprogressive Disorders: Food for Thought? *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *23*(6), 366. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYAA008>
- Moy, S. S., & Nadler, J. J. (2008). Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. *Molecular Psychiatry*, *13*(1), 4–26. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002082>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley,

- J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Nadler, J. J., Moy, S. S., Dold, G., Trang, D., Simmons, N., Perez, A., Young, N. B., Barbaro, R. P., Piven, J., Magnuson, T. R., & Crawley, J. N. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x>
- Nagaeva, E., Zubarev, I., & Korpi, E. R. (2021). *Electrophysiological Properties of Neurons: Current-Clamp Recordings in Mouse Brain Slices and Firing-Pattern Analysis*. 11, 1–23. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4061>
- Nam, Y. S., Choi, Y. M., Lee, S., & Cho, H. H. (2023). Valproic Acid Inhibits Progressive Hereditary Hearing Loss in a KCNQ4 Variant Model through HDAC1 Suppression. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5695. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065695/S1>
- Napoli, E., Dueñas, N., & Giulivi, C. (2014). Potential Therapeutic Use of the Ketogenic Diet in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Pediatrics*, 2(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00069>
- Napolitano, C., Bloise, R., Monteforte, N., & Priori, S. G. (2012). Sudden Cardiac Death and Genetic Ion Channelopathies. *Circulation*, 125(16), 2027–2034. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.055947>
- Nappi, M., Barrese, V., Carotenuto, L., Lesca, G., Labalme, A., Ville, D., Smol, T., Dieux-coeslier, A., Rivier-ringenbach, C., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Mosca, I., Pusch, M., Miceli, F., Tagliatela, M., & Francisco, S. (2022). Gain of function due to increased opening probability by two KCNQ5 pore variants causing developmental and epileptic encephalopathy. 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116887119/-/DCSupplemental>. Published
- Nappi, P., Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Barrese, V., & Tagliatela, M. (2020). Epileptic channelopathies caused by neuronal Kv7 (KCNQ) channel dysfunction. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 472(7), 881–898. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02404-2>
- NC3Rs. (2021). <https://nc3rs.org.uk/mouse-tail-vein-non-surgical>.
- Nelson, A. B., Queathem, E. D., Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2023). Metabolic Messengers: ketone bodies. *Nature Metabolism*, 5(12), 2062–2074. <https://doi.org/10.1038/S42255-023-00935-3>
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev*, 1205–1253. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>.
- Newman, J. C., & Verdin, E. (2014a). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(1), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.002>
- Newman, J. C., & Verdin, E. (2014b). β -hydroxybutyrate: Much more than a metabolite. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 106(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.08.009>
- Newman, J. C., & Verdin, E. (2017). β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual Review of Nutrition*, 37(1), 51–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064916>
- Ng, F. L., Davis, A. J., Jepps, T. A., Harhun, M. I., Yeung, S. Y., Wan, A., Reddy, M., Melville, D., Nardi,

- A., Khong, T. K., & Greenwood, I. A. (2011). Expression and function of the K⁺ channel KCNQ genes in human arteries. *British Journal of Pharmacology*, *162*(1), 42–53. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01027.x>
- Ng, M., de Montigny, J. G., Ofner, M., & Do, M. T. (2017). Environmental factors associated with autism spectrum disorder: A scoping review for the years 2003–2013. *Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada*, *37*(1), 1–23. <https://doi.org/10.24095/hpcdp.37.1.01>
- Nicolini, C., & Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*, *299*, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>
- Niday, Z., & Tzingounis, A. V. (2018). Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. *Neuroscientist*, *24*(4), 368–380. <https://doi.org/10.1177/1073858418763752>
- Nie, L. (2008). Mutations of KCNQ4 Channels Associated with Nonsyndromic Progressive Sensorineural Hearing Loss. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, *16*(5), 441–444. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32830f4aa3.Mutations>
- Noain, J. S., Minupuri, A., Kulkarni, A., & Zheng, S. (2020). Significant Impact of the Ketogenic Diet on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels. *Cureus*, *12*(7). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.9418>
- Noh, B., Rim, J. H., Gopalappa, R., Lin, H., Kim, K. M., Kang, M. J., Gee, H. Y., Choi, J. Y., Kim, H. H., & Jung, J. (2022). In vivo outer hair cell gene editing ameliorates progressive hearing loss in dominant-negative Kcnq4 murine model. *Theranostics*, *12*(5), 2465–2482. <https://doi.org/10.7150/thno.67781>
- Norwitz, N. G., & Loh, V. (2020). A Standard Lipid Panel Is Insufficient for the Care of a Patient on a High-Fat, Low-Carbohydrate Ketogenic Diet. *Frontiers in Medicine*, *7*, 97. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.00097>
- Novarino, G., Tae Baek, S., & Gleeson, J. G. (2013). The Sacred Disease: The Puzzling Genetics of Epileptic Disorders Gaia. *Neuron*, *80*, 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.019>
- Ochoa-Lubinoff, C., Makol, B., & Dillon, E. (2023). Autism in Women. *Neurol Clin.*, *41*(2), 381–397. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2022.10.006>
- Ohno, S., Fukuyama, M., Itoh, H., Makiyama, T., & Horie, M. (2013). Copy number variations in KCNQ1 gene were frequently identified in the pediatric patients of long QT syndrome and caused exercise related QT prolongation. *European Heart Journal*, *34*(suppl_1), P2291–P2291. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHT308.P2291>
- Okada, M., Wada, K., Kamata, A., Murakami, T., Zhu, G., & Kaneko, S. (2002). Impaired M-Current and Neuronal Excitability. *Epilepsia*, *43*(SUPPL. 9), 36–38. <https://doi.org/10.1046/J.1528-1157.43.S.9.9.X>
- Okada, M., Zhu, G., Hirose, S., Ito, K. I., Murakami, T., Wakui, M., & Kaneko, S. (2003). Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Research*, *53*(1–2), 81–94. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00249-8)
- Paavonen, K. J., Chapman, H., Laitinen, P. J., Fodstad, H., Piippo, K., Swan, H., Toivonen, L., Viitasalo, M., Kontula, K., & Pasternack, M. (2003). Functional characterization of the common amino acid 897 polymorphism of the cardiac potassium channel KCNH2 (HERG). *Cardiovascular Research*, *59*(3), 603–611. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00458-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00458-9)

- Pangrazzi, L., Genovesi, S., Balasco, L., Cerilli, E., Robol, C., Zunino, G., Piazza, S., Provenzano, G., & Bozzi, Y. (2022). Immune dysfunction in the cerebellum of mice lacking the autism candidate gene *Engrailed 2*. *Journal of Neuroimmunology*, *367*(April), 577870. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2022.577870>
- Paoli, A., Rubini, A., Volek, J. S., & Grimaldi, K. A. (2013). Beyond weight loss: A review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, *67*(8), 789–796. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.116>
- Paoli, Antonio. (2014). Ketogenic diet for obesity: friend or foe? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(2), 2092–2107. <https://doi.org/10.3390/IJERPH110202092>
- Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R. (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, *1*(2), 87–93. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72350>
- Patel, T. P., Gullotti, D. M., Hernandez, P., O'Brien, W. T., Capehart, B. P., Morrison, B., Bass, C., Eberwine, J. E., Abel, T., & Meaney, D. F. (2014). An open-source toolbox for automated phenotyping of mice in behavioral tasks. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00349>
- Pattnaik, B. R., & Hughes, B. A. (2012). Effects of KCNQ channel modulators on the M-type potassium current in primate retinal pigment epithelium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *302*(5), C821. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00269.2011>
- Paventi, G., Soldovieri, M. V., Servettini, I., Barrese, V., Miceli, F., Sisalli, M. J., Ambrosino, P., Mosca, I., Vinciguerra, I., Testai, L., Scorziello, A., Raimo, G., Calderone, V., Passarella, S., & Tagliatela, M. (2022). Kv7.4 channels regulate potassium permeability in neuronal mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, *197*, 114931. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2022.114931>
- Perez-Lloret, S., & Barrantes, F. J. (2016). Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.1>
- Peroz, D., Rodriguez, N., Choveau, F., Baró, I., Mérot, J., & Lousouarn, G. (2008). Kv7 . 1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *Journal of Physiology*, *7*, 1785–1789. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148254>
- Persico, A. M., & Bourgeron, T. (2006). Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends in Neurosciences*, *29*(7), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.05.010>
- Peters, H. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F., & Isbrandt, D. (2005). Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability , resonance and behavior. *Nature Neuroscience*, *8*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1038/nn1375>
- Petzold, A., Valencia, M., Pál, B., & Mena-Segovia, J. (2015). Decoding brain state transitions in the pedunculopontine nucleus: Cooperative phasic and tonic mechanisms. *Frontiers in Neural Circuits*, *9*(OCTOBER), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00068>
- Pifferi, F., Laurent, B., & Plourde, M. (2021). Lipid Transport and Metabolism at the Blood-Brain Interface: Implications in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, *12*, 645646.

<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.645646/BIBTEX>

- Plumereau, Q., Theriault, O., Pouliot, V., Moreau, A., Morel, E., Fressart, V., Denjoy, I., Delinière, A., Bessière, F., Chevalier, P., Gamal El-Din, T. M., & Chahine, M. (2021). Novel G1481V and Q1491H SCN5A Mutations Linked to Long QT Syndrome Destabilize the Nav1.5 Inactivation State. *CJC Open*, 3(3), 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.cjco.2020.09.023>
- Pocivavsek, A., Icenogle, L., & Levin, E. D. (2006). Ventral hippocampal alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptor blockade and clozapine effects on memory in female rats. *Psychopharmacology*, 188(4), 597–604. <https://doi.org/10.1007/S00213-006-0416-1>
- Poff, A. M., Koutnik, A. P., & Egan, B. (2020). Nutritional Ketosis with Ketogenic Diets or Exogenous Ketones: Features, Convergence, and Divergence. *Current Sports Medicine Reports*, 19(7), 251–259. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000732>
- Pollock, J. D., & Makaryus, A. N. (2022). *Physiology, Cardiac Cycle*. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459327/#:~:text=Cardiac cycle events can be,pressures \(see hemodynamics below\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459327/#:~:text=Cardiac cycle events can be,pressures (see hemodynamics below)).
- Porta-Sánchez, A., Spillane, D. R., Harris, L., Xue, J., Dorsey, P., Care, M., Chauhan, V., Gollob, M. H., & Spears, D. A. (2017). T-Wave Morphology Analysis in Congenital Long QT Syndrome Discriminates Patients From Healthy Individuals. *JACC: Clinical Electrophysiology*, 3(4), 374–381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacep.2016.10.013>
- Prakash, J., Chaudhury, S., Chatterjee, K., & Kumar, S. (2022). Do food and nutrition have therapeutic value for disorders of mood and conation? *Industrial Psychiatry Journal*, 31(1), 1. https://doi.org/10.4103/IPJ.IPJ_68_22
- Priest, B. T., & McDermott, J. S. (2015). Cardiac ion channels. *Channels*, 9(6), 352–359. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1076597>
- Puchowicz, M. A., Xu, K., Sun, X., Ivy, A., Emancipator, D., & LaManna, J. C. (2007). Diet-induced ketosis increases capillary density without altered blood flow in rat brain. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(6), 1607–1615. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00512.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10060749210006.JPG>
- Qureshi, S. F., Ali, A., John, P., Jadhav, A. P., Venkateshwari, A., Rao, H., Jayakrishnan, M. P., Narasimhan, C., Shenthari, J., Thangaraj, K., & Nallari, P. (2015). Mutational analysis of SCN5A gene in long QT syndrome. *Meta Gene*, 6, 26–35. <https://doi.org/10.1016/J.MGENE.2015.07.010>
- Rauch, A., Wiczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Ende, S., Schwarzmayr, T., Albrecht, B., Bartholdi, D., Beygo, J., Di Donato, N., Dufke, A., Cremer, K., Hempel, M., Horn, D., Hoyer, J., Joset, P., Röpke, A., Moog, U., Riess, A., ... Strom, T. M. (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: An exome sequencing study. *The Lancet*, 380(9854), 1674–1682. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61480-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61480-9)
- Rew, L., Harris, M. D., & Goldie, J. (2022). The ketogenic diet: its impact on human gut microbiota and potential consequent health outcomes: a systematic literature review. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 15(4), 326. <https://doi.org/10.22037/GHFBB.V15I4.2600>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the

- interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/GIM.2015.30/ATTACHMENT/7A004D0E-5CC1-4A04-8892-2F9B13D8ACB7/MMC1.PDF>
- Roach, J. P., Ben-Jacob, E., Sander, L. M., & Zochowski, M. R. (2015). Formation and Dynamics of Waves in a Cortical Model of Cholinergic Modulation. *PLoS Computational Biology*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1004449>
- Roach, J. P., Sander, L. M., & Zochowski, M. R. (2016). Memory recall and spike-frequency adaptation. *Physical Review. E*, 93(5). <https://doi.org/10.1103/PHYSREVE.93.052307>
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 90(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00116-4)
- Rodier, P. M. (1996). Animal Model of Autism Based on Developmental Data. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 256(7996), 249–256.
- Rogers, T. D., Mckimm, E., Dickson, P. E., Goldowitz, D., Blaha, C. D., & Mittleman, G. (2013). Is autism a disease of the cerebellum?: An integration of clinical and pre-clinical research. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7(APR 2013), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00015>
- Rojas-Morales, P., Pedraza-Chaverri, J., & Tapia, E. (2020). Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis. *Redox Biology*, 29. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101395>
- Rose, J., Brian, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2020). Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance. *Frontiers in Neuroscience*, 14(November), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.536682>
- Roulet, F. I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>
- Ruan, H. Bin, & Crawford, P. A. (2018). Ketone bodies as epigenetic modifiers. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 21(4), 260–266. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000475>
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Ruskin, D. N., Fortin, J. A., Bisnauth, S. N., & Masino, S. A. (2017). Ketogenic diets improve behaviors associated with autism spectrum disorder in a sex-specific manner in the EL mouse. *Physiology and Behavior*, 168, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.10.023>
- Ruskin, D. N., Svedova, J., Cote, J. L., Sandau, U., Rho, J. M., Kawamura, M., Boison, D., & Masino, S. A. (2013). Ketogenic Diet Improves Core Symptoms of Autism in BTBR Mice. *PLoS ONE*, 8(6), 4–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065021>
- Saito, E. R., Warren, C. E., Hanegan, C. M., Larsen, J. G., du Randt, J. D., Cannon, M., Saito, J. Y., Campbell, R. J., Kemberling, C. M., Miller, G. S., Edwards, J. G., & Bikman, B. T. (2022). A Novel Ketone-Supplemented Diet Improves Recognition Memory and Hippocampal

- Mitochondrial Efficiency in Healthy Adult Mice. *Metabolites*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/metabo12111019>
- Sands, T. T., Miceli, F., Lesca, G., Beck, A. E., Sadleir, L. G., Arrington, D. K., Schönewolf-Greulich, B., Moutton, S., Lauritano, A., Nappi, P., Soldovieri, M. V., Scheffer, I. E., Mefford, H. C., Stong, N., Heinzen, E. L., Goldstein, D. B., Perez, A. G., Kossoff, E. H., Stocco, A., ... Cilio, M. R. (2019). Autism and developmental disability caused by KCNQ3 gain-of-function variants. *Annals of Neurology*, 86(2), 181–192. <https://doi.org/10.1002/ana.25522>
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., & Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*, 81(2), 299–307. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90340-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90340-2)
- Sanguinetti, M., Curran, M., Zou, A., Shen, J., Spector, P., Atkinson, D., & Keating, M. (1996). Coassembly of KVLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKS potassium channel. *Nature*, 384, 80–83.
- Santana, L. F., & Cheng, E. P. (2010). How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *Editorial*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.09.005>
- Schendel, D., & Bhasin, T. K. (2008). Birth Weight and Gestational Age Characteristics of Children With Autism, Including a Comparison With Other Developmental Disabilities. *Pediatrics*, 121(6), 1155–1164. <https://doi.org/10.1542/PEDS.2007-1049>
- Schmahmann, J. D., & Caplan, D. (2006). Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain : A Journal of Neurology*, 129(Pt 2), 290–292. <https://doi.org/10.1093/brain/awh729>
- Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B., & Pongs, O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *The EMBO Journal*, 19(3), 332–340. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.3.332>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101–1108.
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 728–740. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2008.02.011>
- Schoeler, N. E., Bell, G., Yuen, A., Kapelner, A. D., Heales, S. J. R., Cross, J. H., & Sisodiya, S. (2017). An examination of biochemical parameters and their association with response to ketogenic dietary therapies. *Epilepsia*, 58(5), 893–900. <https://doi.org/10.1111/epi.13729>
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., & Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a Novel Potassium Channel Broadly Expressed in Brain, Mediates M-type Currents. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24089–24095. <https://doi.org/10.1074/JBC.M003245200>
- Schwartz, P. J., Ackerman, M. J., George, A. L., & Wilde, A. A. M. (2013). Impact of Genetics on the Clinical Management of Channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology*,

- 62(3), 169–180. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2013.04.044>
- Schwartz, P. J., & Crotti, L. (2011). QTc Behavior During Exercise and Genetic Testing for the Long-QT Syndrome. *Circulation*, *124*, 2181–2184. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.062182>
- Schwartz, P. J., Crotti, L., & Insolia, R. (2012). Long-QT Syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *5*(4), 868–877. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.962019>
- Schwartz, P. J., Moss, A. J., Vincent, G. M., & Crampton, R. S. (1993). Diagnostic criteria for the long QT syndrome: An update. *Circulation*, *88*(2), 782–784. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.2.782>
- Schwartz, P. J., Periti, M., & Malliani, A. (1975). The long QT syndrome. *American Heart Journal*, *89*(3), 378–390.
- Sébille, S. B., Rolland, A. S., Faillot, M., Perez-Garcia, F., Colomb-Clerc, A., Lau, B., Dumas, S., Vidal, S. F., Welter, M. L., Francois, C., Bardinnet, E., & Karachi, C. (2019). Normal and pathological neuronal distribution of the human mesencephalic locomotor region. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *34*(2), 218–227. <https://doi.org/10.1002/MDS.27578>
- Segev, A., Garcia-Oscos, F., & Kourrich, S. (2016). Whole-cell patch-clamp recordings in brain slices. *Journal of Visualized Experiments*, *2016*(112), 1–10. <https://doi.org/10.3791/54024>
- Seiffe, A., Ramírez, M. F., Sempé, L., & Depino, A. M. (2022). Juvenile handling rescues autism - related effects of prenatal exposure to valproic acid. *Scientific Reports*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11269-7>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, *0*, 1. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.04.001>
- Serrano-Novillo, C., Oliveras, A., Ferreres, J. C., Condom, E., & Felipe, A. (2020). Remodeling of kv7.1 and kv7.5 expression in vascular tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21176019>
- SFARI GENE. (n.d.). *KCNQ2*. <https://gene.sfari.org/database/human-gene/KCNQ2>
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., & Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, *544*(Pt 1), 29. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2002.028571>
- Shapiro, M. S., Roche, J. P., Kaftan, E. J., Cruzblanca, H., Mackie, K., & Hille, B. (2000). Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels that underlie the neuronal M current. *Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1710–1721. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-05-01710.2000>
- Sheng, Z., Zhang, H., Zheng, P., Chen, S., Gu, Z., Zhou, J., Phaup, J. G., Chang, H., Yeh, E. T. H., Pan, H., & Li, D. (2022). Impaired Kv7 channel activity in the central amygdala contributes to elevated sympathetic outflow in hypertension. 585–596. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab031>
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Moan, N. Le, Grueter, C. a, Lim, H., Laura, R., Stevens, R. D., Newgard, C. B., Jr, R. V. F., Cabo, D., Ulrich, S., Akassoglou, K., & Verdin, E.

- (2013). Suppression of Oxidative Stress by β -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. *Science*, 339(6116), 211–214. <https://doi.org/10.1126/science.1227166>.Suppression
- Shimizu, W., & Horie, M. (2011). Phenotypic Manifestations of Gene Mutations in Ion Phenotypic Manifestations of Mutations in Genes Encoding Subunits of Cardiac Potassium Channels. *Circ Res*, 109, 97–109. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224600>
- Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., & Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain* 2016 9:1, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13041-016-0191-9>
- Sigurdsson, T., & Duvarci, S. (2016). Hippocampal-prefrontal interactions in cognition, behavior and psychiatric disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(JAN2016), 168669. <https://doi.org/10.3389/FNSYS.2015.00190/BIBTEX>
- Singh, S. P., William, M., Malavia, M., & Chu, X. P. (2022). Behavior of KCNQ Channels in Neural Plasticity and Motor Disorders. *Membranes*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/membranes12050499>
- Sinner, M. F., Pfeufer, A., Akyol, M., Beckmann, B. M., Hinterseer, M., Wacker, A., Perz, S., Sauter, W., Illig, T., Näbauer, M., Schmitt, C., Wichmann, H. E., Schömig, A., Steinbeck, G., Meitinger, T., & Kääh, S. (2008). The non-synonymous coding IKr-channel variant KCNH2-K897T is associated with atrial fibrillation: results from a systematic candidate gene-based analysis of KCNH2 (HERG). *European Heart Journal*, 29(7), 907–914. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHM619>
- Siracusano, M., Marcovecchio, C., Riccioni, A., Dante, C., & Mazzone, L. (2022). Autism Spectrum Disorder and a De Novo Kcnq2 Gene Mutation: A Case Report. *Pediatric Reports*, 14(2), 200–206. <https://doi.org/10.3390/pediatric14020027>
- Smith, R. J., & Hildebrand, M. (2018). DFNA2 Nonsyndromic Hearing Loss. *GeneReviews*, 1–14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1209/>
- Soh, H., Pant, R., LoTurco, J. J., & Tzingounis, A. V. (2014). Conditional deletions of epilepsy-associated KCNQ2 and KCNQ3 channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *Journal of Neuroscience*, 34(15), 5311–5321. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3919-13.2014>
- Soh, H., Springer, K., Doci, K., & Balsbaugh, J. L. (2022). *KCNQ2 and KCNQ5 form heteromeric channels independent*. 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117640119/-/DCSupplemental>.Published
- Soldovieri, M. V., Miceli, F., & Tagliatela, M. (2011). Driving with no brakes: Molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology*, 26(5), 365–376. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2011>
- Song, M. K., Bae, E. J., Baek, J. S., Kwon, B. S., Kim, G. B., Noh, C. Il, Choi, J. Y., & Park, S. S. (2011). QT Prolongation and Life Threatening Ventricular Tachycardia in a Patient Injected With Intravenous Meperidine (Demerol®). *Korean Circulation Journal*, 41(6), 342. <https://doi.org/10.4070/KCJ.2011.41.6.342>
- Sotty, F., Damgaard, T., Montezinho, L. P., Mørk, A., Olsen, C. K., Bundgaard, C., & Husum, H. (2009). Antipsychotic-like effect of retigabine [N-(2-Amino-4-(fluorobenzylamino)-phenyl)carbamic acid ester], a KCNQ potassium channel opener, via modulation of

- mesolimbic dopaminergic neurotransmission. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 951–962. <https://doi.org/10.1124/JPET.108.146944>
- Spaiardi, P., Marcotti, W., Masetto, S., & Johnson, S. L. (2022). Signal transmission in mature mammalian vestibular hair cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.806913>
- Spitzmaul, G., Tolosa, L., Winkelman, B. H. J., Heidenreich, M., Frens, M. A., Chabbert, C., De Zeeuw, C. I., & Jentsch, T. J. (2013). Vestibular role of KCNQ4 and KCNQ5 K⁺ channels revealed by mouse models. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9334–9344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433383>
- Springer, K., Varghese, N., & Tzingounis, A. V. (2021). Flexible stoichiometry: implications for KCNQ2 and KCNQ3 associated neurodevelopmental disorders. *Developmental Neuroscience*, 43(3–4), 191. <https://doi.org/10.1159/000515495>
- Sripongpun, P., Churuangsuk, C., & Bunchorntavakul, C. (2022). Current Evidence Concerning Effects of Ketogenic Diet and Intermittent Fasting in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 10(4), 730. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00494>
- Stein, T. P., Schluter, M. D., Steer, R. A., & Ming, X. (2023). Bisphenol-A and phthalate metabolism in children with neurodevelopmental disorders. *PloS One*, 18(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0289841>
- Storm, B. Y. J. F. (1989). After-hyperpolarization of medium duration. *Journal of Physiology*, 409, 171–190. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017491>
- Storm, J. F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 385, 733–759. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016517>
- Stott, J. B., Barrese, V., & Greenwood, I. A. (2016). Kv7 Channel Activation Underpins EPAC-Dependent Relaxations of Rat Arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(12), 2404–2411. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308517>
- Su, M., Li, L., Wang, J., Sun, H., Zhang, L., Zhao, C., Xie, Y., Gamper, N., Du, X., & Zhang, H. (2019). Kv7.4 Channel Contribute to Projection-Specific Auto-Inhibition of Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00557>
- Sun, J., & MacKinnon, R. (2020). Structural Basis of Human KCNQ1 Modulation and Gating. *Cell*, 180(2), 340–347.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.003>
- Swietek, B., Gupta, A., Proddatur, A., & Santhakumar, V. (2016). Immunostaining of biocytin-filled and processed sections for neurochemical markers. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(118), 1–9. <https://doi.org/10.3791/54880>
- Takahashi, H., Nakahachi, T., Komatsu, S., Ogino, K., Iida, Y., & Kamio, Y. (2014). Hyperreactivity to weak acoustic stimuli and prolonged acoustic startle latency in children with autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, 23, 1–8.
- Taura, J., Kircher, D. M., Gameiro-Ros, I., & Slesinger, P. A. (2021). Comparison of K⁺ Channel Families. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 267, 1–49. https://doi.org/10.1007/164_2021_460

- Taylor, K. C., & Sanders, C. R. (2017). Regulation of KCNQ/Kv7 family voltage-gated K⁺ channels by lipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1859*(4), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.023>
- Testai, L., Barrese, V., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Martelli, A., Vinciguerra, I., Miceli, F., Greenwood, I. A., Scorziello, A., Curtis, M. J., Breschi, M. C., Jose, M., Canduela, M. J., Grandes, P., Calderone, V., & Taglialatela, M. (2016). *Expression and function of Kv7 . 4 channels in rat cardiac mitochondria : possible targets for cardioprotection*. 40–50. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv281>
- Than, B. L. N., Goos, J. A. C. M., Sarver, A. L., O’Sullivan, M. G., Rod, A., Starr, T. K., Fijneman, R. J. A., Meijer, G. A., Zhao, L., Zhang, Y., Largaespada, D. A., Scott, P. M., & Cormier, R. T. (2014). The role of KCNQ1 in mouse and human gastrointestinal cancers. *Oncogene*, *33*(29), 3861–3868. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.350>
- The Jackson Laboratory, J. (2022). *Physiological Data Summary – C57BL/6J (#000664)*.
- Thompson, E., Eldstrom, J., & Fedida, D. (2021). Hormonal Signaling Actions on Kv7.1 (KCNQ1) Channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *61*, 381–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023645>
- Ting, R., Dugré, N., Allan, G. M., & Lindblad, A. J. (2018). Ketogenic diet for weight loss. *Canadian Family Physician*, *64*(12), 906. https://doi.org/10.4103/jcsr.jcsr_113_19
- Titier, K., Girodet, P. O., Verdoux, H., Molimard, M., Bégaud, B., Haverkamp, W., Lader, M., & Moore, N. (2005). Atypical antipsychotics: From potassium channels to torsade de pointes and sudden death. *Drug Safety*, *28*(1), 35–51. <https://doi.org/10.2165/00002018-200528010-00003/METRICS>
- Torekov, S. S., Iepsen, E., Christiansen, M., Linneberg, A., Pedersen, O., Holst, J. J., Kanters, J. K., & Hansen, T. (2014). KCNQ1 long QT syndrome patients have hyperinsulinemia and symptomatic hypoglycemia. *Diabetes*, *63*(4), 1315–1325. <https://doi.org/10.2337/DB13-1454>
- Torrado, M., Fernández, G., Ganoza, C. A., Maneiro, E., García, D., Sonicheva-Paterson, N., Rosa, I., Ochoa, J. P., Santomé, L., Vasichkina, E., & Monserrat, L. (2021). A cryptic splice-altering KCNQ1 variant in trans with R259L leading to Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Npj Genomic Medicine*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41525-021-00183-y>
- Tronick, E., & Hunter, R. G. (2016). Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*(JUN), 107. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2016.00107>
- Tseng, C. E. J., McDougle, C. J., Hooker, J. M., & Zürcher, N. R. (2022). Epigenetics of Autism Spectrum Disorder: Histone Deacetylases. *Biological Psychiatry*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.11.021>
- Tsvetkov, D., Schleifenbaum, J., Wang, Y., Kassmann, M., Polovitskaya, M. M., Ali, M., Schütze, S., Rothe, M., Luft, F. C., Jentsch, T. J., & Gollasch, M. (2024). KCNQ5 Controls Perivascular Adipose Tissue-Mediated Vasodilation. *Hypertension*, *81*(3), 561–571. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.123.21834>
- Tuchman, R., & Cuccaro, M. (2011). Epilepsy and autism: Neurodevelopmental perspective. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *11*(4), 428–434. <https://doi.org/10.1007/s11910-011-0195-x>

- Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J., & Mogil, J. S. (2018). Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nature Methods*, *15*(12), 994. <https://doi.org/10.1038/S41592-018-0224-7>
- Tzingounis, A. V., Heidenreich, M., Kharkovets, T., Spitzmaul, G., Jensen, H. S., Nicoll, R. A., & Jentsch, T. J. (2010). The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(22), 10232–10237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004644107>
- Tzingounis, Anastassios V., & Nicoll, R. A. (2008). Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 19974–19979. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810535105>
- Ungaro, P., Nettore, I. C., Franchini, F., Palatucci, G., Muscogiuri, G., Colao, A., & Macchia, P. E. (2022). Epigenome Modulation Induced by Ketogenic Diets. *Nutrients*, *14*(15). <https://doi.org/10.3390/NU14153245>
- Van Camp, G., Coucke, P. J., Akita, J., Fransen, E., Abe, S., De Leenheer, E. M. R., Huygen, P. L. M., Cremers, C. W. R. J., & Usami, S. I. (2002). A mutational hot spot in the KCNQ4 gene responsible for autosomal dominant hearing impairment. *Human Mutation*, *20*, 15–19. <https://doi.org/10.1002/HUMU.10096>
- Van Dort, C. J., Zachs, D. P., Kenny, J. D., Zheng, S., Goldblum, R. R., Gelwan, N. A., Ramos, D. M., Nolan, M. A., Wang, K., Weng, F. J., Lin, Y., Wilson, M. A., & Brown, E. N. (2015). Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(2), 584–589. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423136112>
- Van Hall, G., Strømstad, M., Rasmussen, P., Jans, Ø., Zaar, M., Gam, C., Quistorff, B., Secher, N. H., & Nielsen, H. B. (2009). Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *29*(6), 1121–1129. <https://doi.org/10.1038/JCBFM.2009.35>
- Varian, B. J., Weber, K. T., & Erdman, S. E. (2023). Oxytocin and the microbiome. *Comprehensive Psychoneuroendocrinology*, *16*, 100205. <https://doi.org/10.1016/J.CPNEC.2023.100205>
- Veech, R. L. (2004). The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *70*(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.09.007>
- Veerman, C. C., Wilde, A. A. M., & Lodder, E. M. (2015). The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV 1.5: role in physiology and pathophysiology. *Gene*, *573*(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.062>
- Verpeut, J. L., DiCicco-Bloom, E., & Bello, N. T. (2016). Ketogenic diet exposure during the juvenile period increases social behaviors and forebrain neural activation in adult Engrailed 2 null mice. *Physiology & Behavior*, *161*, 90–98. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2016.04.001>
- Vidić, V., Ilić, V., Toskić, L., Janković, N., & Ugarković, D. (2021). Effects of calorie restricted low carbohydrate high fat ketogenic vs. non-ketogenic diet on strength, body-composition, hormonal and lipid profile in trained middle-aged men. *Clinical Nutrition*, *40*(4), 1495–1502. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2021.02.028>

- Volkmar, F. R., & McPartland, J. C. (2014). From kanner to DSM-5: Autism as an evolving diagnostic concept. *Annual Review of Clinical Psychology*, *10*, 193–212. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153710>
- Volmar, C. H., & Wahlestedt, C. (2015). Histone deacetylases (HDACs) and brain function. *Neuroepigenetics*, *1*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.nepig.2014.10.002>
- Waddington, H. (1942). The epigenotype. *Endeavour*, *1*, 18–20. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135650737697792>
- Wang, H.-S., Pan, Z., Shi, W., Barry, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. R., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 Potassium Channel Subunits: Molecular Correlates of the M-Channel. *Science*, *282*, 1890–1893. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5395.1890>
- Wang, H. L., & Morales, M. (2009). Pedunculo pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *29*(2), 340–358. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06576.x>
- Wang, J. J., & Li, Y. (2016). KCNQ potassium channels in sensory system and neural circuits. *Acta Pharmacologica Sinica*, *37*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.131>
- Wang, T., & Wehrens, X. H. T. (2012). Enhanced impact of SCN5A mutation associated with long QT syndrome in fetal splice isoform. *Heart Rhythm*, *9*(4), 598–599. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.11.049>
- Wang, X., Wu, X., Liu, Q., Kong, G., Zhou, J., Jiang, J., Wu, X., Huang, Z., Su, W., & Zhu, Q. (2017). Ketogenic Metabolism Inhibits Histone Deacetylase (HDAC) and Reduces Oxidative Stress After Spinal Cord Injury in Rats. *Neuroscience*, *366*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.09.056>
- Wang, Ying, Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, *217*(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Wang, Yundi, Eldstrom, J., & Fedida, D. (2020). Gating and Regulation of KCNQ1 and KCNQ1 + KCNE1 Channel Complexes. *Frontiers in Physiology*, *11*, 543655. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00504/BIBTEX>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Watts, T. J. (2008). The Pathogenesis of Autism. *Clinical Medicine. Pathology*, *1*, 99–103. <https://doi.org/10.4137/CPATH.S1143>
- Webb, S. J., Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W. W., Giedd, J., Dawson, G., & Dager, S. R. (2009). Cerebellar vermal volumes and behavioral correlates in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, *172*(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.06.001>
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives*, *114*(3), A160. <https://doi.org/10.1289/EHP.114-A160>
- Wheless, J. W. (2008). History of the ketogenic diet. *Epilepsia*, *49*(SUPPL. 8), 3–5.

<https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2008.01821.X>

- Wilde, A. A. M., & Amin, A. S. (2018). Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy. *JACC: Clinical Electrophysiology*, 4(5), 569–579. <https://doi.org/10.1016/J.JACEP.2018.03.006>
- Wilde, A. A. M., Semsarian, C., Márquez, M. F., Sepehri Shamloo, A., Ackerman, M. J., Ashley, E. A., Sternick, E. B., Barajas-Martinez, H., Behr, E. R., Bezzina, C. R., Breckpot, J., Charron, P., Chockalingam, P., Crotti, L., Gollob, M. H., Lubitz, S., Makita, N., Ohno, S., Ortiz-Genga, M., ... Deneke, T. (2022). European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for Cardiac Diseases. *Heart Rhythm*, 19(7), e1–e60. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2022.03.1225>
- Williams, G., King, J., Cunningham, M., Stephan, M., Kerr, B., & Hersh, J. H. (2001). Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 43(3), 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2001.tb00188.x>
- Wilson, D. I. G., MacLaren, D. A. A., & Winn, P. (2009). Bar pressing for food: differential consequences of lesions to the anterior versus posterior pedunculopontine. *The European Journal of Neuroscience*, 30(3), 504–513. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2009.06836.X>
- Wiśniowiecka-Kowalnik, B., & Nowakowska, B. A. (2019). Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. *Journal of Applied Genetics*, 60(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-00480-w>
- Woo, C. C., Donnelly, J. H., Steinberg-Epstein, R., & Leon, M. (2015). Environmental enrichment as a therapy for autism: A clinical trial replication and extension. *Behavioral Neuroscience*, 129(4), 412–422. <https://doi.org/10.1037/BNE0000068>
- Wolf, N. J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology*, 37(6), 475–524. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90006-M](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90006-M)
- Wolf, N. J., & Butcher, L. L. (2011). Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.046>
- World Health Organization. (2023). *Autism*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
- Wu, X., & Larsson, H. P. (2020). Insights into Cardiac IKs (KCNQ1 / KCNE1) Channels Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 1–23.
- Xiong, Q., Gao, Z., Wang, W., & Li, M. (2008). Activation of Kv7 (KCNQ) voltage-gated potassium channels by synthetic compounds. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.11.010>
- Yamaguchi, H., Hara, Y., Ago, Y., Takano, E., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., & Takuma, K. (2017). Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behavioural Brain Research*, 333(June), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.035>
- Yang, N. Du, Kanyo, R., Zhao, L., Li, J., Kang, P. W., Dou, A. K., White, K. M. F., Shi, J., Nerbonne, J. M., Kurata, H. T., & Cui, J. (2022). Electro-mechanical coupling of KCNQ channels is a target

- of epilepsy-associated mutations and retigabine. *Science Advances*, 8(29), 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo3625>
- Yang, Q., Tan, Q. Q., Lan, C. J., Lv, B. Z., Zhou, G. M., Zhong, W. Q., Gu, Z. M., Mao, Y. M., & Liao, X. (2021). The Changes of KCNQ5 Expression and Potassium Microenvironment in the Retina of Myopic Guinea Pigs. *Frontiers in Physiology*, 12, 790580. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.790580>
- Yeomans, J. S., & Frankland, P. W. (1995). The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Research Reviews*, 21(3), 301–314. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(96\)00004-5](https://doi.org/10.1016/0165-0173(96)00004-5)
- Yeung, S. Y. M., Pucovsky, V., Moffatt, J. D., Saldanha, L., Schwake, M., Ohya, S., & Greenwood, I. A. (2007). Molecular expression and pharmacological identification of a role for Kv7 channels in murine vascular reactivity. *British Journal of Pharmacology*, 151, 758–770. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707284>
- Youm, Y. H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D., D’Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T. D., Kang, S., Horvath, T. L., Fahmy, T. M., Crawford, P. A., Biragyn, A., Alnemri, E., & Dixit, V. D. (2015). The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*, 21(3), 263–269. <https://doi.org/10.1038/NM.3804>
- Zaheer, J., Kim, H., Ko, I. O., Jo, E. K., Choi, E. J., Lee, H. J., Shim, I., Woo, H. jeong, Choi, J., Kim, G. H., & Kim, J. S. (2022). Pre/post-natal exposure to microplastic as a potential risk factor for autism spectrum disorder. *Environment International*, 161. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2022.107121>
- Zappala, C., Barrios, C. D., & Depino, A. M. (2023). Social deficits in mice prenatally exposed to valproic acid are intergenerationally inherited and rescued by social enrichment. *NeuroToxicology*, 97, 89–100. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2023.05.009>
- Zavaritskaya, O., Zhuravleva, N., Schleifenbaum, J., Gloe, T., Devermann, L., Kluge, R., Mladenov, M., Frey, M., Gagov, H., Fésüs, G., Gollasch, M., & Schubert, R. (2013). Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction. *Hypertension*, 61(1), 151–159. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197566>
- Zaydman, M. A., & Cui, J. (2014). PIP2 regulation of KCNQ channels: Biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating. *Frontiers in Physiology*, 5 MAY(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00195>
- Zaydman, M. A., Silva, J. R., Delaloye, K., Li, Y., Liang, H., Larsson, H. P., & Shi, J. (2013). Kv7. 1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305167110>
- Zehelein, J., Thomas, D., Khalil, M., Wimmer, A. B., Koenen, M., Licka, M., Wu, K., Kiehn, J., Brockmeier, K., Kreye, V. A. W., Karle, C. A., Katus, H. A., Ulmer, H. E., & Schoels, W. (2004). Identification and characterisation of a novel KCNQ1 mutation in a family with Romano–Ward syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1690(3), 185–192. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2004.06.024>
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, 15(5), 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>
- Zhang, J., Wang, M., Wei, B., Shi, J., & Yu, T. (2022). Research Progress in the Study of Startle

- Reflex to Disease States. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 18(February), 427–435. <https://doi.org/10.2147/NDT.S351667>
- Zhang, Li, Wu, X., & Lin, X. (2020). Gene therapy for genetic mutations affecting non-sensory cells in the cochlea. *Hearing Research*, 394, 107858. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.107858>
- Zhang, Lu, Ma, X., Jiang, Z., Zhang, K., Zhang, M., Li, Y., Zhao, X., & Xiong, H. (2015). Liver enzymes and metabolic syndrome: a large-scale case-control study. *Oncotarget*, 6(29), 26782. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5792>
- Zhang, Xiaolong, Wang, H., & Wang, Q. (2021). Progression of KCNQ4 related genetic hearing loss: a narrative review. *Journal of Bio-X Research*, 4(4), 151–157. <https://doi.org/10.1097/JBR.000000000000112>
- Zhang, Xiaoming, & Hughes, B. A. (2013). KCNQ and KCNE Potassium Channel Subunit Expression in Bovine Retinal Pigment Epithelium. *Experimental Eye Research*, 116, 424. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.10.013>
- Zhang, Xiaoming, Yang, D., & Hughes, B. A. (2011). KCNQ5/Kv7.5 potassium channel expression and subcellular localization in primate retinal pigment epithelium and neural retina. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 301(5), C1017. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00185.2011>
- Zhao, C., Su, M., Wang, Y., Li, X., Zhang, Y., Du, X., & Zhang, H. (2017). Selective modulation of K+ channel Kv7.4 significantly affects the excitability of DRN 5-HT neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00405>
- Zheng, W., Hu, Y., Chen, D., Li, Y., & Wang, S. (2019). [Improvement of a mouse model of valproic acid-induced autism]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University*, 39(6), 718–723. <https://doi.org/10.12122/J.ISSN.1673-4254.2019.06.14>
- Zheng, Y., Liu, H., Chen, Y., Dong, S., Wang, F., Wang, S., Li, G., Shu, Y., & Xu, F. (2022). Structural insights into the lipid and ligand regulation of a human neuronal KCNQ channel. *Neuron*, 110(2), 237–247.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.029>
- Zhou, J., & Parada, L. F. (2012). PTEN signaling in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 873–879. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.05.004>
- Zhu, H., Bi, D., Zhang, Y., Kong, C., Du, J., Wu, X., Wei, Q., & Qin, H. (2022). Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00831-w>

PUBLICACIONES y CONGRESOS

Internacionales:

Leonardo Dionisio, Sofia Stupniki, Eugenio Aztiria, Ezequiel Rías, Leandro Dye, Leonardo Onetto, Franco Gregoriotti, Roberto Keegan, Guillermo Spitzmaul. *Genetic Study in Argentinian Patients with Clinical Long QT Syndrome Diagnosis*. **Journal of Pediatrics, Perinatology and Child Health**. 8 (2024): 41-52.

Tsogbadrakh Bayasgalan*, Sofia Stupniki*, Adrienn Kovács, Andrea Csemer, Peter Szentesi, Krisztina Pocsai, Leonardo Dionisio, Guillermo F. Spitzmaul* and Balázs Pál* (*equal contribution). *Alteration of mesopontine cholinergic function by the lack of KCNQ4 subunit*. **Frontiers in Cellular Neuroscience** Vol. 15, Art. 707789, 2021. doi: [10.3389/fncel.2021.707789](https://doi.org/10.3389/fncel.2021.707789).

Dionisio L, Shimizu M, Stupniki S, Oyama S, Aztiria E, Alda M, Yamazaki H and Spitzmaul G. *Novel variants in outer protein surface of flavin-containing monooxygenase 3 found in an Argentinian case with impaired capacity for trimethylamine N-oxygenation*. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics** Vol. 35, Issue 4, 2020, pág. 383-388. doi: [10.1016/j.dmpk.2020.05.003](https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.05.003)

Nacionales:

Sofia Stupniki, Ezequiel Rías, Leonardo Dionisio, Carlos J. Baier, Guillermo Spitzmaul. *The ketogenic diet as an epigenetic modulator*. XXXV Congreso Anual **SAN EBook**, 2023, pág 295.

Ezequiel Rías, Ingrid Ouwerkerk, Sofia Stupniki, Giuliana Paolillo, Valeria C. Castagna, Jimena A. Ballesteros, Leonardo Dionisio, Ana Belén Elgoyhen, María Eugenia Gomez-Casati, Guillermo Spitzmaul. *Exploring MOC System Influence on OHC Degeneration in DFNA2-Related Deafness*. XXXVIII Congreso Anual **SAN EBook**, 2023, pág 237.

Stupniki, S., Aztiria, E., Spitzmaul, G. *Effect of a ketogenic diet on the expression of potassium channels controlling neuronal excitability*. **Encuentro SAN 2022**, Ciudad Universitaria UBA, Argentina, 2022.

Vera, M. Stupniki, S. Bruera, M. Paz, MC, Dionisio, L. Vater, A., Schaiquevich, P., Contin, MA., Spitzmaul, G. *The absence of the potassium channel KCNQ4 affects the visual function*. **Encuentro SAN 2022**, Ciudad Universitaria UBA, Argentina, 2022.

Rías, E., Simone, S., Carignano, C., Stupniki, S., Vera, M., Spitzmaul, G., and Dionisio, L. *Alterations of the efferent system in outer hair cells of a mouse model of hearing loss. Revista Medicina (Buenos Aires)* Vol. 82, Suppl. V, 2022 (ISSN 1669-9106), pág. 222.

Rías, E., Carignano, C., Dionisio, L., Castagna, V., Stupniki, S., Vera, M., Gómez-Casati, ME., Spitzmaul, G. *Cellular and functional mechanisms involved in hearing loss in a DFNA2 mouse model. BioCell* 46, Suppl. 1, 2022 (ISSN 1667-5746), pág. 185.

Dionisio, L., Rías, E., Carignano, C., Stupniki, S., Vera, M., Spitzmaul, G. *Molecular alterations caused by chronic cochlear depolarization in a mouse model of hearing loss. Revista Medicina (Buenos Aires)* Vol. 81, Supl. III, 2021 (ISSN 1669-9106), pág. 188.

Giorgi, G., Fernández Delias, MF., Chrestia, JF., Vera, M., Stupniki, S., Facchinetti, MM. *Comparación del rendimiento de los estudiantes entre la modalidad virtual y la presencial utilizando debate guiado en grupos pequeños y evaluación cuantitativa y cualitativa continua. SAFIS + ALACF 2021 Joint Meeting. Physiological Mini Reviews*, Vol. 14, 2021 [ISSN 1669-5410 (Online)], pág. 18.

Stupniki, S; Bayasgalan, T; Kovács, A; Csemer, A; Szentesi, P, Pocsai, K; Dionisio, L; Spitzmaul, G and Pal, B. *KCNQ4 in the reticular activating system (RAS): contribution to the circadian rhythm modulation. XXXV Congreso Annual SAN EBook*, 2020, pág 282.

Stupniki S; Dionisio L; Aztiria E; Alda M; Shimizu M; Yamazaki H; Spitzmaul G. *Novel FMO3 mutations involved in trimethylaminuria disorder. Revista Medicina (Buenos Aires)* Vol. 79, Supl. IV, 2019 (ISSN 1669-9106), pág. 248.

Dionisio L., Aztiria E., Stupniki S., Dye L., Onetto L., Gregoriotti F., Keegan R., Spitzmaul G. *Association between clinical and genetic diagnosis in patients with LQT syndrome: importance of genetic testing. Revista Medicina (Buenos Aires)* Vol. 79, Supl. IV, 2019 (ISSN 1669-9106), pág. 86.

Stupniki, S; Dionisio, L; Perotti, GT; Barila, EP; Dye, L; Kovács, A; Bayasgalan, T; Pal, B; Spitzmaul, G. *Physiological significance of the KCNQ4-mediated M-current in the pedunculopontine nucleus of the reticular activating system. ASN Neuro*, Vol. 13, 2020, pág. 114. DOI: 10.1177/1759091420979851

Vera, MS; Stupniki, S; Barila, EP; German, OL; Spitzmaul, G. *Expression and cellular function of KCNQ channels in the eye. ASN Neuro*, Vol. 13, 2020, pág. 68. DOI: 10.1177/1759091420979851

FINANCIACIÓN

PGI-UNS 24/B333: *“Mecanismos neuronales de pérdida auditiva por sobreestimulación crónica de la cóclea”*. Director: Dr. Guillermo Spitzmaul. Período: 01/01/2022 – 31/12/2025.

Proyecto PIP (CONICET - 11220200100091CO01). *“Pérdida auditiva debido a sobreestimulación crónica coclear: descifrando las alteraciones neuronales de vías aferentes y eferentes”*. Período: 2021-2023.

PGI-UNS: *“Análisis genético de pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Brugada en la población de Bahía Blanca”*. Director: Aztiria, Eugenio. Codirector: Spitzmaul, Guillermo. Período: 2020-2022.

PICT 2016 N°0260: *“Implicancia de KCNQ4 en los mecanismos celulares y moleculares de la sordera de progresión lenta DFNA2”*. Responsable: Spitzmaul, Guillermo. Período: 2019-2021.

PGI-UNS 24/B262: *“Implicancia de KCNQ4 en los mecanismos celulares y moleculares de la sordera de progresión lenta DFNA2”*. Director: Spitzmaul, Guillermo. Período: 2019-2020.

Proyecto de Investigación de Unidad Ejecutora (P.U.E. Convocatoria 2017) INIBIBB-CONICET: *“Multienfoques en el estudio de los desórdenes del espectro autista”*. Director: Bouzat, Cecilia. Período: 2018-2023.

MINCyT HU/17/02: Proyecto Conjunto de Investigación en el marco de Programas de Cooperación Bilateral (MINCYT-CONICET-NRDIO): *“Investigación de las subunidades de los canales KCNQ en el sistema activador reticular (RAS) colinérgico”*. Director Argentina: Spitzmaul, Guillermo. Director Hungría: Pál, Balázs. Período: 2018-2019.